

PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

308 090

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.:

C08B 37/16 (2006.01)
A61K 31/7028 (2006.01)
A61K 38/08 (2006.01)
A61K 47/40 (2006.01)

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2016-152**
(22) Přihlášeno: **16.03.2016**
(40) Zveřejněno: **27.09.2017**
(Věstník č. 39/2017)
(47) Uděleno: **20.11.2019**
(24) Oznámení o udělení ve věstníku: **02.01.2020**
(Věstník č. 1/2020)

(56) Relevantní dokumenty:

YANNAKOPOULOU, K. Cationic cyclodextrins: cell penetrating agents and other diverse applications. Journal of Drug Delivery Science and Technology, 2012, 22, 243-249.; GARCÍA, Yara Ruiz, et al. Cyclodextrin-peptide conjugates for sequence specific DNA binding. Organic & biomolecular chemistry, 2015, 13, 5273-5278..
WO 2007/009265 A1; WO 2006/027631 A1.

(73) Majitel patentu:

Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, v.v.i.,
Praha 6, CZ

(72) Původce:

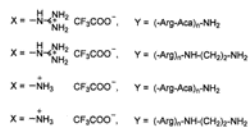
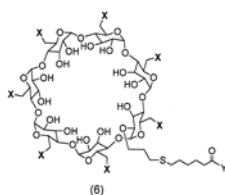
Mgr. Tomáš Kraus, Ph.D., Praha 2, CZ
Mgr. Zbigniew Zawada, Ph.D., Vendryně, CZ

(54) Název vynálezu:

**Transportér nukleosidtrifosfátů přes
buněčnou membránu, způsob jeho přípravy
a použití**

(57) Anotace:

Sloučeniny obecného vzorce 6, kde X je $-\text{NH}-\text{C}(\text{NH}_2)=\text{N}^+\text{H}_2 \text{CF}_3\text{COO}^-$ nebo $-\text{N}^+\text{H}_3 \text{CF}_3\text{COO}^-$ a Y je lineární oligomer sestávající z argininových jednotek $(-\text{Arg})_n-\text{NH}_2$, kde n = 6 až 10, anebo z arginin-aminokapronových jednotek zakončený aminodimethylenamidovou jednotkou $(-\text{Arg}-\text{Aca})_n-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2\text{NH}_2$, kde n = 6 až 10. Příprava sloučenin obecného vzorce 6 a jejich použití jako nosičů nukleosidtrifosfátů přes buněčné membrány pro účely inkorporace modifikovaných nukleosidtrifosfátů do buněčné DNA nebo RNA. Sloučeniny obecného vzorce 6 pro použití jako nosiče nukleosidtrifosfátů přes buněčné membrány pro účely stanovení virostatické aktivity modifikovaných nukleosidtrifosfátů.



(6)

Transportér nukleosidtrifosfátů přes buněčnou membránu, způsob jeho přípravy a použití

Oblast techniky

5

Vynález spadá do průmyslové a vědní oblasti. Transportér nukleosidtrifosfátů přes buněčnou membránu může být využit jak v procesu hledání nových léčiv, tak pro další vývoj v experimentální buněčné biologii.

10

Dosavadní stav techniky

Chemicky modifikovaná analoga nukleosidů jsou široce využívána ve farmaceutickém průmyslu jako virostatická a kancerostatická léčiva (Jordheim et al., 2013). Mechanismy jejich účinku zahrnují především inhibici procesů vedoucích k replikaci virů, resp. replikaci buněk. Ve většině případů nejsou aplikovaná analoga nukleosidů sama o sobě aktivní – těmi se stávají až po enzymy katalyzované kaskádě fosforylací, které vedou ke vzniku nukleosidtrifosfátů, popř. fosfonáto–difosfátů. Teprve tyto látky jsou účinnými metabolity; například virostatické modifikované nukleotidy mohou inhibovat replikaci viru nejčastěji mechanismem inhibice reverzní transkriptázy, která katalyzuje proces přepisu genetické informace z ribonukleové kyseliny (RNA) viru do deoxyribonukleové kyseliny (DNA) hostitelské buňky. Dalším známým mechanismem je inkorporace takového modifikovaného analoga nukleotidu do DNA, který znemožní pokračování syntézy řetězce DNA, a tím dojde k zastavení replikace buňky. Obdobné mechanismy se mohou uplatnit i při inhibici syntézy RNA virů.

25

V současnosti jsou při testování a aplikaci léčiv používána nefosforylovaná chemicky modifikovaná analoga nukleosidů, protože fosforylované nukleotidy neprocházejí buněčnou membránou. Je známo, že modifikované nukleosidy se však v buňce fosforylují s nízkou konverzí, protože zejména enzymy katalyzující syntézu monofosfátů (monofosfát kinázy) jsou velmi specifické. To vedlo k vývoji tzv. "prodrugs" (proléčiv), což mohou být monofosfáty nebo monofosfonáty, jejichž fosfátová (resp. fosfonátová) funkce je převedena např. na ester; tento derivát pak mnohem snadněji proniká přes buněčnou membránu a v cytosolu je enzymaticky katalyzovaným odštěpením regenerován monofosfát (monofosfonát), který dále vstupuje do fosforylační kaskády, jejíž produktem je aktivní trifosfát. Neexistuje ovšem univerzální ideální "prodrug"; naopak hledání optimální struktury derivátu fosfátu vyžaduje testování celé řady strukturních analog a při hledání aktivních látek se k přípravě "prodrug" derivátů přistupuje až vtom případě, že již matečný nukleosid vykazuje aktivitu.

35

Z výše uvedeného je zřejmé, že v procesu hledání nových aktivních látek může docházet k nežádoucí eliminaci potenciálně velmi účinných látek jen proto, že i) selhává jejich transport přes buněčnou membránu, nebo ii) nukleosidy nejsou v buňce fosforylovány, přičemž není technicky a ekonomicky schůdné od každé nové struktury analoga nukleosidů připravit všechny potenciálně účinné deriváty – "prodrugs". Je zřejmé, že proces objevu nových aktivních látek by mohl být značně efektivnější, pokud by byly na buněčných modelech, popřípadě *in vivo*, testovány přímo aktivní metabolity, tj. trifosfáty nukleosidů. Tyto látky ale neprocházejí přes buněčnou membránu, proto nebyl takový postup dosud možný. V nedávné době bylo v literatuře publikováno několik přístupů k řešení tohoto problému. Popsány byly pokusy transponovat modifikované nukleosidtrifosfáty (dále NTP) ve formě komplexů s lipozomy nebo s polymery nesoucími aminoskupiny (Hillaireau & Couvreur, 2009), ukázaly se však málo efektivními. Z publikovaných prací lze za dostatečně prokázaný transport NTP považovat práce Vinogradova et al., který komplexoval NTP do nanogelů, které fúzí s buněčnými membránami a při tomto procesu dojde k uvolnění NTP do cytosolu. Důkaz byl proveden na úrovni monitoringu fluorescenčně značených NTP (Vinogradov et al., 2005a) i stanovením cytostatické aktivity fludarabin–5–trifosfátu (Vinogradov et al., 2005b). Zásadní nevýhodou nosiče (nanogelu) je obtížná reprodukovatelnost celého procesu, protože polymerní materiál (nanogel) není přesně

55

definován. Dále je z publikované práce (Vinogradov et al., 2005a) zřejmé, že fluorescenčně značený NTP je lokalizován především mimo buněčné jádro, tj. tento způsob transportu není vhodný v případech, kdy má dojít k inkorporaci do genomické DNA, ke které dochází právě v jádře.

5

Jiný nedávno publikovaný způsob řešení problému neprostupnosti NTP přes buněčnou membránu spočívá v přípravě nukleosidtrifosfátů modifikovaného diestery na γ -fosfátu, který je poté po proniknutí do cytosolu enzymaticky štěpen (Gollnest et al., 2015). Jedná se tedy o "prodrug" přístup se všemi specifiky a nutností optimalizace struktury pro každý jednotlivý případ aplikace.

10

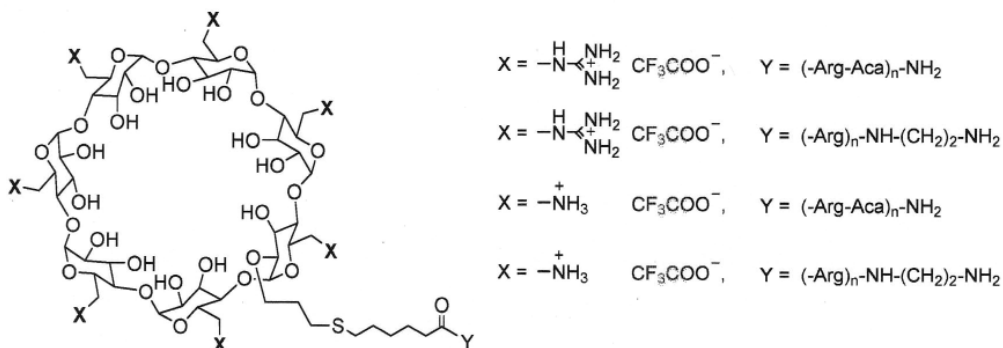
Podstata vynálezu

Předmětem tohoto vynálezu jsou sloučeniny (transportéry), které jsou schopny tvořit definované komplexy s NTP prostřednictvím nekovalentních interakcí s receptorem NTP (cyklodextrinovou jednotkou) a transportovat je přes buněčnou membránu do cytosolu. V něm jsou modifikované nukleosidtrifosfáty uvolněny kompetitivním vytěsněním přirozenými NTP, zejména adenosin trifosfátem, který se v cytosolu nachází až v milimolárních koncentracích, tj. o několik řádů vyšších, než je předpokládaná žádoucí koncentrace modifikovaného NTP v cytosolu (mikromolární koncentrace). Uvolněný NTP se – v závislosti na fázi buněčného cyklu – rychle, v řádu minut, koncentruje v cytosolu i buněčném jádru, kde může působit jako inhibitor RNA, resp. DNA polymeráz. Za předpokladu, že je substrátem příslušného enzymu (polymerázy), může být popřípadě inkorporován do RNA nebo DNA. Novost popisovaného řešení spočívá v jednoduchosti a univerzálnosti jeho použití pro jakýkoliv nukleosidtrifosfát bez nutnosti jeho dalších chemických modifikací, protože podstatou interakce NTP a "vazebného místa" v transportéru je nekovalentní interakce jakékoliv trifosfátové skupiny s cyklodextrinovou jednotkou modifikovanou aminoskupinami, popř. guanidinoskupinami. Výhodou popisovaného způsobu transportu NTP je možnost připravit komplex transportéru a NTP odvozeného od jakéhokoliv nukleosidu, a ten velmi rychle dopravit do buněčného cytosolu a jádra. Není nutné připravovat od každého NTP série "prodrug" derivátů, jejichž enzymaticky katalyzované štěpení na volný NTP v buňce závisí na strukturních parametrech, které nelze spolehlivě předpovědět.

35

Komplex NTP a transportéru se připraví rozpuštěním NTP a transportéru v médiu, jehož složení je uvedeno dále, a přímo se aplikuje na buněčnou kulturu po dobu minut až několika desítek minut.

Předmětem vynálezu je sloučenina obecného vzorce 6,



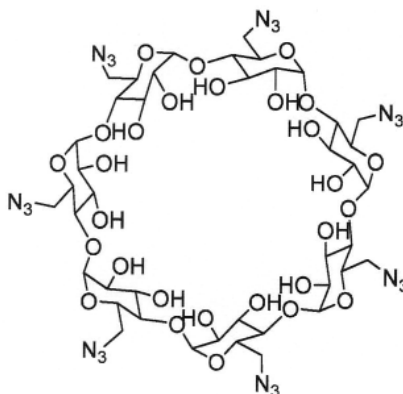
40

(6)

kde X je $-\text{NH}-\text{C}(\text{NH}_2)=\text{N}^+\text{H}_2 \text{CF}_3\text{COO}^-$ nebo $-\text{N}^+\text{H}_3 \text{CF}_3\text{COO}^-$ a Y je lineární oligomer sestávající z argininových jednotek $(-\text{Arg})_n-\text{NH}_2$, kde $n = 6$ až 10 , nebo z arginin-aminokapronových jednotek zakončený aminodimethylenamidovou jednotkou $(-\text{Arg}-\text{Aca})_n-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-\text{NH}_2$, kde $n = 6$ až 10 .

5

Předmětem vynálezu je také způsob přípravy látek, jehož výchozí sloučeninou je sloučenina heptakis(6-azido-6-deoxy)- β -cyklodextrin vzorce 1

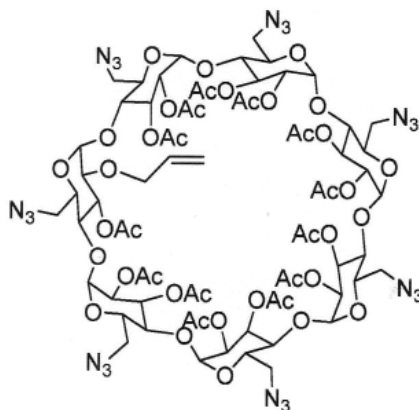


(1)

10

Tato sloučenina je působením allylbromidu a hydridu sodného v dimethylformamidu a následnou separací převedena na směs 2¹-O-allyl-heptakis(6-azido-6-deoxy)- β -cyklodextrinu a 3¹-O-allyl-heptakis(6-azido-6-deoxy)- β -cyklodextrinu. Směs je působením acetanhydridu, N,N'-diisopropylethylaminu a N,N'-dimethylaminopyridinu acetylována a po chromatografické separaci je izolována sloučenina strukturního vzorce 2

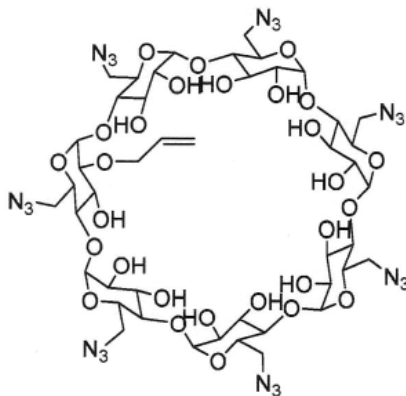
15



(2)

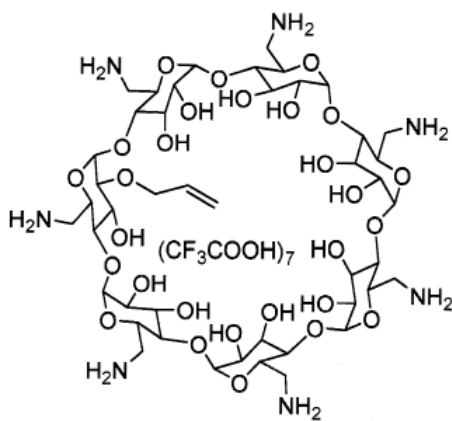
20

Sloučenina 2 je v dalším kroku deacetylována působením methanolátu sodného v bezvodém methanolu. Produktem je 2¹-O-allyl-heptakis(6-azido-6-deoxy)- β -cyklodextrin vzorce 3



(3)

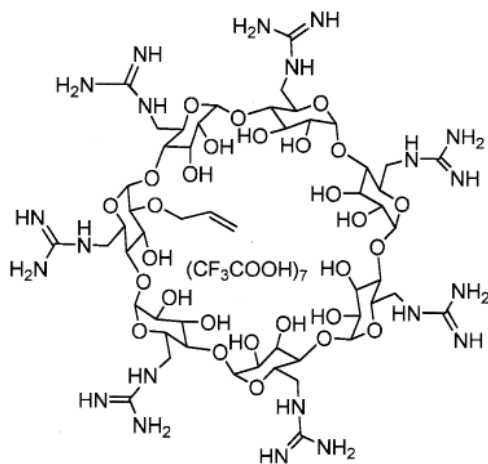
Sloučenina 3 je působením trifenylofosfinu a vodného amoniaku v rozpouštědle
 5 dimethylformamidu převedena na sloučeninu 2¹-O-allyl-heptakis(6-amino-6-deoxy)-β-
 "cyklodextrin heptakis(trifluoracetát) strukturního vzorce 4



(4)

10

Derivát 4 je působením 1H-pyrazol-1-karboxamidu hydrochloridu převedena na 2¹-O-allyl-
 heptakis(6-guanidino-6-deoxy)-β-cyklodextrin heptakis(trifluoracetát) strukturního vzorce 5

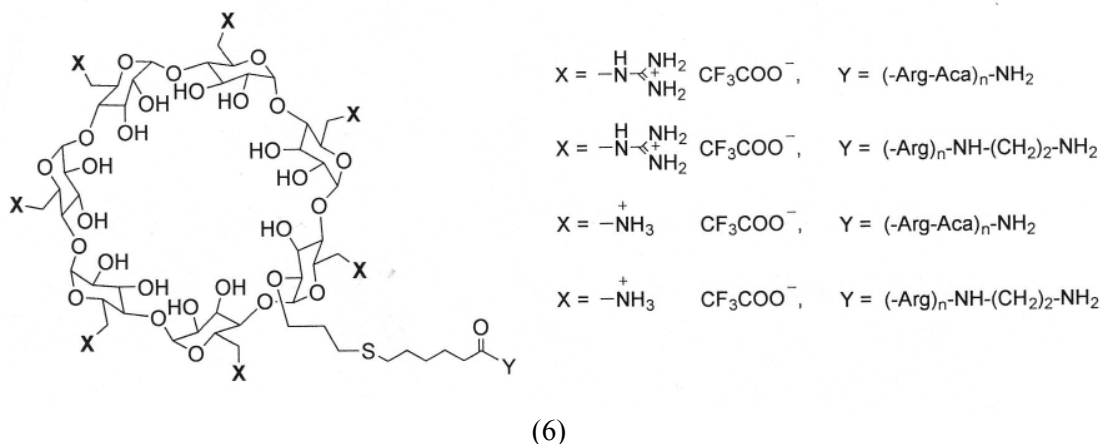


(5)

15

Látky 4 a 5 byly působením světla o vlnové délce 365 nm, fotoiniciátoru 2,2-dimethoxy-2-fenylacetophenonu (popř. azobisisobutyronitrilu a zahřátí) a thiolů obecného vzorce $\text{SH}-(\text{CH}_2)_5-\text{CO}-(\text{Arg})_n-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-\text{NH}_2$ a $\text{SH}-(\text{CH}_2)_5-\text{CO}-(\text{Arg}-\text{Aca})_n-\text{NH}_2$ převedeny na sloučeniny obecného vzorce 6,

5



kde X je $-\text{NH}-\text{C}(\text{NH}_2)=\text{N}^+\text{H}_2 \text{CF}_3\text{COO}^-$ nebo $-\text{N}^+\text{H}_3 \text{CF}_3\text{COO}^-$ a Y je lineární oligomer sestávající z argininových jednotek $(-\text{Arg})_n-\text{NH}_2$, kde $n = 6$ až 10, nebo z arginin-aminokapronových jednotek zakončený aminodimethylenamidovou jednotkou $(-\text{Arg}-\text{Aca})_n-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-\text{NH}_2$, kde $n = 6$ až 10.

Předmětem vynálezu jsou dále látky obecného vzorce 6 pro použití jako nosiče NTP přes buněčné membrány, s výhodou pro účely inkorporace NTP do buněčné DNA nebo RNA. Roztok sloučeniny obecného vzorce 6 ve vodném pufru, jehož složení je uvedeno níže, se smísí s NTP tak, aby koncentrace nosiče a NTP byla vyšší než $1 \mu\text{mol}^{-1}$ a výsledný komplex je aplikován na buněčnou kulturu po dobu 1 až 60 min. Konfokální mikroskopii a cytometrií bylo prokázáno, že NTP prostupuje přes buněčnou membránu již během první minuty po expozici a koncentruje se v jádře. Monitorování v delším časovém intervalu prokázalo selektivní fluorescenci chromozomální DNA dělicích se buněk.

Předmětem vynálezu jsou dále látky obecného vzorce 6 pro použití jako nosiče nukleosidtrifosfátů přes buněčné membrány pro účely stanovení virostatické aktivity modifikovaných NTP. Buněčná kultura infikovaná virem je krátce (1 až 30 min) vystavena působení roztoku komplexu modifikovaných NTP a látek obecného vzorce 6 a poté jsou takto ošetřené buňky inkubovány dle standardních postupů. Vyhodnocení virostatické aktivity je provedeno srovnáním s kontrolním experimentem, ve kterém jev médiu přítomen standard po celou dobu inkubace. Tento postup eliminuje negativní výsledky způsobené nedostatečnou fosforylací zkoumaného nukleosidů buněčnými kinázami.

Objasnění výkresů

Obr. 1: Strukturální vzorec konjugátu 6a

Obr. 2: Strukturální vzorec konjugátu 6b

Obr. 3: Strukturální vzorec konjugátu 6c

40

Obr. 4: Strukturální vzorec konjugátu 6d

Obr. 5: a) Sledování průniku komplexu látky 6a a fluorescenčně značeného NTP (ChromaTide® Alexa Fluor® 488–5–dUTP; ThermoFisher Scientific, kat. č.: C11397) do buněk U2–OS; b) kontrolní experiment spočívající v nanesení NTP na buněčnou kulturu (ChromaTide® Alexa Fluor® 488–5–dUTP; ThermoFisher Scientific, kat. č.: C11397) bez látky 6a.

5

Obr. 6. Sledování mitózy buněk U2–OS, ve kterých bylo s pomocí látky 6b a NTP (Aminoallyl–dUTP–Cy3; Jena BioScience, kat. č. NU–803–CY3–S) dosaženo inkorporace fluorescenčního NTP do genomické DNA (světlá místa na obrázcích).

10 Obr. 7. Graf závislosti relativního množství virových částic na koncentracích látek aplikovaných na buněčnou kulturu.

Předkládaný vynález bude dále ozřejměn v následujících příkladech, na které se ovšem neomezuje.

15

Příklady uskutečnění vynálezu

Seznam zkratk:

20

ACN	Acetonitril
HRMS	Hmotnostní spektroskopie s vysokým rozlišením
MALDI	Ionizace laserem za přítomnosti matrice
NMR	Nukleární magnetická rezonance
25 NTP	Nukleosidtrifosfát
TFA	Trifluoroctová kyselina
HPLC	Vysokoučinná kapalinová chromatografie
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
LED	Světlo–emitující dioda
30 HIV	Virus lidské imunitní nedostatečnosti
Aminoallyl–dUTP – Cy3	5–(3–Aminoallyl)–2'–deoxyuridin–5'–trifosfát, nesoucí fluorescenční značku Cy3
Cy3	Cyaninový fluorofor
DMEM	Dulbeccova modifikace Eaglova média
35 TZM–bl	Linie buněk rakoviny děložního čípku
DMF	Dimethylformamide
MeOH	Methanol

Příklad 1

40

Příprava 2^{II–VII},3^{I–VII}–undeca–O–acetyl–2^I–mono–O–allyl–6^{I–VII}–hepta–azido–6^{I–VII}–hepta–deoxy–β–cyklodextrinu 2

45 K roztoku sloučeniny 1 (2 g, 1,52 mmol) v bezvodém dimethylformamidu (40 ml) byl přidán hydrid sodný zbavený oleje (54,8 mg, 2,28 mmol) a reakční směs byla míchána 3 hod při teplotě místnosti pod atmosférou argonu. Poté byl do reakční směsi přikapán allylbromid (200 μl, 2,30 mmol) a směs byla ponechána reagovat dalších 12 hodin. Poté byl dimethylformamid odpařen a směs produktů přečištěna sloupcovou chromatografií (silikagel, chloroform methanol 4:1); izolována byla frakce obsahující isomery 2^I–O–allyl–heptakis(6–azido–6–deoxy)–β–cyklodextrin a 3^I–O–allyl–heptakis(6–azido–6–deoxy)–β–cyklodextrinu (celkem 740 mg). Tato směs (600 mg, 0,44 mmol) byla rozpuštěna v acetonitrilu (18 ml) a do roztoku byly postupně za míchání přidány acetanhydrid (1 ml, 10,57 mmol), N,N'–diisopropylethylamin (3 ml, 17,22 mmol) a N,N–dimethylaminopyridin (70 mg, 0,57 mmol). Reakční směs byla míchána 12 hodin při teplotě místnosti, poté byla odpařena na rotační odparce a odparek byl suspendován 55 v chloroformu (100 ml) a vzniklá suspenze byla promyta vodou (3 x 50 ml). Chloroformová

vrstva byla sušena síranem sodným, poté bylo sušidlo odstraněno filtrací na fritě a výsledný roztok byl zkoncentrován na objem cca 10 ml a nanesen na chromatografickou kolonu (silikagel, chloroform/aceton 5:1). Hlavní frakce obsahovala po odpaření 2¹-O-allyl-heptakis(6-azido-6-deoxy)-β-cyklodextrin 2 (702 mg, 31 %).

5

Charakterizace: HRMS (MALDI): m/z vypočteno pro C₇₁H₉₃N₂₁O₄₁: [M+Na]⁺: 1918,5730; nalezeno 1918,5758; elementární analýza (%): vypočteno pro C₇₁H₉₃N₂₁O₄₁: C 44,96; H 4,94; N 15,51; nalezeno C 44,98; H 4,92; N 15,41. ¹H a ¹³C NMR data – viz tabulky 1 a 2.

10 Příklad 2

Příprava 2¹-O-allyl-heptakis(6-azido-6-deoxy)-β-cyklodextrinu 3

Sloučenina 2 (700 mg, 0,369 mmol) byla rozpuštěna v roztoku methanolátu sodného v bezvodém methanolu (0,1 mol.l⁻¹, 70 ml). Reakční směs byla míchána při teplotě místnosti; v průběhu reakce bylo pozorováno vylučování bílé sraženiny. Po 3 hodinách byla směs odpařena dosucha, odparek rozpuštěn ve směsi methanolu a dimethylformamidu 1:1 (2 ml) a znovu přesrážen vodou (100 ml). Sraženina byla zfiltrována na fritě a sušena pod vakuem při teplotě místnosti. Sloučenina 3 byla izolována ve výtěžku 375 mg (75 %).

20

Charakterizace: HRMS (MALDI): m/z vypočteno pro C₄₅H₆₇N₂₁O₂₈ [M+Na]⁺: 1372,4357; nalezeno 1372,4362; elementární analýza (%): vypočteno pro C₄₅H₆₇N₂₁O₂₈: C 40,03; H 5,00; N 21,79; nalezeno C: 41,59; H 5,44; N 18,42. ¹H a ¹³C NMR data – viz tabulky 1 a 2.

25 Příklad 3

Příprava 2¹-O-allyl-heptakis(6-amino-6-deoxy)-β-cyklodextrin heptakis(trifluoracetátu) 4

K roztoku sloučeniny 3 (70 mg, 0,05 mmol) v dimethylformamidu (1,4 ml) byl přidán trifenylofosfin (190 mg, 0,72 mmol). Po 2 hodinách byl do reakční směsi přidán roztok amoniaku ve vodě (0,5 ml 25% roztoku) a směs byla dále míchána po dobu 16 hod. Poté se rozpouštědlo odpaří a do vzniklého hustého sirupu byl přidán acetone (20 ml). Vzniklý bílý precipitát byl izolován filtrací na fritě a poté suspendován v směsi methanolu (1,5 ml) a amoniaku (1,5 ml). Směs byla poté zahřívána v tlakové zkumavce na 60 °C po dobu 6 hod. a poté odpařena za sníženého tlaku. Odparek byl rozpuštěn ve vodném 0,01% roztoku trifluoroctové kyseliny a přečištěn ultrafiltrací na membráně s póry 1kDa (Ultracell; výrobce Merck Millipore) a lyofilizován. Výtěžek sloučeniny 4 je 53 mg (48 %).

35

Charakterizace: HRMS (MALDI): m/z vypočteno pro C₄₅H₆₇N₇O₂₈ [M+Na]⁺: 1190,5022; nalezeno 1190,5036; elementární analýza (%), vypočteno pro C₄₅H₆₇N₇O₂₈.7TFA.5H₂O: C 34,46; H 4,80; N 4,77; nalezeno C 34,42; H 4,80; N 4,37. ¹H a ¹³C NMR data – viz tabulky 1 a 2.

40

Příklad 4

Příprava 2¹-O-allyl-heptakis(6-guanidino-6-deoxy)-β-cyklodextrin heptakis(trifluoracetátu) 5
Sloučenina 4 (35 mg, volná báze) a 1*H*-pyrazolkarboxamidin hydrochlorid (219 mg) byly suspendovány ve směsi N,N'-diisopropylethylaminu (0,26 ml) a vody (0,26 ml). Směs byla míchána při teplotě místnosti po dobu 24 hodin, poté byly solventy odpařeny za sníženého tlaku. Odparek byl rozpuštěn ve vodném 0,01% roztoku trifluoroctové kyseliny a přečištěn ultrafiltrací na membráně s póry 1kDa (Ultracell; výrobce Merck Millipore) a lyofilizován. Výtěžek sloučeniny 5 byl 33 mg (49 %).

50

Charakterizace: HRMS (MALDI), m/z vypočteno pro C₅₂H₉₆N₂₁O₂₈ [M+H]⁺: 1462,6728; nalezeno 1462,6758; elementární analýza (%), vypočteno pro C₆₆H₁₀₂F₂₁N₂₁O₄₂.7TFA.6H₂O C; 33,47; H; 4,85; F; 16,84; N; 12,42; O; 32,42 ¹H a ¹³C NMR data – viz tabulky 1 a 2.

55

Příklad 5

Syntéza konjugátu 6a (Obr. 1)

5 2,2-Dimethoxy-2-fenylacetofenon (0,89 mg), thiol $\text{SH}-(\text{CH}_2)_5-\text{CO}-(\text{Arg}-\text{Aca})_8-\text{NH}_2$ (44,90 mg; připraven standardní peptidovou syntézou na pevné fázi s použitím automatického syntetizátoru ABI 433A, Applied Biosystems) a sloučenina vzorce 5 (34,7 mg) byly rozpuštěny v směsi DMF/MeOH (9:2). Směs byla rozmíchána pomocí ultrazvuku a dále míchána magnetickým míchadlem pod inertní atmosférou argonu. Směs byla periodicky ozařována UV zářením o vlnové délce 365 nm generovaném LED diodou (1 W) za stálého míchání po dobu 1 min, poté byla směs ponechána stát po dobu 20 min; celý proces byl opakován 6krát. Reakční směs byla monitorována pomocí HPLC po každém ozařovacím cyklu. Po ukončení reakce byl produkt sražen 10 ml AcOEt, odsát na fritě a promyt ethylacetátem (3 x 0,5 ml). Surový produkt byl vysušen, poté rozpuštěn v 15% ACN ve vodě a zlyofilizován. Sloučenina byla čištěna pomocí HPLC na koloně Phenomenex Gemini 5 μm NX-C18 250 x 21,2 mm (výrobce Phenomenex®); lineární gradient A a B: 7–18% B za 14 min, 100% B v 15 min; 14 ml/min; 25 °C; kde A byl 0,02% roztok TFA ve vodě, B byl 100% ACN. Výtěžek sloučeniny: 27,8 mg (36 %).

Charakterizace: HRMS (MALDI): pro $\text{C}_{154}\text{H}_{293}\text{N}_{62}\text{O}_{45}\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ vypočteno 3763,226; nalezeno 3763,231; analytické HPLC: kolona ZORBAX Poroshell 120 SB-C18; 3 x 50 mm (výrobce Agilent); 2,7 μm ; lineární gradient A a B: 0,5% B 0–1 min, poté lineární gradient do 22% B během 10 min; 1 ml/min; 25 °C; kde A byl 0,05% roztok TFA ve vodě, B byl 100% ACN. Retenční čas sloučeniny 6a = 8,6 min.

25 Příklad 6

Syntéza konjugátu 6b (Obr. 2)

30 2,2-Dimethoxy-2-fenylacetofenon (0,12 mg), thiol $\text{SH}-(\text{CH}_2)_5-\text{CO}-(\text{Arg})_8-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-\text{NH}_2$ (2,32 mg; připraven standardní peptidovou syntézou na pevné fázi s použitím automatického syntetizátoru ABI 433A, Applied Biosystems) a sloučenina vzorce 5 (5,58 mg) byly rozpouštěny v DMF/MeOH (1:5). Sloučenina byla připravena obdobně jako sloučenina 6a. Výtěžek 1,60 mg (36 %).

35 Charakterizace: HRMS (MALDI): pro $\text{C}_{108}\text{H}_{210}\text{N}_{55}\text{O}_{37}\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ vypočteno 2901,596; nalezeno 2901,595; analytické HPLC: kolona ZORBAX Poroshell 120 SB-C18; 3 x 50 mm (výrobce Agilent); 2,7 μm ; lineární gradient A a B: z 5% B do 20% B během 5 min; 1 ml/min; 25 °C; kde A byl 0,02% roztok TFA ve vodě, B byl 100% ACN. Retenční čas sloučeniny 6b = 2,6 min.

40 Příklad 7

Syntéza konjugátu 6c (Obr. 3)

45 2,2-Dimethoxy-2-fenylacetofenon (0,84 mg), thiol $\text{SH}-(\text{CH}_2)_5-\text{CO}-(\text{Arg}-\text{Aca})_8-\text{NH}_2$ (29,3 mg; připraven standardní peptidovou syntézou na pevné fázi s použitím automatického syntetizátoru ABI 433A, Applied Biosystems) a sloučenina vzorce 4 (44,1 mg) byly rozpouštěny v DMF/MeOH (1:1). Sloučenina byla připravena obdobně jako sloučenina 6a. Výtěžek 17,4 mg (39 %).

50 Charakterizace: HRMS (MALDI): pro $\text{C}_{147}\text{H}_{279}\text{N}_{48}\text{O}_{45}\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ vypočteno 3469,073; nalezeno 3469,070; analytické HPLC: kolona ZORBAX Poroshell 120 SB-C18; 3 x 50 mm (výrobce Agilent); 2,7 μm ; lineární gradient A a B: z 5% B do 20% B během 5 min; 1 ml/min; 25 °C; kde A byl 0,02% roztok TFA ve vodě, B byl 100% ACN. Retenční čas sloučeniny 6c = 3,7 min.

55 Příklad 8

Syntéza konjugátu 6d (Obr. 4)

- 5 2,2-Dimethoxy-2-fenylacetofenon (0,13 mg), thiol SH-(CH₂)₅-CO-(Arg)₈-NH-(CH₂)₂-NH₂ (2,22 mg; připraven standardní peptidovou syntézou na pevné fázi s použitím automatického syntetizátoru ABI 433A, Applied Biosystems) a sloučenina vzorce 4 (7,62 mg) byly rozpouštěny v DMF/MeOH (1:4). Sloučenina byla připravena obdobně jako sloučenina 6a. Výtěžek 1,38 mg (35%).
- 10 Charakterizace: HRMS (MALDI): pro C₁₀₁H₁₉₆N₄₁O₃₇S [M+H]⁺ vypočteno 2607,443; nalezeno 2607,448; analytické HPLC: kolona ZORBAX Poroshell 120 SB-C18; 3 x 50 mm (výrobce Agilent); 2,7 μm; lineární gradient A a B: z 5% B do 20% B během 5 min; 1 ml/min; 25 °C; kde A byl 0,02% roztok TFA ve vodě, B byl 100% ACN. Retenční čas sloučeniny 6d = 2,2 min.
- 15 Tabulka 1. Chemické posuny ¹H NMR (ppm) ve spektrech sloučenin 1–5. Spektra byla pořízena při frekvenci 600 MHz.

Sloučenina (rozpuště dlo)	H-1	H-2	H-3	H-4	H-5	H-6a + H-6b
2^a (CDCl ₃)	5,092 5,063 5,015 5,012 5,009 5,007 4,845	4,794 4,760 4,757 4,746 4,732 4,725 3,251	5,290 5,259 5,248 5,234 5,225 5,221 5,155	3,74-3,59 (7)	4,00-3,92 (6) 3,83	3,65-3,51 (14)
3^b T=40°C	5,063 4,916 4,907 4,900 (2) 4,898 4,894	3,75 3,42-3,34 (6)	3,62-3,57 (7)	3,40-3,32 (7)	3,78-3,72 (7)	3,78-3,73 (7) 3,62-3,57 (7)
4^c (D ₂ O)	5,295 5,182 5,177 (2) 5,175 5,169 5,159	3,69-3,65 (6) 3,585	4,065 3,99-3,95 (6)	3,61-3,58 (7)	4,07-4,03 (7)	3,42-3,38 (7) 3,30-3,26 (7)
5^d (D ₂ O)	5,233 5,115 (3) 5,110 (2) 5,104	3,65-3,68 (6) 3,56	4,05 3,98-3,93 (6)	3,57-3,51 (7)	4,08-4,03 (7)	3,65-3,54 (7)

- 20 ^a O-CH₂-CH=CH₂: 5,75 dddd (*J*=17,3; 10,3; 5,9; 5,5; -CH=); 5,20 dq (*J*=17,3; 1,6; 1,5; 1,5) a 5,15 dq (*J*=10,3; 1,5; 1,3; 1,2; 1H; =CH₂-); 4,00 ddt (*J*=13,1; 5,9; 1,5; 1,2; 1H) a 3,92 ddt (*J*=13,1; 5,5; 1,6; 1,3; 1H; O-CH₂-); 2,041 s; 2,016 s; 2,014 s (4x); 2,007 s; 1,997 s; 1,995 s; 1,991 s; 1,988 s; 1,963 s a 1,934 s (13x OAc),
- 25 ^b O-CH₂-CH=CH₂: 5,88 ddt (*J*=17,2; 10,5; 5,9; 5,9; -CH=); 5,30 dq (*J*=17,2; 1,7; 1,6; 1,6; 1H) a 5,17 dq (*J*=10,5; 1,7; 1,2; 1,2; 1H; =CH₂); 4,31 ddt (*J*=12,7; 5,9; 1,6; 1,2; 1H) a 4,20 ddt (*J*=12,7; 5,9; 1,6; 1,2; 1H; O-CH₂-),

^c O-CH₂-CH=CH₂: 5,96 ddt (*J*=17,2; 10,3; 6,2; 6,2; -CH=); 5,38 dq (*J*=17,2; 1,5; 1,5; 1,5; 1H) a 5,31 dq (*J*=10,3; 1,5; 1,2; 1,2; 1H; =CH₂-); 4,27 dt (*J*=6,2; 1,5; 1,2; 2H; O-CH₂-),

5 ^d O-CH₂-CH=CH₂: 5,95 ddt (*J*=17,2; 10,4; 6,3; 6,3; -CH=); 5,37 dq (*J*=17,2; 1,5; 1,4; 1,4; 1H) a 5,30 dq (*J*=10,4; 1,5; 1,0; 1,0; 1H; =CH₂-); 4,25 dt (*J*=6,3; 1,4; 1,0; 2H; O-CH₂-).

Tabulka 2. Chemické posuny ¹³CMR (ppm) ve spektrech sloučenin 1–5. Spektra byla pořízena při frekvenci 151 MHz.

Sloučenina (rozpouštědlo)	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
2 ^a (CDCl ₃)	97,25	76,61	71,08	77,74	71,54 (2)	50,62
	95,88	69,44 (2)	70,11	76,48	71,41	50,56
	95,82	69,37	69,54 (2)	76,22	71,33 (2)	50,47
	95,79	69,31	69,49	76,08	71,28	50,43 (2)
	95,42	69,28	69,44	75,82	70,91	50,37
	95,37	68,88	68,11	75,52	70,58	50,24
	95,18			75,13		
3 ^b (DMSO+AcOD) T=40°C	102,35	72,37	72,83	83,94	70,55 (5)	51,54 (6)
	102,28 (3)	72,20	72,75	83,52	70,26	51,49
	102,26	72,19	72,73 (3)	83,43	70,19	
	102,14	72,16 (2)	72,69	83,40		
	100,58	72,11	72,65	83,38		
		71,92		83,36		
			79,51			
4 ^c (D ₂ O)	104,18	81,28	74,86	85,37	70,54	42,56
	104,13	74,44	74,81	84,45 (3)	70,52	42,50 (4)
	104,12	74,38 (2)	74,80	84,42	70,51	42,36 (2)
	104,11	74,34	74,49	84,40	70,49 (2)	
	104,09	74,33	74,76	84,37	70,28	
	103,99	74,16	74,74		70,25	
	102,66		73,95			
5 ^d (D ₂ O)	104,62	81,51	75,15 (5)	85,90	74,19	44,92 (7)
	104,55	74,49	75,14	85,37	73,60 (2)	
	104,53	74,46	75,11	85,23 (3)	73,58 (2)	
	104,50 (2)	74,44		85,21 (2)	73,45	
	104,41	74,42 (2)			73,37	
	102,90	74,26				

10

^a 13xOAc: 169,78; 169,74; 169,62; 169,58; 169,55; 169,51; 168,65; 168,47; 168,42(2); 168,40(2) a 168,13 (13x CO);

15 19,98; 19,83; 19,81; 19,79; 19,78; 19,76; 19,74 a; 19,72(6) (13xCH₃); O-CH₂-CH=CH₂: 133,11 (-CH=); 116,98 (=CH₂); 71,22 (O-CH₂-),

^b O-CH₂-CH=CH₂: 134,66 (-CH=); 118,12 (=CH₂); 72,89 (O-CH₂-),

20 ^c O-CH₂-CH=CH₂: 135,76 (-CH=); 122,53 (=CH₂); 75,95 (O-CH₂-); TFA: 119,12 q (*J*(C/F)=292,0; -CF₃); 165,58 q (*J*(C/F)=35,2; COOH),

^d O-CH₂-CH=CH₂: 135,74 (-CH=); 122,55 (=CH₂); 75,88 (O-CH₂-); H₂N-C(=NH)-NH-: 160,43.

25

Příklad 9

Transport nukleosidtrifosfátů nesoucího fluorescenční značku do cytosolu buněk U2–OS

5 Příprava pufru A pro aplikaci komplexů: Látky *N*-[tris(hydroxymethyl)methyl]glycin (448,14 mg), chlorid vápenatý (100,6 mg), síran horečnatý (48,8 mg), chlorid draselný (200,0 mg), glukóza (1,001 g) a chlorid sodný (3,661 g) byly postupně rozpuštěny v 497 ml deionizované sterilní vody. Kyselost vzniklého roztoku byla upravena 1 mol.l⁻¹ roztokem hydroxidu sodného na hodnotu *pH* 7,40 při teplotě 31 °C. Roztok byl doplněn do 500,0 ml.

10

Sloučenina 6a byla rozpuštěna v roztoku pufru A na koncentraci 20 μmol.l⁻¹. Nukleosidtrifosfát (ChromaTide® Alexa Fluor® 488–5–dUTP; ThermoFisher Scientific, kat. č.: C11397) byl rovněž rozpuštěn v roztoku pufru A na koncentraci 20 μmol.l⁻¹. Poté byly tyto roztoky smíchány ve stejných objemových poměrech (1:1) na finální koncentraci komplexu 10 μmol.l⁻¹. Buněčná kultura U2–OS připravená standardním způsobem s konfluencí 50 až 100% byla krátce promyta pufrům A a poté byly buňky převrstveny roztokem připraveného komplexu. Takto připravený vzorek byl ihned vložen do konfokálního mikroskopu a průnik NTP do buněčného cytosolu byl sledován v pravidelných časových intervalech. Zbarvení cytosolu a jádra bylo pozorovatelné od první minuty počátku sledování. Fluorescence byla pozorovatelná ve všech sledovaných buňkách s různou intenzitou (Obr. 5a). V kontrolním experimentu, kdy byl aplikován 10 μM roztok samotného NTP (ChromaTide® Alexa Fluor® 488–5–dUTP) bez sloučeniny 6a (Obr. 5b), nebyl pozorován průnik NTP do cytosolu, přítomnost NTP byla pozorována pouze v mezibuněčném prostoru.

25 Příklad 10

Sledování inkorporace značeného NTP (Aminoallyl–dUTP–Cy3, Jena Bioscience) do DNA buněk U2–OS

30 Komplex sloučeniny 6b a NTP (Aminoallyl–dUTP–Cy3, Jena BioScience, kat. č. NU–803–CY3–S) v pufru A v konečné koncentraci 40 μmol.l⁻¹ byl nanesen na buněčnou kulturu TZM–bl a inkubován po dobu 10 minut. Poté byl roztok komplexu z buněk odsát a buňky byly převrstveny médiem (DMEM) obsahujícím sérum a dále inkubovány při 37 °C po dobu 24 hod a pravidelně monitorovány konfokálním mikroskopem. Fluorescence chromozomální DNA dělicích se buněk (Obr. 6) prokazuje, že fluorescenčně značený NTP byl inkorporován do genomické DNA buněk.

35

Příklad 11

Testování virostatické aktivity adefovir difosfátu 8

40

Předmětem testování byla sloučenina strukturního vzorce 8 (adefovir difosfát), která je známým (Mulato & Cherrington, 1997) aktivním metabolitem – inhibitorem reverzní transkriptázy – při inhibici replikace virové DNA virů HIV. Při stanovení aktivity trifosfátu 8 byla jako standard použita sloučenina 7 (tenofovir), která je schváleným klinicky užívaným preparátem pro léčbu HIV. Buněčná kultura TZM–bl infikovaná virem HIV byla po dobu 10 min vystavena účinku roztoku 10 μmol.l⁻¹ komplexu sloučeniny 8 a nosiče 6c v pufru A. Poté byl roztok komplexu odstraněn a infikované buňky byly převrstveny médiem se sérem a inkubovány při 37 °C. Paralelně byly provedeny kontrolní experimenty (bez infekce; infekce bez aktivní látky; 10 μmol.l⁻¹ tenofovir 7 po celou dobu inkubace; sloučenina 8 bez nosiče) Po třídní inkubaci byla pozorována virostatická aktivita sloučeniny 8, transportované pomocí sloučeniny 6c po dobu 10 min, shodná s kontrolními experimenty, kde byl roztok sloučeniny 7 přítomen v médiu po celou dobu inkubace (Obr. 7). Z tohoto pozorování lze dovodit, že sloučenina 8, pokud je aplikována ve formě aktivního metabolitu (trifosfátu) za pomoci nosiče 6c, je – vzhledem k mnohem kratší době aplikace – aktivnější, než klinicky užívané léčivo 7, zde použité jako standard.

55

Průmyslová využitelnost

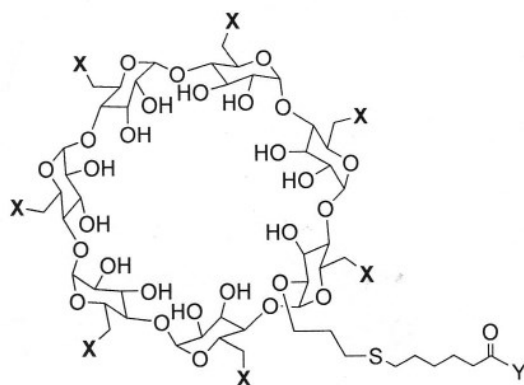
- 5 Látky obecného vzorce 6 lze využít ve farmaceutickém výzkumu při testování aktivit nových virostatik na bázi nukleosidtrifosfátů. Dále ji lze využít v molekulární a buněčné biologii pro inkorporaci značených NTP do DNA nebo RNA.

Přehled použité literatury

- 10
1. Jordheim, L. P., Durantel, D., Zoulim, F. & Dumontet, C. (2013). Advances in the development of nucleoside and nucleotide analogues for cancer and viral diseases. *Nature Reviews Drug Discovery* 12, 447–464.
 2. Hillaireau, H. & Couvreur, P. (2009). Nanoencapsulation of antiviral nucleotide analogs. *Journal of Drug Delivery Science and Technology* 19, 385–390.
 - 15 3. Vinogradov, S. V., Kohli, E. & Zeman, A. D. (2005a). Cross-linked polymeric nanogel formulations of 5'-triphosphates of nucleoside analogues: Role of the cellular membráně in drug release. *Molecular Pharmaceutics* 2, 449–461.
 4. Vinogradov, S. V., Zeman, A. D., Batrakova, E. V. & Kabanov, A. V. (2005b). Polyplex Nanogel formulations for drug delivery of cytotoxic nucleoside analogs. *Journal of Controlled Release* 107, 143–157.
 - 20 5. Gollnest, T., de Oliveira, T. D., Schols, D., Balzarini, J. & Meier, C. (2015). Lipophilic prodrugs of nucleoside triphosphates as biochemical probes and potential antivirals. *Nature Communications* 6.
 - 25 6. Mulato, A. S. & Cherrington, J. M. (1997). Anti-HIV activity of adefovir (PMEA) and PMPA in combination with antiretroviral compounds: in vitro analyses. *Antiviral Research* 36,91–97.

PATENTOVÉ NÁROKY

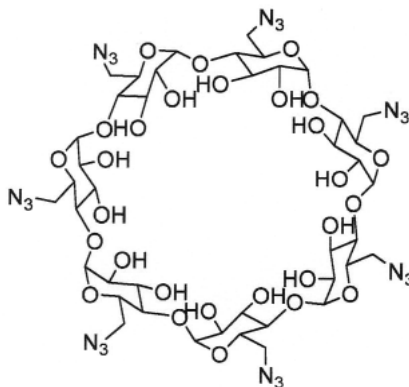
- 30 1. Sloučenina obecného vzorce 6



(6)

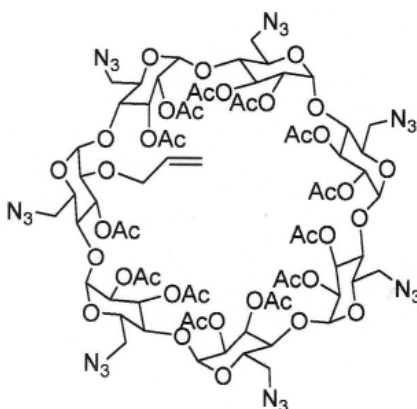
- 35 kde X je $-\text{NH}-\text{C}(\text{NH}_2)=\text{N}^+\text{H}_2$, CF_3COO^- nebo $-\text{N}^+\text{H}_3$, CF_3COO^- a Y je lineární oligomer sestávající z argininových jednotek $(-\text{Arg})_n-\text{NH}_2$, kde $n = 6$ až 10 , nebo z arginin-aminokapronových jednotek zakončený aminodimethylenamidovou jednotkou $(-\text{Arg}-\text{Aca})_n-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-\text{NH}_2$, kde $n = 6$ až 10 .
- 40

2. Způsob přípravy sloučeniny obecného vzorce 6, **vyznačující se tím**, že vychází sloučenina vzorce 1



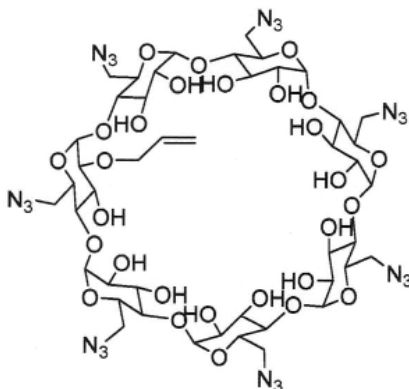
(1)

5 se převede působením allylbromidu a hydridu sodného v rozpouštědle dimethylformamidu na směs 2¹-O-allyl-heptakis(6-azido-6-deoxy)-β-cyklodextrinu a 3¹-O-allyl-heptakis(6-azido-6-deoxy)-β-cyklodextrinu; tato směs se pak působením acetanhydridu, N,N'-diisopropylethylaminu a N,N-dimethylaminopyridinu v rozpouštědle acetonitrilu při teplotě
10 místnosti acetyluje a chromatografickou separací se izoluje sloučenina strukturního vzorce 2,



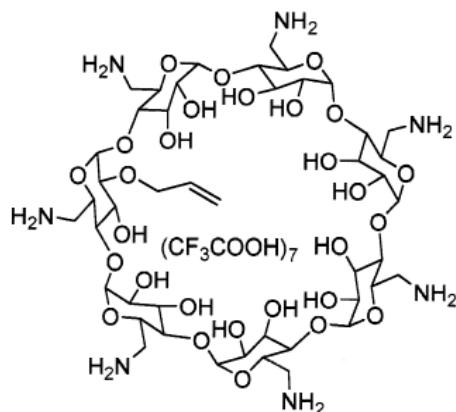
(2)

15 která se v dalším kroku deacetyluje působením methanolátu sodného v bezvodém methanolu za vzniku produktu 2¹-O-allyl-heptakis(6-azido-6-deoxy)-β-cyklodextrinu vzorce 3



(3)

z něhož se působením trifenylfosfinu a vodného amoniaku v rozpouštědle dimethylformamidu připraví sloučenina 2¹-O-allyl-heptakis(6-amino-6-deoxy)-β-cyklodextrin heptakis(trifluoracetát) strukturního vzorce 4,

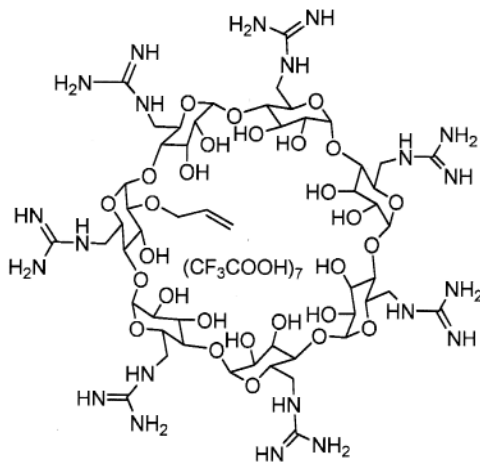


5

(4)

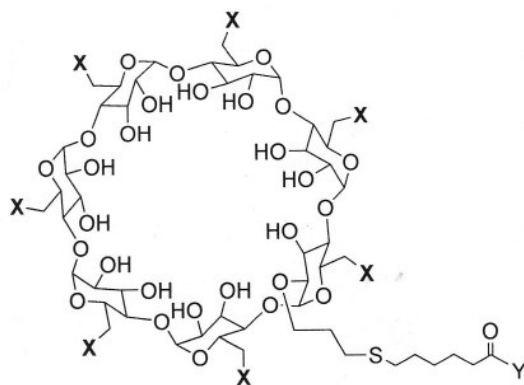
který se působením 1H-pyrazol-1-karboximidinu hydrochloridu převede na 2¹-O-allyl-heptakis(6-guanidino-6-deoxy)-β-cyklodextrin heptakis(trifluoracetát) vzorce 5

10



(5)

15 a poté se sloučeniny 4 a/nebo 5 působením světla o vlnové délce 365 nm, foto iniciátoru 2,2-dimethoxy-2-fenylacetofenonu nebo radikálového iniciátoru azobisisobutyronitrilu a thiolů obecného vzorce SH-(CH₂)₅-CO-(Arg)_n-NH-(CH₂)₂-NH₂ a SH-(CH₂)₅-CO-(Arg-Aca)_n-NH₂ převedou na sloučeniny obecného vzorce 6,



(6)

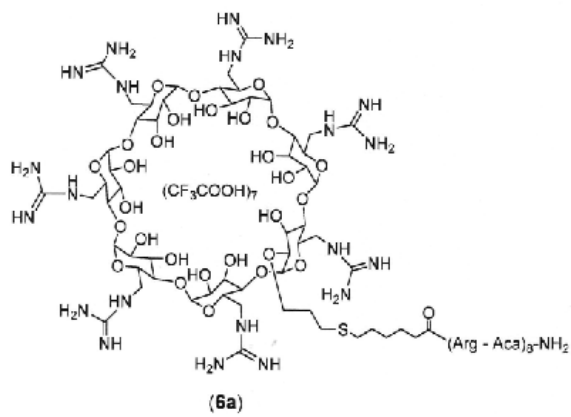
5 kde X je $-\text{NH}-\text{C}(\text{NH}_2)=\text{N}^+\text{H}_2$ CF_3COO^- nebo $-\text{N}^+\text{H}_3$ CF_3COO^- a Y je lineární oligomer sestávající z argininových jednotek $(-\text{Arg})_n-\text{NH}_2$, kde $n = 6$ až 10, anebo z arginin-aminokapronových jednotek zakončený aminodimethylenamidovou jednotkou $(-\text{Arg}-\text{Aca})_n-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-\text{NH}_2$, kde $n = 6$ až 10.

10 3. Sloučenina obecného vzorce 6 podle nároku 1 pro použití jako transportér nukleosidtrifosfátů přes buněčné membrány.

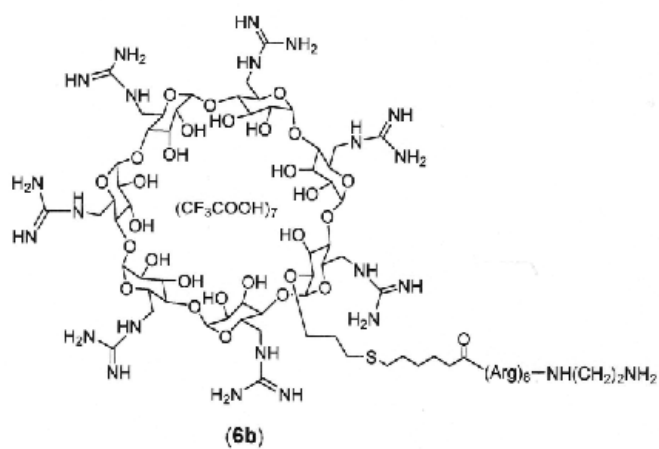
15 4. Sloučenina obecného vzorce 6 podle nároku 1 pro použití jako nosič k přenosu modifikovaných analog nukleosidtrifosfátů přes buněčné membrány pro účely inkorporace takových nukleosidtrifosfátů do buněčné deoxyribonukleové kyseliny nebo ribonukleové kyseliny.

20 5. Sloučenina obecného vzorce 6 podle nároku 1 pro použití jako nosič modifikovaných nukleosidtrifosfátů přes buněčné membrány pro stanovení virostatické anebo kancerostatické aktivity takových nukleosidtrifosfátů.

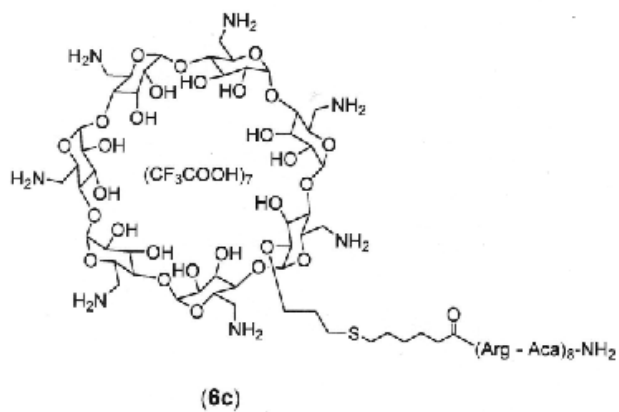
3 výkresy



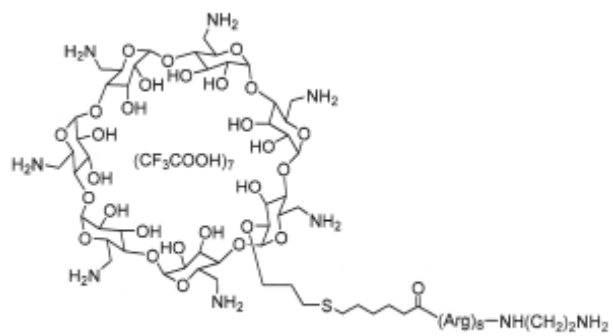
Obr. 1



Obr. 2

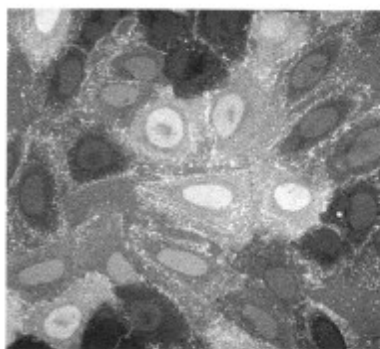


Obr. 3

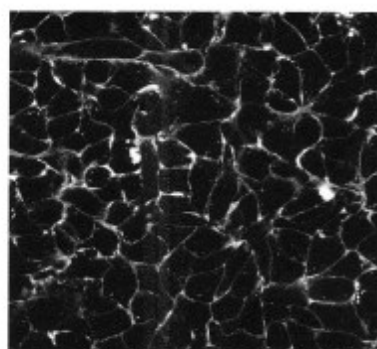


(6d)

Obr. 4

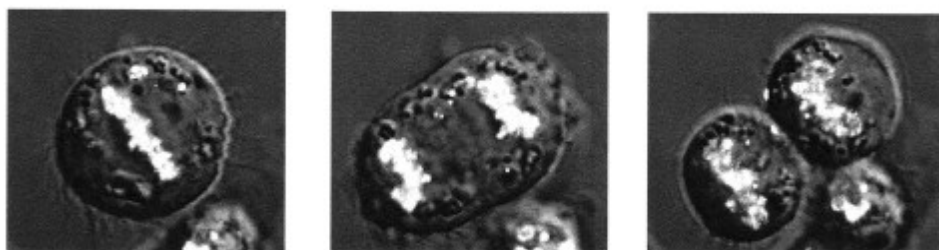


a)

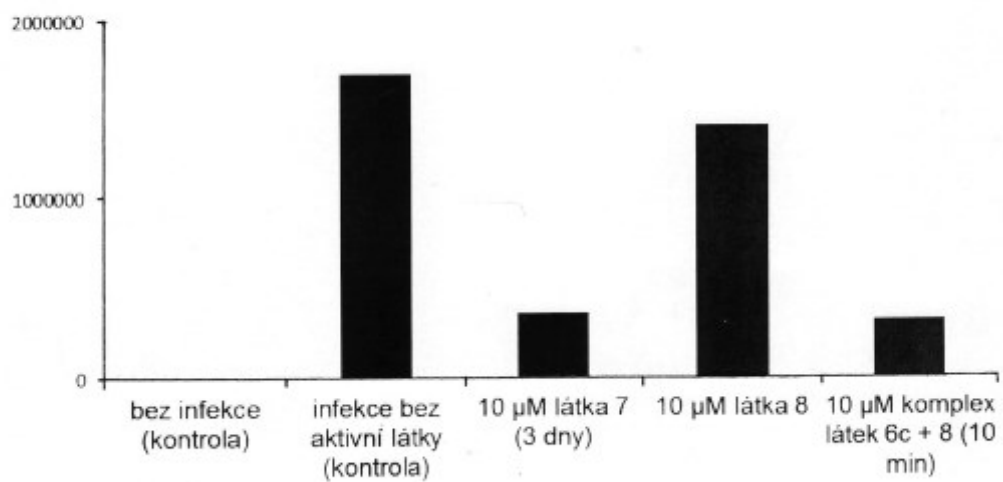
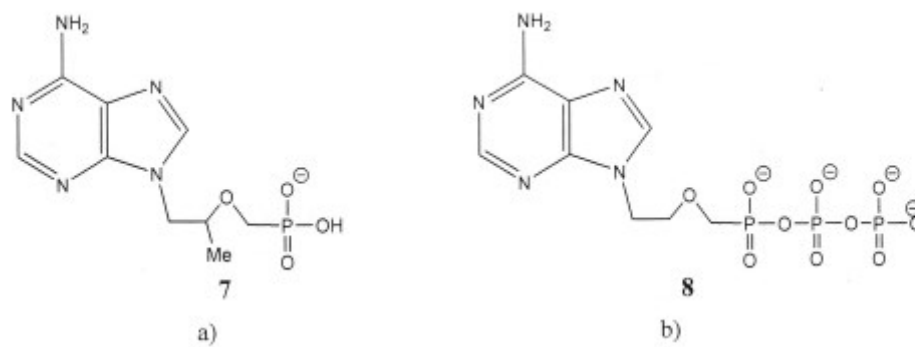


b)

Obr. 5



Obr. 6



Obr. 7