

C07C 239/22 (2006.01)
A61K 9/127 (2006.01)
A61K 47/50 (2017.01)
A61K 47/69 (2017.01)

 (19)
 ČESKÁ
 REPUBLIKA

 ÚŘAD
 PRŮMYSLOVÉHO
 VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2016-685**
 (22) Přihlášeno: **03.11.2016**
 (40) Zveřejněno: **16.05.2018**
(Věstník č. 20/2018)
 (47) Uděleno: **25.07.2018**
 (24) Oznámení o udělení ve věstníku: **05.09.2018**
(Věstník č. 36/2018)

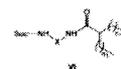
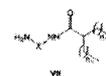
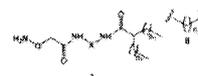
(56) Relevantní dokumenty:

WO 0248170 A1; WO 2006016097 A2; WO 2013104346 A1; WO 2014197991 A1; US 20130302891 A1; US 20120220668 A1; WO 2013181697 A1.

(73) Majitel patentu:
 Vysoká škola chemicko-technologická v Praze,
 Praha 6, Dejvice, CZ
 Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i.,
 Brno-Medlánky, CZ
 APIGENEX s.r.o., Praha 9 Hloubětín, CZ

(72) Původce:
 RNDr. Miroslav Ledvína, CSc., Praha 8, CZ
 Ing. Roman Effenberg, Čelákovice, CZ
 RNDr. Jaroslav Turánek, CSc., Brno - Lesná, CZ
 Mgr. Elissa Bartheldyová, Unín, CZ
 RNDr. Ladislav Drož, Ph.D., Praha 8, CZ

vzorce I. Acylchloridy obecného vzorce V se připraví reakcí kyselin obecného vzorce IV s oxalylchloridem v přítomnosti katalytického množství *N,N*-dimethylformamidu v organickém aprotickém rozpouštědle. Použití netoxických aminoxylipidů obecného vzorce I pro konstrukci netoxických samoskladných liposomálních nosičů léčiv prezentujících aminooxy skupiny a takzvaná "postliposomální" modifikace těchto nosičů biologicky funkčními molekulami za použití oximové ligační techniky.



(54) Název vynálezu:
Aminoxylipidy pro konstrukci samoskladných liposomálních systémů umožňujících jejich následnou modifikaci biologicky funkčními molekulami

(57) Anotace:
 Nové aminoxylipidy obecného vzorce I, kde $n_1 = 5$ až 30 a X je polymethylenová spojka obecného vzorce II, kde $n_2 = 2$ až 10, nebo polyethylenglykolová spojka obecného vzorce III, kde $n_2 = 1$ až 14. Způsob přípravy aminoxylipidů obecného vzorce I, vyznačující se tím, že acylací *N-terc*-butoxykarbonyl-polymethyldiaminu, či *N-terc*-butoxykarbonyl-polyethylenglykoldiaminu symetricky v poloze C(2) větvenou mastnou kyselinou obecného vzorce IV, v přítomnosti kondenzačního činidla nebo od kyseliny I odvozeným acylchloridem obecného vzorce V, se připraví *N*-Boc-aminolipidy obecného vzorce VI. Ty se převedou na aminolipidy obecného vzorce VII. Jejich kondenzací s kyselinou *N-terc*-butoxykarbonylaminooxyoctovou v přítomnosti kondenzačního činidla se získají *N*-Boc-aminoxylipidy obecného vzorce VIII, které debocylací poskytnou aminoxylipidy obecného

Aminoxylipidy pro konstrukci samoskladných liposomálních systémů umožňujících jejich následnou modifikaci biologicky funkčními molekulami

5 Oblast techniky

Vynález se týká nových lipidů obsahujících aminoxy skupinu s potlačenou cytotoxicitou, způsobu jejich přípravy a využití těchto látek pro konstrukci samoskladných liposomálních nosičů léčiv prezentujících aminoxy skupiny a které lze takzvaně "postliposomálně" kovalentně modifikovat biologicky funkčními molekulami nesoucími aldehydové nebo keto skupiny za použití oximové ligační techniky (vazebné páry: aminoxy skupina a aldehydová nebo keto skupina).

15 Dosavadní stav techniky

Samoskladné nanostrukturované liposomální systémy, díky své biokompatibilitě, biodegradovatelnosti, nízké toxicitě a schopnosti internalizovat látky různých fyzikálně-chemických vlastností, představují v současnosti jednu z nejhluběji prostudovaných platform pro cílený transport léčiv *in vivo*, které již nalezly řadu klinických aplikací. Pro internalizaci biologicky funkčních látek lze využít, jak vnitřní prostor, tak i jejich obálku tvořenou fosfolipidovou dvojvrstvou. Do vnitřního vodného prostoru lze enkapsulovat hydrofilní látky/terapeutika a fosfolipidová dvojvrstva umožňuje ukotvení biomolekul přes jejich hydrofobní doménu (Koudelka, Š. a spol. 2016). Posledně jmenovaného principu bylo využito při konstrukci vektorovými biomolekulami cílených liposomů a liposomálních vakcín (Marques-Gallego, P. a spol. 2014; Turánek, J. a spol. 2012). Při zabudování vektorových molekul do lipidové dvojvrstvy se uplatňují dva základní postupy, z nichž první je založen na aplikaci vektorovou molekulou modifikovaného lipidu jako kolipidu při konstrukci liposomů a druhý je založen na tzv. postliposomální modifikaci již hotových liposomů. V druhém případě je kolipidem lipid prezentující strukturní motiv umožňující ukotvit vektorovou molekulu na povrch již vytvořeného liposomu. Klasické postupy pro postliposomální modifikace jsou založeny na reakcích jako je tvorba amidové vazby, disulfidového můstku, vzájemné propojení aminů homobifunkční spojkou a adici thiolu na dvojnou C=C vazbu maleinimidu. Společnou nevýhodou těchto postupů je nízká ortogonalita (chemoselektivita) jmenovaných reakcí ve vztahu ostatním funkčním skupinám přítomným v ligované (navazované) komplexní biomolekule. Z uvedeného důvodu je v posledních letech soustředěna pozornost k vývoji tzv. bioortogonálních ligačních metod založených na chemoselektivní reakci mezi dvěma funkčními skupinami, z nichž ani jedna není přítomna v nativní biomolekule, což eliminuje tvorbu vedlejších produktů. Dalším kritériem kladeným na tyto reakce je, že by měly probíhat za mírných reakčních podmínek ve vodném prostředí, s vysokou konverzí a dostatečnou rychlostí. Pro ligační techniky splňující uvedené požadavky byl zaveden pojem "click-chemistry". Typickým představitelem "click" technik je ligace založená na jednomocnou měď katalyzované Huisgenově 1,3-dipolární cykloadici azidu na trojnou vazbu (Hassane, F. S. a spol., 2006). Problémy s použitím měďných solí v biologických systémech byl následně vyřešen vypracováním tzv. "Copper-Free Click Chemistry", kde dochází k cykloadici azidu na fluorem aktivovanou trojnou vazbu v 2,2-difluorcyklooktynovém kruhu (Baskin, J. M. a spol. 2007). Katalýzu rovněž nevyžaduje Staudingerova ligace, založená na Staudingerově redukci organických azidů na aminy působením trifenylnfosfinu. V případě Staudingerovy ligace vazebný kolipid prezentuje trifenylnfosfinový strukturní motiv nesoucí současně v *orto*-poloze jednu methoxykarbonylovou skupinu, která umožňuje následné navázání redukci vzniklého aminu amidovou vazbou (Vabbilisetty, P. a spol. 2014).

Do kategorie bioortogonálních "click" ligací náleží rovněž oximová ligace, založená na spontánní kondenzaci aminoxy skupiny s aldehydovou skupinou nebo ketoskupinou (Ulrich, S. a spol. 2014). Oximová ligace je alternativou reduktivní aminace, která nevyžaduje katalýzu. Vznikly

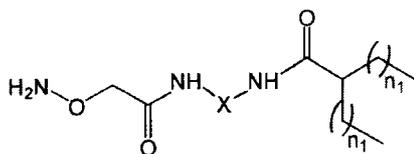
oxim s $K_D = 10^{-8}M$ je ve srovnání s iminy výrazně odolnější vůči hydrolyze. Oximová ligace probíhá za podmínek vstřícných k biologickým systémům a je ortogonální k většině funkčních skupin přítomných v biomolekulách, a to včetně aminoskupin, což z ní činí ideální ligační techniku pro postliposomální modifikace. V případě postliposomálních ligací jsou jako kationickou aminoskupinu prezentující vazebné kolipidy popsány jednořetězcové aminoxylipidy s hydrofobní doménou tvořenou lineárním uhlovodíkovým řetězcem (Tang, L. **2015**), dvouřetězcové amiaminoxylipidy s hydrofobní doménou založenou na symetrických lipofilních di-*O*-acyl- resp. di-*O*-alkylderivátech glycerolu a na symetrických sekundárních dialkylamidech aminokyselin (Liu, Y. a spol. **2007**; Miller, A. D. a spol. **2005**). Specifickou skupinou jsou a aminoxylipidy jejichž hydrofobní doména je tvořena planárním polycyklickým cholesterolem připojeným k kationické doméně přes uretanovou spojku (Miller, A.D. a spol. **2005**; Carmona, S. a spol. **2009**).

Celková geometrie hydrofobní domény kationického aminoxylipidu má zásadní vliv na utváření strukturních fází v roztoku a stabilitu lipidové dvojvrstvy. Dvouřetězcové kationické lipidy jsou strukturně bližší dvouřetězcové hydrofobní doméně fosfolipidů a ve vodném roztoku se samouzavírají do sférických liposomů, čímž lépe vytváří lipidové dvojvrstvy ve srovnání s jednořetězcovými. Naproti tomu kationické lipidy s jedním řetězcem mají zvýšenou tendenci vytvářet micely resp. reverzní micely (Niculescu-Duvaz, D. a spol. **2003**; Tsukamoto, M. a spol. **1995**). Charakter hydrofobní domény má rovněž vliv na toxicitu. Kationické lipidy, jejichž hydrofobní doména je tvořena lipofilními acylovými zbytky, jsou vzhledem k jejich biodegradovatelnosti obecně méně toxické, než kationické lipidy s hydrofobní doménou založenou na lipofilních alkylových řetězcích (Leventis, R. a spol. **1990**; Lv, H. a spol. **2006**). Ve vztahu k uvedenému se jeví jako velice atraktivní dvouřetězcová lipofilní doména založená na synteticky dobře dostupných, v poloze C(2) symetricky větvených mastných kyselinách, která byla úspěšně aplikována v případě designu nových polykationických lipidů jako kompozit pro konstrukci polykationických liposomálních transfekčních systémů (Korvasova, Z. a spol. **2012**; Drašar, L. a spol. **2013**; Czech. Pat. A PCT appl., Drašar, L. a spol. **2016**, US 9393200 B2). V případě sudého počtu atomu uhlíku v jejich alkylových řetězcích jsou tyto kyseliny v organismu odbouratelné β -oxidací, tj. stejně jako biogenní mastné kyseliny se sudým počtem uhlíkových atomů.

Podstata vynálezu

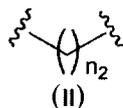
Vynález použitím synteticky dobře dostupných, vůči solvolytické degradaci stabilních a metabolizovatelných v poloze C(2) symetricky větvených mastných kyselin jako hydrofobní domény v předmětných aminoxylipidech řeší problém: (a) syntetické náročnosti kationických aminoxylipidů obsahujících dvě symetrické alifatické hydrofobní domény, založené na symetrických lipofilních diacylderivátech a dialkylderivátech glycerolu jakož i na symetrických sekundárních dialkylamidech aminokyselin; (b) limitované stability diacylderivátů glycerolu a uretanové spojky v případě lipopolyaminů odvozených od cholesterolu; (c) problém odbourávání aminoxylipidů jejichž hydrofobní doména je tvořena lineárními *O*- a *N*-alkylovými řetězci.

Předmětem vynálezu jsou aminoxylipidy obecného vzorce **I**



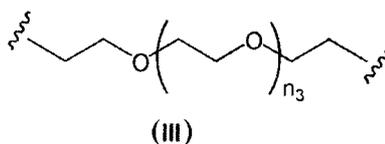
(I)

Kde $n_1 = 5$ až 30 a X je polymethylenová spojka obecného vzorce **II**



kde $n_2 = 2$ až 10

5 nebo polyethylenglykolová spojka obecného vzorce III



kde $n_3 = 1$ až 14

10

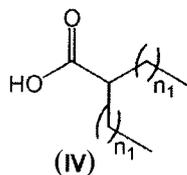
Dále je význakem vynálezu, že aminoxylipidy obecného vzorce I mají s výhodou $n_1 = 13$ a spojku X výše zmíněného obecného vzorce II, kde je $n_2 = 2$ či $n_2 = 3$.

15 Význakem vynálezu je také skutečnost, že aminoxylipidy obecného vzorce I mají s výhodou $n_1 = 13$ a spojku X výše zmíněného obecného vzorce III, kde je $n_3 = 1$.

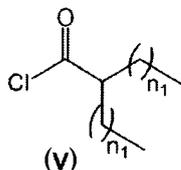
Předmětem vynálezu je rovněž způsob přípravy aminoxylipidů obecného vzorce I.

20

Symetricky v poloze C(2) větvené mastné kyseliny obecného vzorce IV



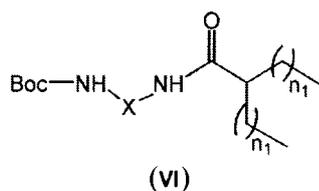
25 kde $n_1 = 5$ až 30 (dostupné postupem podle lit. Kusumoto, S. a spol. 1978) se převedou reakcí s oxalylchloridem v přítomnosti katalytického množství *N,N*-dimethylformamidu v organickém aprotickém rozpouštědle (s výhodou v dichlormethanu) na jejich acylchloridy obecného vzorce V



30 kde $n_1 = 5$ až 30.

35

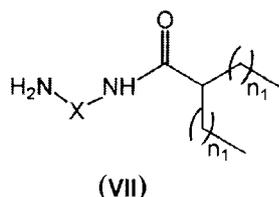
Kondenzací výše uvedených acylchloridů obecného vzorce V s komerčně dostupnými *N-tert*-butoxykarbonyl-polymethylendiaminy $\{(CH_3)_3C-O-(C=O)-HN-(CH_2)_n-NH_2, n = 2$ až 13}, či *N-tert*-butoxykarbonyl-polyethylenglykoldiaminy $\{(CH_3)_3C-O-(C=O)-HN-(CH_2)_2-[O-(CH_2)_n-O-(CH_2)_2-NH_2, n = 1$ až 14} v přítomnosti organické báze v organickém aprotickém rozpouštědle (s výhodou v přítomnosti *N,N*-diisopropylethylaminu v dichlormethanu) se připraví aminolipidy obecného vzorce VI



kde $n_1 = 5$ až 30 a X je polymethylénová spojka výše uvedeného obecného vzorce **II** nebo polyethylenglykolová spojka výše uvedeného obecného vzorce **III**.

5

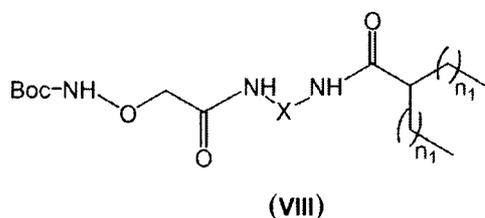
Hydrolytickým odštěpením *N-terc*-butoxykarbonylové chránicí skupiny (tzv. debocylací) látek obecného vzorce **VI** (s výhodou za použití kyseliny trifluoroctové v dichlormethanu) se získají aminolipidy obecného vzorce **VII**



10

kde $n_1 = 5$ až 30 a X je polymethylénová spojka výše uvedeného obecného vzorce **II** nebo polyethylenglykolová spojka výše uvedeného obecného vzorce **III**.

15 *N,N*-Diisopropylkarbodiimidem promotovanou kondenzací *N-terc*-butoxykarbonylaminoxyoctové kyseliny s aminolipidy obecného vzorce **VII** se připraví *N*-Boc-aminooxylipidy obecného vzorce **VIII**



20

kde $n_1 = 5$ až 30 a X je polymethylénová spojka výše uvedeného obecného vzorce **II** nebo polyethylenglykolová spojka výše uvedeného obecného vzorce **III**.

25 Hydrolytickým odštěpením *N-terc*-butoxykarbonylové chránicí skupiny látek obecného vzorce **VIII** (s výhodou za použití kyseliny trifluoroctové v dichlormethanu) se získají cílové aminooxylipidy obecného vzorce **I**.

30 Předmětem vynálezu je též použití aminooxylipidů obecného vzorce **I** pro konstrukci netoxických samoskladných liposomálních nosičů léčiv prezentujících aminooxyskupiny a jejich takzvaná "postliposomální" modifikace biologicky funkčními molekulami za použití oximové ligační techniky (vazebné páry: aminooxyskupina a aldehydová skupina nebo keto skupina).

35 Skutečnost, že při zabudování aminooxylipidů obecného vzorce **I** do liposomální dvojvrstvy liposomu nemá za následek zvýšení jeho cytotoxicity byla prokázána srovnáním cytotoxicity EPS liposomů a EPS liposomů se zabudovaným aminooxylipidem obecného vzorce **I** v *in vitro* experimentech s T-lymfocyty a buňkách H1299 nádorové linie plicního nádoru.

Schopnost samoskladných liposomálních nosičů léčiv modifikovaných aminoxylipidy obecného vzorce I kovalentně vázat biologicky funkční molekuly nesoucí aldehydové nebo keto skupiny byla prokázána navázáním:

- 5 a) kyseliny hyaluronové (8 až 15 kDa) via redukující konec její molekuly;
- b) reduktivní aminací fluoresceinem značené kyseliny hyaluronové (50 až 200 kDa) modifikované v omezeném rozsahu v poloze C-6 *N*-acetylglukosaminové podjednotky aldehydovými skupinami vygenerovanými řízenou oxidací primárních OH skupin;
- c) Mannamu;
- 10 d) aldehydovými funkčními skupinami modifikovaného proteinu, tj. z vaječného žloutku izolovaného imunoglobulinu třídy IgY modifikovaného aldehydovými skupinami vygenerovanými oxidativním štěpením jeho sacharidové části.

15 Vazba molekul typu polysacharidů (mannan, kyselina hyaluronová) na liposomy modifikované aminoxylipidy je striktně chemoselektivní a regioselektivní, tj. via redukující konec polysacharidu, což má za následek uniformní směřování molekul na povrchu liposomů obr. 11. Nahodilá vazba pomocí kroslinkerů (např. karbodiimid) nemůže vést k definované chemoselektivní a regioselektivní vazbě.

20

Objasnění výkresů

Obr. 1: SEM a TEM liposomů: SEM liposomu s navázanou kys. hyaluronovou (A); TEM liposomu s navázanou kys. hyaluronovou (barveno molybdenem amonným) (B); TEM směsi liposomu s navázanou kys. hyaluronovou a nemodifikovaných liposomu (barveno molybdenem amonným). Modifikované liposomy (černé šipky), nemodifikovaný liposom (bílá šipka) (C); SEM nemodifikovaného liposomu (D); TEM nemodifikovaného liposomu (E).

30

Obr. 2: KryoTM liposomů s HA navázanou pomocí oximové ligace

Obr. 3: Hodnoty distribuce velikosti liposomu s 1 % aminoxylipidem obecného vzorce I (dle příkladu 14) a stejných liposomu s navázaným IgY. Distribuce je vyjádřena v počtech částic v třídě dané velikosti: 107 nm pro samotné liposomy; 126 nm pro liposomy s IgY; 9 nm pro IgY.

35 Obr. 4: TEM liposomů s 1% aminoxylipidem obecného vzorce I (dle příkladu 14) (a) a liposomů s navázaným IgY (b): šipky označují povrchově vázané molekuly IgY na povrchu liposomu. Zřetelný je i tvar a orientace molekul IgY (insert).

40 Obr. 5: Distribuce velikosti prázdných vs. manosylovaných liposomu: velikost prázdných liposomů je 145 nm, velikost mannanu 6 nm. Velikost manosylovaných liposomů je 155 nm, došlo k zvětšení o 10 nm.

45 Obr. 6: Modifikované a nemodifikované liposomy zobrazené pomocí transmisní (TEM) a skanovací (SEM) elektronové mikroskopie: nemodifikovaný liposom zobrazený pomocí TEM (vlevo), liposom s navázaným mannanem zobrazený pomocí TEM (uprostřed), liposom s navázaným mannanem zobrazený pomocí SEM (vpravo).

50 Obr. 7: Snímky z konfokálního mikroskopu: barvení jádra (vlevo nahoře); barvení povrchového HLA-DR antigenu (vpravo nahoře); manosylované liposomy (vlevo dole); spojení všech 3 obrázků (vpravo dole).

Obr. 8: Množství kyseliny hyaluronové v jednotlivých frakcích po dělení gelovou chromatografií, detekováno fluorimetricky.

Obr. 9: Srovnání signálu na Flow cytometru: tečkované samotné buňky, čárkované buňky po přidavku prázdných liposomu, plná čára fluorescence buněk ošetřených liposomy s navázanou kyselinou hyaluronovou.

5 Obr. 10: Srovnání navázání prázdných vs. modifikovaných liposomu na povrch H1299 po 15 minutách a 24 hodinách.

Přehled tabulek

10 Tab. 1: Počet apoptotických buněk v jednotlivých vzorcích

Tab. 2: Stimulace dendritických buněk manosylovanými liposomy a srovnání s LPS: manosylované liposomy stimulují dendritické buňky ve srovnatelném rozsahu jako standard LPS.

15

Příklady uskutečnění vynálezu

Seznam zkratk

20	NMR	nukleární magnetická rezonance
	ESI-MS	hmotnostní spektrometrie s ionizací elektrosprejem
	FAB-MS	hmotnostní spektrometrie s ionizací urychlenými atomy
	HR-MS	hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením
	HA	kyselina hyaluronová
25	EPC	vaječný fosfatidyl cholin (viz EPC liposomy)
	Buňky H1299	linie buněk plicního nádoru H1299
	TEM	transmisní elektronová mikroskopie
	SEM	scannovací elektronová mikroskopie
	DLS	dynamický rozptyl světla
30	PBS	20mM fosfátový pufr, 0,14M NaCl, pH 7,2
	DOPE	1,2-dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-fosfoethanolamin

Příklad 1

35

K míchané suspenzi kyseliny 2-tetradecylhexadekanové **IV** (kde $n_1 = 13$; 1,5 g, 3,32 mmol) v dichlormethanu (50 ml) se přidá oxalylchlorid (420 mg, 6,63 mmol) a katalytické množství *N,N*-dimethylformamidu a směs se míchá 1,5 hod za laboratorní teploty. Rozpouštědlo se oddestiluje, a odparek rozpustí v benzenu (100 ml) a roztok se promyje vodou (2 x 50 ml) a nasyceným roztokem NaHCO₃ (2 x 50 ml). Po vysušení organické fáze nad bezvodým MgSO₄ a následném odpařením za sníženého tlaku se získá 1,52 g (97 %) analyticky čistého 2-tetradecylhexadekanoylchloridu **V** (kde $n_1 = 13$). Pro C₃₀H₅₉ClO vypočteno: relativní molekulová hmotnost 471,24, monoisotopická hmotnost 470,43; nalezeno ESI-MS *m/z*: 471.4 ([M+H]⁺) (25), 493.4 ([M+Na]⁺) (100), pro C₃₀H₅₉ClO (471.24) vypočteno: 76.46% C, 12.62% H, 7.52% Cl; nalezeno: 76.28% C, 12.60% H, 7.32% Cl.

45

Příklad 2

50

K míchanému roztoku 2-tetradecylhexadekanoylchloridu **V** (kde $n_1 = 13$; 0,39 g; 0,82 mmol) v dichlormethanu (25 ml) se přidá *N-terc*-butoxykarbonyl-1,2-diaminoethan-hydrochlorid ((CH₃)₃C-O-(C=O)-HN-(CH₂)_n-NH₂ · HCl, n = 2; 174 mg, 0,88 mmol) a následně *N*-ethyl-diizopropylamin (240 μl) a směs se míchá přes noc při laboratorní teplotě. Poté se ke směsi přidá dichlormethan (50 ml) a roztok se promyje vodným roztokem NaHSO₄ (5%; 2 x 15 ml) a vodou (2 x 15 ml). Organická fáze se vysuší nad bezvodým MgSO₄ a odpaří za sníženého tlaku.

55

Po chromatografii odparku na sloupci silikagelu (110 ml) v systému toluen – ethylacetát (gradient 0 až 63% ethylacetát, 14 ml/min, 64 min, naneseo v chloroformu) a následné lyofilizaci homogenní frakce z dioxanu se získá 445 mg (95% výtěžek) N^1 –(2-tetradecylhexadekanoyl)– N^2 –*terc*–butoxykarbonyl–1,2–diaminoethanu VI (kde $n_1 = 13$ a X je polymethylénová spojka obecného vzorce II, kde $n_2 = 2$). IČ spektrum (CHCl_3): $\nu=3347$ (NH), 3308 (NH), 2919, 2850, 1689 (C=O; Boc), 1645 (Amid I), 1549 (Amid II), 1535 (Amid II), 1467, 1447, 1390 (CH_3 ; Boc), 1367 (CH_3 ; Boc), 1286, 1268, 1252, 1236, 1178, 938, 864, 719 cm^{-1} . ^1H NMR spektrum (400 MHz, CDCl_3): $\sigma = 6.20$ (s, N^2H); 4.96 (s, N^1H); 3.36 (dt, $J = 4.7, 4.7$ Hz, 2H, H–1); 3.27 (dt, $J = 4.7, 4.7$ Hz, 2H, C–2); 1.99 (spt, $J = 4.7$ Hz, H–2); 1.6–1.51 (m, 2H, H–3', H–1'"); 1.43 (s, 9H, 3 x CH_3); 1.41–1.36 (m, 2H, H–3', H–1'"); 1.30–1.20 (m, 48H, 24 x CH_2); 0.87 (t, $J = 7.0$ Hz, 6H, H–16', H–14'"). ^{13}C NMR spektrum (100 MHz, CDCl_3): $\sigma = 176.94$ (C–1'), 156.87 (N^2C), 79.65 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 48.07 (C–2'), 40.50 (2C, C–1, C–2), 32.98 (2C, C–3', C–1''), 31.91 (2C, C–14', C–12''), 29.75–29.6 (m, 14C), 29.53 (2C, C–13', C–11''), 29.35 (2C, C–6', C–4''), 28.35 (3C, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 27.67 (2C, C–4', C–2''), 22.68 (2C, C–15', C–13''), 14.1 (2C, C–16', C–14''). Pro $\text{C}_{37}\text{H}_{74}\text{N}_2\text{O}_3$ vypočteno: relativní molekulová hmotnost 595,0, monoisotopická hmotnost 594,6; nalezeno ESI–MS m/z : 595.6 ($[\text{M}+\text{H}]^+$) (25), 617.6 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$) (100), 618.6 ($[\text{M}+\text{H}+\text{Na}]^+$) (30), 1212.1 ($[\text{2M}+\text{Na}]^+$) (50), 1213.1 ($[\text{2M}+\text{H}+\text{Na}]^+$) (40). HR–MS m/z : pro $\text{C}_{37}\text{H}_{75}\text{N}_2\text{O}_3$ vypočteno 595.57722, nalezeno 595.57741; pro $\text{C}_{37}\text{H}_{74}\text{N}_2\text{O}_3\text{Na}$ vypočteno 617.55917, nalezeno 617.55924.

Příklad 3

K míchanému roztoku 2–tetradecylhexadekanoylchloridu V (kde $n_1 = 13$; 0,39 g, 0,83 mmol) v dichlormethanu (25 ml) se přidá *N*–*terc*–butoxykarbonyl–1,3–diaminopropan–hydrochlorid ($(\text{CH}_3)_3\text{C–O–(C=O)–HN–(CH}_2)_n\text{–NH}_2$ HCl, $n = 3$; 186 mg, 0,88 mmol) a následně *N*–ethyl-diisopropylamin (240 μl) a směs se míchá přes noc při laboratorní teplotě. Poté se ke směsi přidá dichlormethan (50 ml) a roztok se promyje vodným roztokem NaHSO_4 (5%; 2 x 15 ml) a vodou (2 x 15 ml). Organická fáze se vysuší nad bezvodným MgSO_4 a odpaří za sníženého tlaku. Po chromatografii odparku na sloupci silikagelu (110 ml) v systému toluen – ethylacetát (gradient 0 až 42% ethylacetát, 14 ml/min, 64 min, naneseo v CHCl_3) a následné lyofilizaci z dioxanu se získá 460 mg (94% výtěžek) N^1 –(2–tetradecylhexadekanoyl)– N^3 –*terc*–butoxykarbonyl–1,3–diaminopropanu VI (kde $n_1 = 13$ a X je polymethylénová spojka obecného vzorce II, kde $n_2 = 3$). IČ spektrum (CHCl_3): $\nu=3347$ (NH), 3308 (NH), 2953, 2919, 2850, 1684 (C=O; Boc), 1644 (Amid I), 1544 (Amid II), 1526 (Amid II), 1467, 1447, 1390 (CH_3 ; Boc), 1365 (CH_3 ; Boc), 1277, 1248, 1175, 940, 870, 720 cm^{-1} . ^1H NMR spektrum (400 MHz, CDCl_3): $\sigma = 6.20$ (s, N^1H); 4.98 (s, N^3H); 3.31 (dt, $J = 6, 5.7$ Hz, 2H, H–1); 3.16 (t, $J = 5.7$ Hz, 2H, H–3); 2.04 (spt, $J = 4.7$ Hz, H–2''); 1.64–1.56 (m, 4H, H–3', H–1'', H–2); 1.44 (s, 9H, 3 x CH_3); 1.41–1.36 (m, 2H, H–3', H–1''); 1.30–1.20 (m, 48H, 24 x CH_2); 0.87 (t, $J = 7.4$ Hz, 6H, H–16', H–14'"). ^{13}C NMR spektrum (100 MHz, CDCl_3): $\sigma = 176.65$ (C–1'), 156.63 (N^3C), 79.33 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 48.09 (C–2''), 36.98 (C–1), 35.55 (C–3), 33.08 (2C, C–3', C–1''), 31.91 (2C, C–14', C–12''), 30.44 (C–2), 29.80–29.60 (m, 14C), 29.54 (2C, C–13', C–11''), 29.35 (2C, C–6', C–4''), 28.38 (3C, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 27.62 (2C, C–4', C–2''), 22.68 (2C, C–15', C–13''), 14.1 (2C, C–16', C–14''). Pro $\text{C}_{38}\text{H}_{76}\text{N}_2\text{O}_3$ vypočteno: relativní molekulová hmotnost 609,0, monoisotopická hmotnost 608,6 MS; nalezeno ESI MS m/z : 609.6, ($[\text{M}+\text{H}]^+$) (100), 631.6 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$) (100), 632.6 ($[\text{M}+\text{H}+\text{Na}]^+$) (40), 1218.2 ($[\text{2M}+\text{H}]^+$) (20), 1240.2 ($[\text{2M}+\text{H}+\text{Na}]^+$) (40). HR–MS m/z : pro $\text{C}_{38}\text{H}_{77}\text{N}_2\text{O}_3$ vypočteno 609.59287, nalezeno 609.59311; pro $\text{C}_{38}\text{H}_{76}\text{N}_2\text{O}_3\text{Na}$ vypočteno 631.57482, nalezeno 631.57487.

Příklad 4

K míchanému roztoku 2–tetradecylhexadekanoylchloridu V (kde $n_1 = 13$; 0,5 g, 1,06 mmol) v dichlormethanu (30 ml) se přidá *N*–*terc*–butoxykarbonyl–3,6–dioxo–1,8–diaminooktan ($(\text{CH}_3)_3\text{C–O–(C=O)–HN–(CH}_2)_2\text{–[O–(CH}_2)]_n\text{–O–(CH}_2)_2\text{NH}_2$, $n = 1$; 260 mg, 0,96 mmol) a

následně *N*-ethyl-diizopropylamin (310 μ l) a směs se míchá při laboratorní teplotě přes noc. Poté se přidá dichlormethan (60 ml) a roztok se promyje vodným roztokem NaHSO₄ (5%; 2 x 19 ml) a vodou (2 x 19 ml). Organická fáze se vysuší nad bezvodým MgSO₄ a za sníženého tlaku odpaří. Po Chromatografii odparku na sloupci silikagelu (110 ml) systému toluen – ethylacetát (gradient 0 až 84% ethylacetát, 15 ml/min, 44 min, nanášeno v CHCl₃) a následně lyofilizaci odparku homogenní frakce z dioxanu se získá 650 mg (90% výtěžek) *N*¹–(2–tetradecylhexadekanoyl)–*N*³–*tert*-butoxykarbonyl–1,8–diamino–2,6–dioxaoktanu **VI** (kde $n_1 = 13$ a X polyethylenglykolová spojka obecného vzorce **III**, kde $n_3 = 1$). IČ spektrum (CHCl₃): $\nu = 3364$ (NH), 3292 (NH), 2954, 2919, 2850, 1687 (C=O; Boc), 1644 (Amid I), 1552 (Amid II), 1532 (Amid II), 1466, 1391 (CH₃; Boc), 1365 (CH₃; Boc), 1282, 1255, 1178, 1137, 1115, 1034, 870, 721 cm⁻¹. ¹H NMR spektrum (400 MHz, CDCl₃): $\sigma = 7.35$ (s, N¹H); 6.04 (s, N⁸H); 3.61 (dt, $J = 4.7$ Hz, 4H, H–2, H–7); 3.55 (t, $J = 5.1$ Hz, 4H, H–4, H–5); 3.48 (dt, $J = 4.7$ Hz, 2H, H–8); 3.31 (t, $J = 5.1$ Hz, 2H, H–1); 2.05 (spt, $J = 4.7$ Hz, H–2'); 1.64–1.54 (m, 2H, H–3', H–1''); 1.45 (s, 9H, 3 x CH₃); 1.41–1.35 (m, 2H, H–3', H–1''); 1.30–1.20 (m, 48H, 24 x CH₂); 0.87 (t, $J = 7.4$ Hz, 6H, H–16', H–14''). ¹³C NMR spektrum (100 MHz, CDCl₃): $\sigma = 176.65$ (C–1), 156.11 (N⁸C), 79.54 (C(CH₃)₃), 70.38–70.11 (m, 4C, C–2, C–4, C–5, C–7), 47.85 (C–2'), 40.48 (C–8), 39.29 (C–1), 33.05 (2C, C–3', C–1''), 31.91 (2C, C–14', C–12''), 29.75–29.60 (m, 14C), 29.57 (2C, C–13', C–11''), 29.35 (2C, C–6', C–4''), 28.38 (3C, (C(CH₃)₃), 27.62 (2C, C–4', C–2''), 22.68 (2C, C–15', C–13''), 14.1 (2C, C–16', C–14''). Pro C₄₁H₈₂N₂O₅ vypočteno: relativní molekulová hmotnost 683,2, monoisotopická hmotnost 682,6; nalezeno ESI–MS m/z : 683.6 ([M+H]⁺) (10), 705.6 ([M+Na]⁺) (100), 1388.2 ([2M+H]⁺) (20), 1240.2 ([2M+Na]⁺) (15). HR–MS m/z : pro C₄₁H₈₃N₂O₅ vypočteno 683.62965, nalezeno 683.62995; pro C₄₁H₈₂N₂O₅Na vypočteno 705.61159, nalezeno 705.61178.

25 Příklad 5

Směs 2–tetradecylhexadekanové kyseliny (111 mg, 0,245 mmol), HATU (1–[bis(dimethylamino)methylen]–1H–1,2,3–triazolo[4,5–b]pyridinium–3–oxid–hexafluorofosfát) 100 mg, 0,262 mmol), *N,N*-dimethylaminopyridinu (katalytické množství) se za *vakua* (20 Pa) suší 4 hod. Aparatura se propláchne argonem a pod argonem se přidá suchý *N,N*-dimethylformamid (4 ml) a *N*-methylmorfolin (50 μ l) a vzniklý roztok se míchá při laboratorní teplotě 1 hod. K roztoku se za míchání přidá *N-tert*-butoxykarbonyl–3,6–dioxo–1,8–diaminooktan ((CH₃)₃C–O–(C=O)–HN–(CH₂)₂–[O–(CH₂)_n–O–(CH₂)₂NH₂], $n = 1$; 50 μ l, 0,242 mmol) a dichlormethan (5 ml) a v míchání se pokračuje při laboratorní teplotě přes noc. Směs se za *vakua* (20 Pa) odpaří a odparek se rozpustí v dichlormethanu (15 ml). Roztok se promyje vodným nasyceným roztokem NaHCO₃ (2 x 10 ml), vodným roztokem NaHSO₄ (5%; 2 x 10 ml) a vodou (2 x 10 ml). Organická fáze se vysuší nad bezvodým MgSO₄ a za sníženého tlaku odpaří a odparek se kodestiluje s dioxanem (3 x 10 ml). Po chromatografii odparku na sloupci silikagelu (120 ml) v systému toluen – ethylacetát (gradient 0 až 50% ethylacetát, 14 ml/min, 84 min) a následně lyofilizaci odparku homogenní frakce z dioxanu se získá 148 mg (90% výtěžek) *N*¹–(2–tetradecylhexadekanoyl)–*N*³–*tert*-butoxykarbonyl–1,8–diamino–2,6–dioxaoktanu **VI** (kde $n_1 = 13$ a X polyethylenglykolová spojka obecného vzorce **III**, kde $n_3 = 1$) identického s produktem získaným dle postupu popsaném v příkladu 4.

45 Příklad 6

Roztok *N*¹–(2–tetradecylhexadekanoyl)–*N*³–*tert*-butoxykarbonyl–1,2–diaminoethanu **VI** (kde $n_1 = 13$ a X je polymethylénová spojka obecného vzorce **II**, kde $n_2 = 2$; 420 mg, 0,71 mmol) ve směsi dichlormethanu (12 ml) a kyseliny trifluoroctové (1,5 ml) se míchá při laboratorní teplotě 3 hod. Rozpouštědla se oddestilují a odparek se kodestiluje s dichlormethanem (3 x 3 ml) a následně za *vakua* (20 Pa) suší 8 hod. Po lyofilizaci odparku z dioxanu se získá 430 mg (100% výtěžek) *N*¹–(2–tetradecylhexadekanoyl)–1–amino–2–amoniummethan–trifluoracetátu **VII** (kde $n_1 = 13$ a X je polymethylénová spojka obecného vzorce **II** kde $n_2 = 2$). Pro C₃₂H₆₆N₂O vypočteno: relativní molekulová hmotnost 494,9, monoisotopická hmotnost 494,5; nalezeno ESI–

MS m/z : 495.5 ($[M+H]^+$) (100), 517.5 ($[M+Na]^+$) (30). HR-MS m/z : pro $C_{32}H_{67}N_2O$ vypočteno 495.52479, nalezeno 495.52480.

5 Příklad 7

Roztok N^1 -(2-tetradecylhexadekanoyl)- N^3 -*terc*-butoxykarbonyl-1,3-diaminopropanu **VI** (kde $n_1 = 13$ a X je polymethylénová spojka obecného vzorce **II**, kde $n_2 = 3$; 359 mg, 0,69 mmol) ve směsi dichlormethanu (12 ml) a kyseliny trifluoroctové (1,5 ml) se míchá při laboratorní teplotě 3 hod. Rozpouštědla se oddestilují a odparek se kodesiluje s dichlormethanem (3 x 3 ml) a následně za *vakua* (20 Pa) suší 8 hod. Po lyofilizaci odparku z dioxanu se získá 430 mg (100% výtěžek) N^1 -(2-tetradecylhexadekanoyl)-1-amino-3-amoniumpropan-trifluoracetátu **VII** (kde $n_1 = 13$ a X je polymethylénová spojka obecného vzorce **II** kde $n_2 = 3$). Pro $C_{33}H_{68}N_2O$ vypočteno: relativní molekulová hmotnost 508,9, monoisotopická hmotnost 508,5; nalezeno ESI-MS m/z : 509.5 ($[M+H]^+$) (100). HR-MS m/z : pro $C_{33}H_{69}N_2O$ vypočteno 509.54044, nalezeno 509.54046.

20 Příklad 8

Roztok N^1 -(2-tetradecylhexadekanoyl)- N^3 -*terc*-butoxykarbonyl-1,8-diamino-2,6-dioxaoktanu **IV** (kde $n_1 = 13$ a X polyethylenglykolová spojka obecného vzorce **III**, kde $n_3 = 1$; 680 mg, 1 mmol) se míchá ve směsi dichlormethanu (12 ml) a kyseliny trifluoroctové (2 ml) teploty při laboratorní teplotě 3 hod. Rozpouštědla se oddestilují a odparek se kodesiluje s dichlormethanem (3 x 3 ml) a následně za *vakua* (20 Pa) suší 8 hod. Po lyofilizaci odparku z dioxanu se získá 696 mg (100% výtěžek) N^1 -(2-tetradecylhexadekanoyl)-1-amino-8-amonium-2,6-dioxaoktan-trifluoracetátu **VII** (kde $n_1 = 13$ a X polyethylenglykolová spojka obecného vzorce **III** kde $n_3 = 1$). Pro $C_{36}H_{74}N_2O_3$ vypočteno: relativní molekulová hmotnost 583,0, monoisotopická hmotnost 582,6; nalezeno ESI-MS m/z : 583.6 ($[M+H]^+$) (100), 605.6 ($[M+Na]^+$) (40). HR-MS m/z : pro $C_{36}H_{75}N_2O_3$ vypočteno 583.57722, nalezeno 583.57721; pro $C_{36}H_{74}N_2O_3Na$ vypočteno 605.55971, nalezeno 605.55905.

35 Příklad 9

K míchanému roztoku N^1 -(2-tetradecylhexadekanoyl)-1-amino-2-amoniummethan-trifluoracetátu **VII** (kde $n_1 = 13$ a X je polymethylénová spojka obecného vzorce **II** kde $n_2 = 2$; 135 mg, 0,22 mmol) v dichlormethanu (10 ml) se přidá *N,N*-dimethylaminopyridin (38 mg, 0,31 mmol), kyselina *N-terc*-butoxykarbonylaminooxyoctová (58 mg; 0,27 mmol) a diisopropylkarbodiimid (41 μ l, 0,26 mmol) a směs se míchá při laboratorní teplotě přes noc. Poté se ke směsi přidá dichlormethan (15 ml) a roztok se promyje nasyceným vodným roztokem $NaHCO_3$ (2 x 10 ml), vodným roztokem $NaHSO_4$ (5%; 2 x 10ml) a vodou (2 x 10 ml). Organická fáze se oddělí, vysuší nad bezvodným $MgSO_4$ a za sníženého tlaku odpaří. Po chromatografii odparku na sloupci silikagelu (100 ml) v systému toluen – ethylacetát (gradient 10 až 73% ethylacetát, 14 ml/min, 74 min, nanášeno v $CHCl_3$) a následně lyofilizaci odparku z dioxanu se získá 126 mg (86% výtěžek) N^1 -(2-tetradecylhexadekanoyl)- N^2 -(*N-terc*-butoxykarbonylaminoxyacetyl)-1,2-diaminoethanu **VIII** (kde $n_1 = 13$ a X je polymethylénová spojka obecného vzorce **II**, kde $n_2 = 2$). IČ spektrum ($CHCl_3$): ν =3392 (NH), 3280 (NH), 3099, 2954, 2919, 2850, 1755 (C=O; Boc), 1726 (C=O; Boc), 1707, 1645 (Amid I), 1551 (Amid II), 1467, 1447, 1390 (CH_3 ; Boc), 1368 (CH_3 ; Boc), 1283, 1253, 1234, 1164, 1105, 1048, 1014, 973, 761, 719 cm^{-1} ; 1H NMR spektrum (400 MHz, $CDCl_3$): σ = 8.23 (s, N^1H); 7.84 (s, N^2H); 6.39 (s, $NHCO_2$); 3.45 (s, 4H, H-1, H-2); 2.04 (spt, 7 = 4.7 Hz, H-2'); 1.6–1.54 (m, 2H, H-3', H-1''); 1.49 (s, 9H, 3 x CH_3); 1.43–1.35 (m, 2H, H-3', H-1''); 1.32–1.18 (m, 48H, 24 x CH_2); 0.87 (t, J = 7.0 Hz, 6H, H-16', H-14''). ^{13}C NMR spektrum (100 MHz, $CDCl_3$): σ = 177.42 (C-1'), 169.83 (N^2C), 157.71 ($NHCO_2$) 83.11 ($C(CH_3)_3$), 76.42 ($C=OCH_2O$); 48.01 (C-2'), 39.60 (2C, C-1, C-

2), 32.93 (2C, C-3', C-1"), 31.91 (2C, C-14', C-12"), 29.75–29.6 (m, 14C), 29.53 (2C, C-13', C-11"), 29.35 (2C, C-6', C-4"), 28.15 (3C, (C(CH₃)₃), 27.66 (2C, C-4', C-2"), 22.68 (2C, C-15', C-13"), 14.11 (2C, C-16', C-14"). Pro C₃₉H₇₇N₃O₅ vypočteno: relativní molekulová hmotnost 668,1, monoisotopická hmotnost 667,6; nalezeno ESI-MS *m/z*: 690.6 ([M+Na]⁺) (100), 691.6 ([M+H+Na]⁺) (40). HR-MS *m/z*: pro C₃₉H₇₈N₃O₅ vypočteno 668.59360, nalezeno 668.59363; pro C₃₉H₇₇N₃O₅Na vypočteno 690.57554, nalezeno 690.57564.

Příklad 10

10

K míchanému roztoku *N*¹-(2-tetradecylhexadecanoyl)-1-amino-3-amoniumpropan-trifluoracetátu **VII** (kde *n*₁ = 13 a X je polymethylénová spojka obecného vzorce **II**, kde *n*₂ = 3; 181 mg, 0,29 mmol) v dichlormethanu (13 ml) se přidá *N,N*-dimethylaminopyridin (50 mg; 0,41 mmol), kyselina *N-terc*-butoxykarbonylaminoxyoctová (76 mg, 0,35 mmol) a diisopropylkarbodiimid (56 μl, 0,36 mmol) a směs se míchá při laboratorní teplotě přes noc. Poté se ke směsi přidá dichlormethan (18 ml) a roztok se promyje nasyceným vodným roztokem NaHCO₃ (2 x 16 ml), vodným roztokem NaHSO₄ (5%; 2 x 16 ml) a vodou (2 x 16 ml). Organická fáze se oddělí, vysuší nad bezvodým MgSO₄ a za sníženého tlaku odpaří. Po chromatografii odparku na sloupci silikagelu (100 ml) v systému toluen – ethylacetát (gradient 10 až 73% ethylacetát, 14 ml/min, 74 min, naneseo v CHCl₃) a následné lyofilizaci odparku z dioxanu se získá 174 mg (88% výtěžek) *N*¹-(2-tetradecylhexadecanoyl)-*N*³-(*N-terc*-butoxykarbonylaminoxyacetyl)-1,3-diaminopropanu **VIII** (kde *n*₁ = 13 a X je polymethylénová spojka obecného vzorce **II**, kde *n*₂ = 3). IČ spektrum (CHCl₃): *v*=3392 (NH), 3280 (NH), 3086, 2954, 2919, 2850, 1755 (C=O; Boc), 1726 (CH₃; Boc), 1645 (Amid I), 1544 (Amid II), 1467, 1437, 1393 (CH₃; Boc), 1368 (CH₃; Boc), 1271, 1252, 1173, 1132, 1050, 1016, 984, 758, 719 cm⁻¹; ¹H NMR spektrum (400 MHz, CDCl₃): *σ* = 8.24 (s, N¹H); 8.1 (s, N²H); 6.53 (s, NHCO₂); 4.33 (dt, 2H, *J* = 6, 5.7 Hz, H-1); 3.29 (dt, 2H, *J* = 6, 5.7 Hz, H-3); 2.06 (spt, *J* = 4.7 Hz, H-2'); 1.68 (tt, 2H, *J* = 4.7, 4.7 Hz, H-2); 1.6–1.54 (m, 2H, H-3', H-1"); 1.47 (s, 9H, 3 x CH₃); 1.43–1.37 (m, 2H, H-3', H-1"); 1.32–1.18 (m, 48H, 24 x CH₂); 0.87 (t, *J* = 7.0 Hz, 6H, H-16', H-14"). ¹³C NMR spektrum (100 MHz, CDCl₃): *σ* = 176.96 (C-1'), 169.75 (N²C), 157.78 (NHCO₂) 82.89 (C(CH₃)₃), 75.95 (C=OCH₂O); 48.10 (C-2), 35.44 (C-1), 35.23 (C-3), 33.02 (2C, C-3', C-1"), 31.91 (2C, C-14', C-12"), 29.75–29.6 (m, 14C), 29.54 (2C, C-13', C-11"), 29.35 (2C, C-6', C-4"), 29.21 (C-2), 28.09 (3C, (C(CH₃)₃), 27.70 (2C, C-4', C-2"), 22.67 (2C, C-15', C-13"), 14.11 (2C, C-16', C-14"). Pro C₄₀H₇₉N₃O₅ vypočteno: relativní molekulová hmotnost 682,1, monoisotopická hmotnost 681,6; nalezeno ESI-MS *m/z*: 704.6 ([M+Na]⁺) (100), 405,6 ([M+H+Na]⁺) (40). HR-MS *m/z*: pro C₄₀H₈₀N₃O₅ vypočteno 682.60925, nalezeno 682.60931; pro C₄₀H₇₉N₃O₅Na vypočteno 704.59119, nalezeno 704.59123.

Příklad 11

K míchanému roztoku *N*¹-(2-tetradecylhexadecanoyl)-1-amino-8-amonium-2,6-dioxaokta-trifluoracetátu **VII** (kde *n*₁ = 13 a X polyethylenglykolová spojka obecného vzorce **III**, kde *n*₃ = 1; 414 mg, 0,575 mmol) v dichlormethanu (3,5 ml) se přidá *N,N*-dimethylaminopyridin (98 mg, 0,8 mmol), kyselina *N-terc*-butoxykarbonylaminoxyoctová (151 mg, 0,69 mmol) a diisopropylkarbodiimid (110 μl, 0,71 mmol) a směs se míchá při laboratorní teplotě přes noc. Poté se ke směsi přidá dichlormethan (40 ml) a roztok se promyje nasyceným vodným roztokem NaHCO₃ (2 x 35 ml), vodným roztokem NaHSO₄ (5%; 2 x 35 ml) a H₂O (2 x 35 ml). Organická fáze se oddělí, vysuší nad bezvodým MgSO₄ a za sníženého tlaku odpaří. Po chromatografii odparku na sloupci silikagelu (110 ml) v systému toluen – ethylacetát (gradient 10 až 100% ethylacetát, 14 ml/min, 74 min, naneseo v CHCl₃) a následné lyofilizaci odparku z dioxanu se získá 370 mg (85% výtěžek) *N*¹-(2-tetradecylhexadecanoyl)-*N*⁸-(*N-terc*-butoxykarbonylaminoxyacetyl)-1,8-diamino-2,6-dioxaoktanu **VIII** (kde *n*₁ = 13 a X polyethylenglykolová spojka obecného vzorce **III** kde *n*₃ = 1). IČ spektrum (CHCl₃): *v*=3392 (NH), 3292 (NH), 3090, 2954, 2919, 2850, 1756 (C=O; Boc), 1644 (Amid I), 1551 (Amid II),

1467, 1425, 1394 (CH₃; Boc), 1368 (CH₃; Boc), 1321, 1273, 1251, 1166, 1137, 1115, 1034, 980, 854,758, 721, 594 cm⁻¹; ¹H NMR spektrum (400 MHz, CDCl₃): σ = 8.07 (s, N¹H); 7.99 (s, N²H); 6.22 (s, NHCO₂); 3.62 (s, 4H, H-4, H-5); 3.59 (t, *J* = 5.4 Hz, 2H, H-7); 3.55 (t, *J* = 5.3 Hz, 2H, H-2); 3.51 (dt, *J* = 5.5 Hz, *J* = 5.3 Hz 2H, H-1); 3.45 (dt, *J* = 5.5 Hz, *J* = 5.0 Hz 2H, H-1); 2.06 (spt, *J* = 4.8 Hz, H-2); 1.6–1.54 (m, 2H, H-3', H-1"); 1.47 (s, 9H, 3 x CH₃); 1.43–1.37 (m, 2H, H-3', H-1"); 1.32–1.18 (m, 48H, 24 x CH₂); 0.87 (t, *J* = 7.0 Hz, 6H, H-16', H-14"). ¹³C NMR spektrum (100 MHz, CDCl₃): σ = 176.47 (C-1'), 168.92 (N²C), 157.56 (NHCO₂) 82.77 (C(CH₃)₃), 75.99 (C=OCH₂O); 70.28 (1C, C4); 70.25 (1C, C-5); 70.13 (2C, C-2, C-7); 47.90 (C-2'); 39.04 (1C, C-8); 38.75 (1C, C-1); 33.02 (2C, C-3', C-1"); 31.91 (2C, C-14', C-12"), 29.75–29.6 (m, 14C), 29.57 (2C, C-13', C-11"), 29.34 (2C, C-6', C-4"), 28.09 (3C, (C(CH₃)₃), 27.70 (2C, C-4', C-2"), 22.67 (2C, C-15', C-13"), 14.11 (2C, C-16', C-14"). Pro C₄₃H₈₅N₃O₇ vypočten: relativní molekulová hmotnost 742,2, monoisotopická hmotnost 741,7; nalezeno ESI-MS *m/z*: 756.6 ([M+H]⁺) (5), 778,6 ([M+Na]⁺) (100). HR-MS *m/z*: pro C₄₃H₈₆N₃O₇ vypočteno 756.64603, nalezeno 756.64616; pro C₄₃H₈₅N₃O₇Na vypočteno 778.62797, nalezeno 778.62805.

15

Příklad 12

Roztok N¹-(2-tetradecylhexadekanoyl)-N²-(*N*-*terc*-butoxykarbonylamiooxyacetyl)-1,2-diaminoethanu **VIII** (kde n₁ = 13 a X je polymethylénová spojka obecného vzorce **II**, kde n₂ = 2; 202 mg, 0,3 mmol) se míchá ve směsi dichlormethanu (8 ml) a kyseliny trifluoroctové (8 ml) při laboratorní teplotě 2,5 hod. Rozpouštědla se za sníženého tlaku oddestilují a odparek se kodestiluje s dichlormethanem (3 x 4 ml) a následně za *vakua* (20 Pa) suší 8 hod. Po lyofilizaci odparku z dioxanu se získá 200 mg (97% výtěžek) N¹-(2-tetradecylhexadekanoyl)-N²-amoniumoxyacetyl-1,2-diaminoethan-trifluoracetátu **I** (kde n₁ = 13 a X je polymethylénová spojka obecného vzorce **II**, kde n₂ = 2). Pro C₃₄H₆₉N₃O₃ vypočten: relativní molekulová hmotnost 567,9, monoisotopická hmotnost 567,5; nalezeno ESI-MS *m/z*: 575.5 ([M-NH₂+H+Na]⁺) (80), 590.6 ([M+Na]⁺) (100). HR-MS *m/z*: pro C₃₄H₇₀N₃O₃ vypočteno 568.54117, nalezeno 568.54138; pro C₃₄H₆₉N₃O₃Na vypočteno 590.52311, nalezeno 590.52322.

30

Příklad 13

Roztok N¹-(2-tetradecylhexadekanoyl)-N²-(*N*-*terc*-butoxykarbonylamiooxyacetyl)-1,3-diaminopropanu **VIII** (kde n₁ = 13 a X je polymethylénová spojka obecného vzorce **II**, kde n₂ = 3; 87 mg, 0,13 mmol) se míchá ve směsi dichlormethanu (3,5 ml) a kyseliny trifluoroctové (3,5 ml) při laboratorní teplotě 2,5 hod. Rozpouštědla se oddestilují a odparek se kodestiluje s dichlormethanem (3 x 2 ml) a následně za *vakua* (20 Pa) suší 8 hod. Po lyofilizaci odparku z dioxanu se získá 87 mg (99% výtěžek) N¹-(2-tetradecylhexadekanoyl)-N²-amoniumoxyacetyl-1,3-diaminopropan-trifluoracetátu **I** (kde n₁ = 13 a X je polymethylénová spojka obecného vzorce **II**, kde n₂ = 3). Pro C₃₅H₇₁N₃O₃ vypočteno: relativní molekulová hmotnost 582,0, monoisotopická hmotnost 581,6; nalezeno ESI-MS *m/z*: 604.4 ([M+Na]⁺) (100). HR-MS *m/z*: pro C₃₅H₇₂N₃O₃ vypočteno 582.55682, nalezeno 582.55702; pro C₃₅H₇₁N₃O₃Na vypočteno 604.53876, nalezeno 604.53892.

45

Příklad 14

Roztok N¹-(2-tetradecylhexadekanoyl)-N⁸-(*N*-*terc*-butoxykarbonylamiooxyacetyl)-1,8-diamino-2,6-dioxoaktanu **VIII** (kde n₁ = 13 a X polyethylenglykolová spojka obecného vzorce **III**, kde n₃ = 1; 345 mg, 0,13 mmol) se míchá ve směsi dichlormethanu (14 ml) a kyseliny trifluoroctové (14 ml) při laboratorní teplotě 2,5 hod. Rozpouštědla se oddestilují a odparek se kodestiluje s dichlormethanem (3 x 8 ml) a následně za *vakua* (20 Pa) suší 8 hod. Po lyofilizaci odparku z dioxanu se získá 330 mg (98% výtěžek) N¹-(2-tetradecylhexadekanoyl)-N⁸-amoniumoxyacetyl-1,8-diamino-2,6-dioxoaktan-trifluoracetátu **I** (kde n₁ = 13 a X

55

polyethylenglykolová spojka obecného vzorce **III**, kde $n_3 = 1$). Pro $C_{38}H_{77}N_3O_5$ vypočteno: relativní molekulová hmotnost 656,1, monoisotopická hmotnost 655,6; nalezeno ESI-MS m/z : 604.4 ($[M+Na]^+$) (100). HR-MS m/z : pro $C_{38}H_{78}N_3O_5$ vypočteno 656.59360, nalezeno 656.59380; pro $C_{38}H_{77}N_3O_5Na$ vypočteno 678.57554, nalezeno 678.57573.

5

Příklady provedení – povrchová modifikace liposomu a biologické aktivity

Příklad 15

10

Příprava liposomu se zabudovanými aminoxylipidy obecného vzorce **I** (dle příkladu 12, 13 a 14).

15

Metody: Liposomy se zabudovaným aminoxylipidem byly připraveny hydratací fosolipidního filmu. Lipidy byly společně rozpuštěny v chloroformu v koncentraci 10mg lipidu/1 ml chloroformu v molárním poměru 99 % EPC na 1 % aminoxylipidů obecného vzorce **I** (dle příkladu 12, 13 a 14). Chloroformový roztok byl odpařen v baňce kulovitého tvaru na vakuové rotační odparce; tlak 100 hPa, teplota vodní lázně 37 °C, otáčky 90/min). Vytvořený lipidový film byl hydratován PBS (pH 7,2, 0,14M NaCl, 20 mM Na-fosfát) na výslednou koncentraci 10 mg/ml. Liposomy byly následně extrudovány přes polykarbonátové filtry Nucleopore s velikostí pórů 400 a 100 nm. Velikost a zeta-potenciál byly stanoveny na přístroji Nanosizer ZS (Malvern, Velká Británie) včele DTS při attenuátoru 4, teplotě 25 °C.

20

25

Výsledky: zabudování *N*-aminoxylipidů obecného vzorce **I** (dle příkladu 12, 13 a 14) do liposomu nemá podstatný vliv na konečnou distribuci liposomu. Příklad s lipidem obecného vzorce **I** (dle příkladu 12): EPC liposomy: velikost 82 nm, PDI 0,11; EPC+ aminoxylipid 1 %: velikost 81 nm, PDI 0,1.

30

Aminoxylipidy obecného vzorce **I** (dle příkladu 12,13 a 14) jsou schopny s dalšími pomocnými lipidy (EPC = vaječný fosfatidyl cholin) tvořit stabilní lipidní dvojvrstvu a tudíž je lze použít na přípravu liposomu. Velikost liposomu koresponduje s velikostí pórů použitého filtru pro extruzi. Zeta potenciál liposomu obsahujících 1 % aminoxylipidu obecného vzorce **I** (dle příkladu 12, 13 nebo 14) v neutrálním pH roztoku PBS dosahuje hodnot kolem 0 mV.

35

Příklad 16

Cytotoxicita liposomu a se zabudovanými aminoxylipidy obecného vzorce **I**

40

Metody: Cytotoxicita liposomu připravených postupem popsaným v příkladu 15 se stanoví srovnáním cytotoxicity EPC liposomů a EPC liposomů se zabudovaným aminoxylipidem obecného vzorce **I** (dle příkladu 12, 13 nebo 14) *in vitro* experimentech s T-lymfocyty a na buňkách H1299 nádorové linie plicního nádoru.

45

Měření bylo provedeno na flowcytometru Fortessa (Beckton Dickinson). Apoptické buňky byly detekovány a kvantifikovány pomocí fluorescenčního barviva Annexin V (Invitrogen)

50

Ve všech experimentech bylo pracováno s 500 μ l media v jamce, obsah lipidu 100 μ g na 1 ml media. Inkubovány byly nemodifikované liposomy a postliposomálně modifikované liposomy hyaluronovou kyselinou. V experimentu 1 byly plicní nádorové buňky H1299 inkubovány 30 minut při teplotě 4 °C. V experimentu 2 byly použity T-lymfocyty, které byly inkubovány při laboratorní teplotě v rotátoru. V experimentech 3 a 4 byly použity buňky plicní nádorové linie H1299, které byly inkubovány 2 hodiny v CO₂ inkubátoru (37 °C, 5% CO₂) V pokusu 5 byly použity plicní nádorové buňky H1299, které byly 30 minut inkubovány v lednici při teplotě 4 °C.

55

Výsledky: Zabudování aminoxylipidů obecného vzorce I (dle příkladu 12,13 nebo 14) do liposomální dvojvrstvy liposomu nemá za následek zvýšení jejich cytotoxicity. Netoxičnost byla prokázána srovnáním cytotoxicity EPC liposomu a EPC liposomu se zabudovaným aminoxylipidem obecného vzorce I (dle příkladu 12, 13 nebo 14) v *in vitro* experimentech s T-lymfocyty a buňkách H1299 nádorové linie plicního nádoru.

Data jsou uvedena v tabulce (Tabulka 1).

10 Příklad 17

Příprava liposomu s navázanou HA přes redukující konec její molekuly; změna velikosti liposomu s 1% aminoxylipidem obecného vzorce I (dle příkladu 12, 13 nebo 14) po navázání HA; DLS a TEM snímky struktury liposomu s navázanou HA

15 Metody: Liposomy připravené postupem popsáním v příkladu 15, obsahující 1 % aminoxylipidu obecného vzorce I (dle příkladu 12,13 nebo 14) o výchozí koncentraci 10 mg/ml PBS, byly smíchány s HA (Mr 10440, Contipro) o koncentraci 1 mg/ml PBS v poměru 1 mg celkového lipidu na 0,1 mg HA. Inkubace probíhá minimálně 30 minut při pokojové teplotě. Nadbytečná HA byla odstraněna gelovou chromatografií na koloně Superose 6 (Pharmacia).

Měření na DLS probíhalo za stejných podmínek jako v příkladu 15.

25 Pro TEM (Philips 208S Morgagni, FEI, Czech Republic) byly preparáty barveny molybdenanem amonným (1% roztok), pro SEM (Hitachi SU 8010, Hitachi Ltd., Japan) se preparáty nebarvily a pro KryoTEM bylo použito kontrastní barvení pomocí uranyl acetátu (UO_2^{+2} ; 0.05%) vzhledem k jeho selektivní elektrostatičké vazbě na HA

Výsledky: Měření DLS

30 Kyselina hyaluronová 5 až 15 kDa: velikost 5 až 6 nm; nemodifikované liposomy: velikost 71 nm; liposomy s navázanou HA: velikost 82 nm; ζ -potenciál prázdných liposomů byl 0,4 mV, po navázání HA (Mr 10440) klesl na -4,4 mV.

35 Výsledky z TEM a SEM (Obrázek 1); patrná je kartáčová struktura tvořená lineárními vlákny HA, viz šipky.

40 Výsledky z kryoTEM (Obrázek 2); vnější vrstva HA je více kontrastní vzhledem k vazbě s UO_2^{+2} (černá šipka). Síla této vrstvy je 3.5 až 6.7 nm, což je v dobrém souladu s hydrodynamickým průměrem molekuly HA. Vnitřní vrstva (bílá šipka) reprezentuje fosfolipidovou dvojvrstvu o síle 3,7 až 4,2 nm. Zvětšení velikosti liposomu (měřeno pomocí DLS) je zhruba 7 až 12 nm, což je v dobrém souladu s daty získanými pomocí kryoTEM (bílá úsečka o délce 10 nm).

45 Příklad 18

Příprava liposomů s navázanou kyselinou hyaluronovou o Mr 391 kDa přes redukující konec její molekuly

50 Metody: Liposomy připravené postupem popsáním v příkladu 15, obsahující 1 % aminoxylipidu obecného vzorce I (dle příkladu 12, 13 nebo 14) o výchozí koncentraci 10 mg/ml PBS, byly smíchány s HA (Mr 391 kDa, Contipro) o koncentraci 1 mg/ml PBS v poměru 1 mg celkového lipidu na 0,1 mg HA. Inkubace probíhá minimálně 30 minut při pokojové teplotě. Nadbytečná HA byla odstraněna gelovou chromatografií na koloně Superose 6 (Pharmacia).

55

Výsledky: ζ -potenciál prázdných liposomů je $-0,4$ mV a po přidání HA (Mr 391 kDa) klesl na -7 mV. Nárůst velikosti liposomu modifikovaných HA je 20 nm. Snímky z TEM potvrzují navázání HA o Mr 391 kDa.

5

Příklad 19

Příprava liposomu s fluorescenčně značenou HA

10 Metody: Liposomy připravené postupem popsaným v příkladu 15, obsahující 1 % aminoxylipidu obecného vzorce I (dle příkladu 12,13 nebo 14) o výchozí koncentraci 10 mg/ml PBS, byly smíchány s HA modifikovanou FITC (Sigma–Aldrich) o koncentraci 1 mg/ml PBS v poměru 1 mg celkového lipidu na 0,1 mg HA. Inkubace probíhá minimálně 30 minut při pokojové teplotě. Nadbytečná HA byla odstraněna gelovou chromatografií na koloně Superose 6 (Pharmacia).
15 Takto připravené liposomy jsou dále použity v pokusech, kde je výhodou jejich zobrazení pomocí fluorescenčních technik (fluorescenční mikroskopie, fluorimetrie).

Příklad 20

20

Příprava liposomu s navázaným imunoglobulinem třídy IgY modifikovaným aldehydovými skupinami vygenerovanými oxidativním štěpením jeho sacharidové složky a specifická interakce liposomu s bakterií *S. aureus*

25

Metody: Liposomy připravené postupem popsaných v příkladu 15, obsahující 1 % aminoxylipidu obecného vzorce I (dle příkladu 14) o výchozí koncentraci 10 mg/ml PBS, byly smíchány s IgY aktivovaným jodistanem v PBS v poměru 1 mol aminoxylipidu na 1 mol IgY. Inkubace probíhá minimálně 30 minut při pokojové teplotě. Nadbytečný nenavázaný IgY byl odstraněn gelovou chromatografií na koloně Superose 6. Použitý IgY byl izolován ze žloutků
30 vajec od slepice imunizované usmrcenými bakteriemi *S. aureus*. Bakterie *S. aureus* byly inkubovány s fluorescenčně značeným IgY (fluorescein) z vajec imunizovaných slepic.

35

Výsledky: Rozdíl přibližně 19 nm mezi nemodifikovanými liposomy a proteoliposomy s navázaným IgY odpovídá zvětšení velikosti liposomů vlivem homogenního navázání IgY na jejich povrch, což bylo stanoveno pomocí DLS (Obrázek 3) a TEM (Obrázek 4a,b). Specifický IgY se vázal na bakterie a došlo k jejich označení; IgY nemá schopnost agregovat antigeny a proto jsou jednotlivé kroky oddělené (Obrázek 4c). Fluorescenčně značené liposomy (fluoresceinfosfatidyl ethanolamin) s navázaným specifickým IgY interagovaly s bakteriemi, došlo k jejich fluorescenčnímu označení a agregaci (Obrázek 4d). Vazba na bakterie byla
40 pozorována na fluorescenčním mikroskopu. Výsledek prokazuje, že vazba imunoglobulinů na liposomy metodou N–oxylogace zachovává jejich schopnost rozpoznat antigen, agregovat ho a zacílit terapeutikum k buňkám (např. cytostatikum) nebo bakteriím (antibiotikum). V případě bakterií je tento systém vhodný pro léčbu mastitid u dojnic.

45

Příklad 21

Vazba polysacharidů mannanu na liposomy a stimulace dendritických buněk liposomy s navázaným mannanem

50

Metody: Liposomy připravené postupem popsaným v příkladu 15, obsahující 1 % aminoxylipididu obecného vzorce I (dle příkladu 14) o výchozí koncentraci 10 mg/ml PBS, byly smíchány s roztokem mannanu v PBS v poměru 1 mg celkového lipidu na 0,1 mg mannanu. Reakce probíhala při pokojové teplotě. Nízkomolekulární komponenty a nenavázaný mannan
55 byly odstraněny gelovou chromatografií na koloně Superose 6. Průkaz vazby mannanu na povrch

liposomů byl proveden: a) skenovací a transmisní elektronovou mikroskopií; b) změna velikosti liposomů byla stanovena technikou DLS (Zetasizer ZS, Malvern UK). Polysacharid mannan byl izolován z kvasinky *Candida albicans*. Velikost molekuly mannanu a liposomů byla měřena pomocí DLS. Modifikace povrchu liposomů byla rovněž prokázána pomocí TEM a SEM.
 5 Dendritické buňky byly připraveny kultivací z periferní krve zdravých dárců. Stimulační aktivita byla srovnána s aktivitou lipopolysacharidu (LPS, standard *Salmonella minnesota*).

Výsledky: Molekula mannanu má velikost 6 nm, nemodifikované liposomy mají velikost 145 nm a liposomy s navázaným mannanem mají velikost 155 nm. Z čehož je zřejmé, že došlo ke
 10 zvětšení o 10 nm, což je v dobré korelaci s teoreticky očekávaným nárůstem o 12 nm (dvojnásobek velikosti molekuly mannanu). Distribuce velikosti je znázorněna na Obrázku 5. Molekuly vázaného mannanu jsou patrné na snímcích z elektronové mikroskopie po negativním barvení molybdenem amonným (Obrázek 6). Liposomy s navázaným mannanem si zachovávaly výraznou imunostimulační aktivitu, která byla prokázána na lidských dendritických
 15 buňkách *in vitro*. Konfokální mikroskopie prokázala interakci liposomů modifikovaných mannanem s dendritickými buňkami (DC) a internalizaci do cytoplasmy (Tabulka 2). Specifické markery aktivace dendritických buněk byly sledovány pomocí průtokové cytometrie. Interakce s DC byla zobrazena pomocí konfokální mikroskopie (Obrázek 7).

20

Příklad 22

Srovnání vazby HA na liposomy prezentující aminoxykupinu vs. liposomy prezentující
 25 aminoxykupinu

25

Metody: Liposomy prezentující aminoxykupinu byly připraveny postupem popsáným v
 příkladu 15; obsahující 1 % aminoxylipididu obecného vzorce I (dle příkladu 14) o výchozí
 koncentraci 10 mg/ml PBS. Liposomy prezentující aminoxykupinu byly připraveny stejnou
 30 technikou s lipidem DOPE obsahujícím aminovou skupinu. Tyto liposomy o výchozí koncentraci
 10 mg/ml PBS byly smíchány s fluorescenčně značenou HA (Sigma–Aldrich) o koncentraci 1
 mg/ml PBS v poměru 1 mg celkového lipidu na 0,1 mg HA. Inkubace probíhá minimálně 30
 minut při pokojové teplotě (viz příklad 19). Oba vzorky byly inkubovány v 10 mM kyselině
 citrónové. Nenačnaná HA byla odstraněna na koloně Superose 6 (nástřík 200 µl, průtok první
 35 mililitr 0,1 ml/min, potom 0,3 ml/min, sběr frakcí po 1 ml). Fluorescence byla měřena na
 fluorimetru Perkin Elmer při odpovídajících vlnových délkách (excitace pro FITC–HA 490 nm,
 emise 505 nm)

Výsledky: Ve frakci obsahující liposomy (2 ml) u liposomů s aminoxylipidem obecného vzorce I
 40 (dle příkladu 14) bylo navázáno 45 % původního množství HA, které se vlivem okyselení
 nezměnilo. Pro ostatní aminoxylipidy obecného vzorce I (dle příkladu 12,13) byla data téměř
 totožná. U liposomů obsahující DOPE, bylo navázáno 27 % původního množství HA a po
 okyselení zůstalo navázáno 20 % (Obrázek 8)

45 Příklad 23

Vazba liposomů obsahujícím aminoxylipid obecného vzorce I (dle příkladu 14) na buňky
 H1299

50 Metody: K buňkám H1299 byly přidány liposomy připravené stejně jako v příkladu 15 obsahující
 0,4 % fluorescenčního lipidu v objemu max. 10 % z celkového objemu v jamce. Celkové
 množství liposomu bylo 100 µg lipidu na 1 ml média. Množství liposomů zachycených buňkami
 bylo měřeno flowcytometrem FACSCalibur (Becton Dickinson, USA), pro pozorování byl použit
 fluorescenční mikroskop (Nikon, Japonsko).

55

Výsledky: Výsledky z flowcytometru (Obrázek 9), výsledky z fluorescenčního mikroskopu (Obrázek 10) ukazují, že vazba kyseliny hyaluronové zlepšuje vazbu liposomů na buňky přes receptor CD44. Liposomy s kyselinou hyaluronovou navázanou přes aminoxylipid je možné využívat pro cílení do buněk exprimujících CD44 receptor.

5

Přehled použité literatury

Aberle, A. M.; Tablin, F.; Zhu, J.; Walker, N. J.; Gruenert, D. C; Nantz, M. H., A novel tetraester construct that reduces cationic lipid-associated cytotoxicity. Implications for the onset of cytotoxicity. *Biochemistry* **1998**, 37(18), 6533–6540.

10

Baskin, J. M.; Prescher, J. A.; Laughlin, S. T.; Agard, N. J.; Chang, P. V.; Miller, I. A.; Lo, A.; Codelli, J. A.; Bertozzi, C. R., Copper-free click chemistry for dynamic in vivo imaging. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2007**, 104 (43), 16793–16797.

15

Carmona, S.; Jorgensen, M. R.; Kolli, S.; Crowther, C; Salazar, F. H.; Marion, P. L.; Fujino, M.; Natori, Y.; Thanou, M.; Arbuthnot, P.; Miller, A. D., Controlling HBV Replication in Vivo by Intravenous Administration of Triggered PEGylated siRNA-Nanoparticles. *Molecular Pharmaceutics* **2009**, 6 (3), 706–717.

20

Drašar, L.; Ledvina, M.; Korvasová, Z.; Turanek, J., Lipopolyaminy sperminového typu pro konstrukci liposomálních transfekčních systémů. Czech. Pat. 303963, **2013**.

Drašar, L.; Ledvina, M.; Korvasová, Z.; Turanek, J., Lipopolyamines of spermine type for construction of liposomal transfection systems, US 9 393 200 B2, **2016**.

25

Hassane, F. S.; Frisch, B.; Schuber, F., Targeted liposomes: Convenient coupling of ligands to preformed vesicles using "click chemistry". *Bioconjugate Chemistry* **2006**, 17 (3), 849–854; (b) Heyes, J. A.; Niculescu-Duvaz, D.; Cooper, R. G.; Springer, C. J., Synthesis of novel cationic lipids: Effect of structural modification on the efficiency of gene transfer. *Journal of Medicinal Chemistry* **2002**, 45 (1), 99–114.

30

Korvasová, Z.; Drašar, L.; Masek, J.; Knotigova, P. T.; Kulich, P.; Matiasovic, J.; Kovarcik, K.; Bartheldyova, E.; Koudelka, S.; Skrabalova, M.; Miller, A. D.; Holy, A.; Ledvina, M.; Turanek, J., Antiviral effect of HPMPC (Cidofovir (R)), entrapped in cationic liposomes: In vitro study on MDBK cell and BHV-1 virus. *Journal of Controlled Release* **2012**, 160 (2), 330–338.

35

Koudelka, S; Mikulik, R; Masek, J; Raska, M; Knotigova, PT; Miller, AD; Turanek, J. Liposomal nanocarriers for plasminogen activators. *Journal of Controlled Release* **2016**, 22, 45–577.

40

Kusumoto, S.; Inage, M.; Shiba, T.; Azuma, I.; Yamamura, Y., Synthesis of long-chain fatty-acid esters of normal-acetylmuramyl-l-alanyl-d-isoglutamine in relation to anti-tumor activity. *Tetrahedron Letters* **1978**, (49), 4899–4902.

45

Leventis, R.; Silvius, J. R., Interactions of mammalian-cells with lipid dispersions containing novel metabolizable cationic amphiphiles. *Biochimica Et Biophysica Acta* **1990**, 1023 (1), 124–132.

50

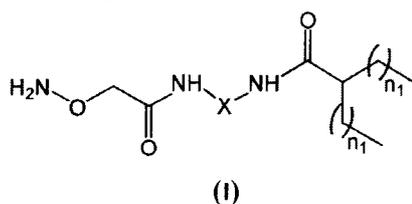
Liu, Y.; Feizi, T.; Carnpanero-Rhodes, M. A.; Childs, R. A.; Zhang, Y. N.; Muiioy, B.; Evans, P. G.; Osborn, H. M. I.; Otto, D.; Crocker, P. R.; Chai, W. C, Neoglycolipid probes prepared via oxime ligation for microarray analysis of oligosaccharide-protein interactions. *Chemistry & Biology* **2007**, 14 (7), 847–859.

55

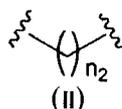
- Lv, H.; Zhang, S.; Wang, B.; Cui, S.; Yan, J., Toxicity of cationic lipids and cationic polymers in gene delivery. *Journal of Controlled Release* **2006**, *114* (1), 100–109.
- Marques–Gallego, P.; de Kroon, A., Ligation Strategies for Targeting Liposomal Nanocarriers. *Biomed Research International* **2014**, *2014*, 1–12.
- Miller, A. D.; Keler, M.; Jorgensen, M.; Perouzel, E. US patent application publication, Pub. No. US 2005/0287202 A1.
- Niculescu–Duvaz, D.; Heyes, J.; Springer, C. J., Structure–activity relationship in cationic lipid mediated gene transfection. *Current Medicinal Chemistry* **2003**, *10* (14), 1233–1261.
- Tang, L.; Yin, Q.; Xu, Y.; Zhou, Q.; Cai, K.; Yen, J.; Dobrucki, L. W.; Cheng, J., Bioorthogonal Oxime Ligation Mediated Cancer Targeting. *Chem Sci* **2015**, *6* (4), 2182–2186.
- Turánek, J.; Mašek, J.; Raška, M.; Ledvina, M., Application of Liposomes for Construction of Vaccines. In *Biomedical Science, Engineering and Technology*, Ghista, D. N., Ed. InTech, January, 2012: 2012; pp 653–678.
- Ulrich, S.; Boturyn, D.; Marra, A.; Renaudet, O.; Dumy, P., Oxime Ligation: A Chemoselective Click–Type Reaction for Accessing Multifunctional Biomolecular Constructs. *Chemistry–a European Journal* **2014**, *20* (1), 34–41.
- Vabbilisetty, P.; Sun, X. L., Liposome surface functionalization based on different anchoring lipids via Staudinger ligation. *Organic & Biomolecular Chemistry* **2014**, *12* (8), 1237–1244.

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Aminoxylipidy obecného vzorce I

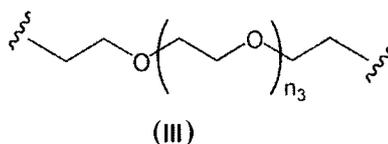


kde $n_1 = 5$ až 30 a X je polymethylénová spojka obecného vzorce II



kde $n_2 = 2$ až 10,

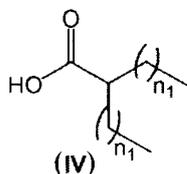
nebo X je polyethylenglykolová spojka obecného vzorce III



kde $n_3 = 1$ až 14.

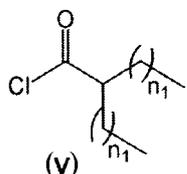
5 **2.** Aminoxylipidy obecného vzorce **I** podle nároku 1, kde $n_1 = 13$ a X je polymethylénová spojka obecného vzorce **II**, kde $n_2 = 2$ či 3, nebo X je polyethylenglykolová spojka obecného vzorce **III**, kde $n_3 = 1$.

10 **3.** Způsob přípravy aminoxylipidů obecného vzorce **I**, podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že acylací *N-terc*-butoxykarbonyl-polymethyldiaminu $\{(CH_3)_3C-O-(C=O)-HN-(CH_2)_n-NH_2$, $n = 2$ až 13}, či *N-terc*-butoxykarbonyl-polyethylenglykoldiaminu $\{(CH_3)_3C-O-(C=O)-HN-(CH_2)_2-[O-(CH_2)]_n-O-(CH_2)_2NH_2$, $n = 1$ až 14} symetricky v poloze C(2) větvenou mastnou kyselinou obecného vzorce **IV**



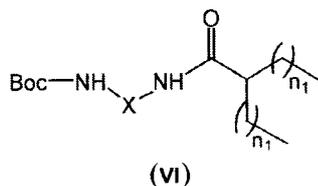
15

kde $n_1 = 5$ až 30, organickém aprotickém rozpouštědle, s výhodou v DMF a promotovanou HATU, nebo od kyseliny **I** odvozeným acylchloridem obecného vzorce **V**



20

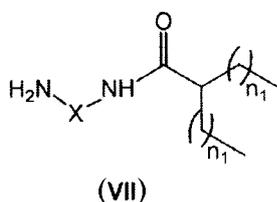
kde $n_1 = 5$ až 30, v organickém aprotickém rozpouštědle a v přítomnosti organické báze, s výhodou dichlormethanu v přítomnosti *N*-ethyl-diisopropylaminu, se získají *N*-Boc-aminolipidy obecného vzorce **VI**



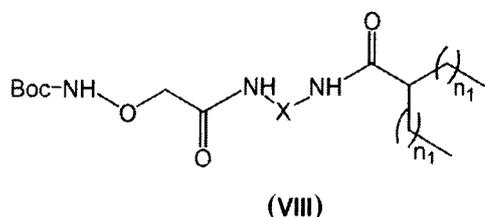
25

kde $n_1 = 5$ až 30 a X je polymethylénová spojka obecného vzorce **II** popsaného v nároku 1 nebo polyethylenglykolová spojka obecného vzorce **III** popsaného v nároku 1, ty se v následujícím stupni převedou hydrolytickým odštěpením chránicí Boc-skupiny, s výhodou kyselinou trifluoroctovou v dichlormethanu, na aminolipidy obecného vzorce **VII**

30



5 kde $n_1 = 5$ až 30 a X je polymethylénová spojka výše uvedeného obecného vzorce **II** nebo polyethylenglykolová spojka výše uvedeného obecného vzorce **III**, které se kondenzací s kyselinou *N-terc*-butoxykarbonylaminoxyoctovou v organickém aprotické rozpouštědle, s výhodou v dichlormethanu, a v přítomnosti kondenzačního činidla, s výhodou *N,N'*-diisopropylkarbodiimidu, převedou na *N*-Boc-aminoxylipidy obecného vzorce **VIII**



10 kde $n_1 = 5$ až 30 a X je polymethylénová spojka výše uvedeného obecného vzorce **II** popsaného v nároku 1 nebo polyethylenglykolová spojka výše uvedeného obecného vzorce **III** popsaného v nároku 1, ty následným hydrolytickým odštěpením Boc-skupiny poskytnou cílové aminoxylipidy obecného vzorce **I** popsaného v nároku 1, přičemž acylchloridy obecného vzorce **V** se připraví reakcí kyselin obecného vzorce **IV** s oxalylchloridem v přítomnosti katalytického množství *N,N*-dimethylformamidu v organickém aprotickém rozpouštědle, s výhodou v dichlormethanu.

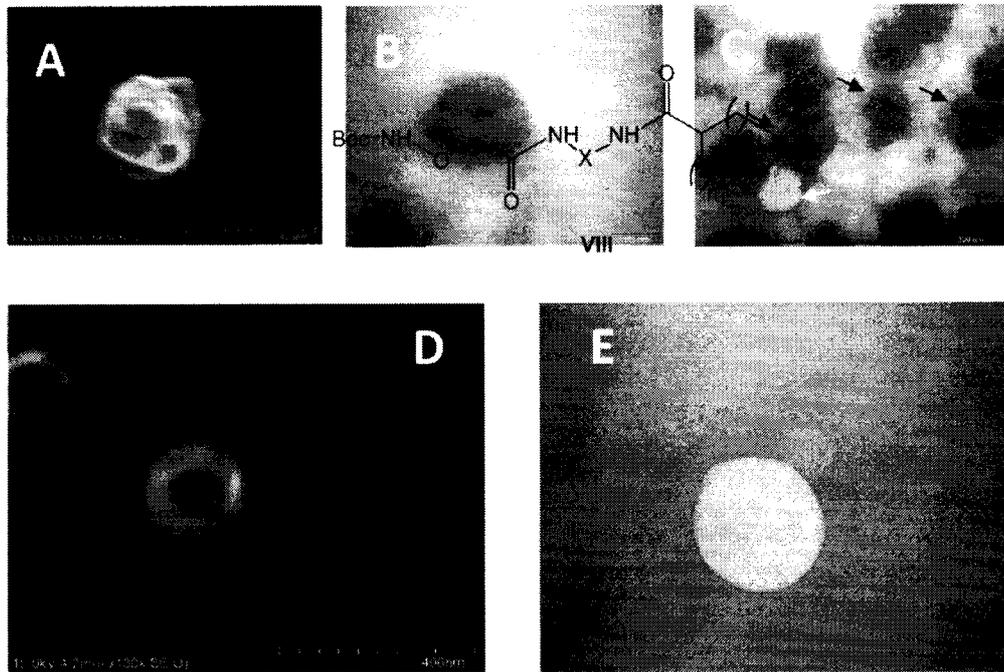
15 **4.** Použití netoxických aminoxylipidů obecného vzorce **I** podle nároku 1 nebo 2 pro konstrukci a následnou modifikaci netoxických samoskladných liposomálních nosičů léčiv prezentujících aminooxyskupiny.

20 **5.** Použití podle nároku 4, kde následnou modifikací je modifikace biologicky funkčními molekulami za použití oximové ligační techniky reakcí aminooxyskupiny a aldehydové skupiny nebo ketoskupiny.

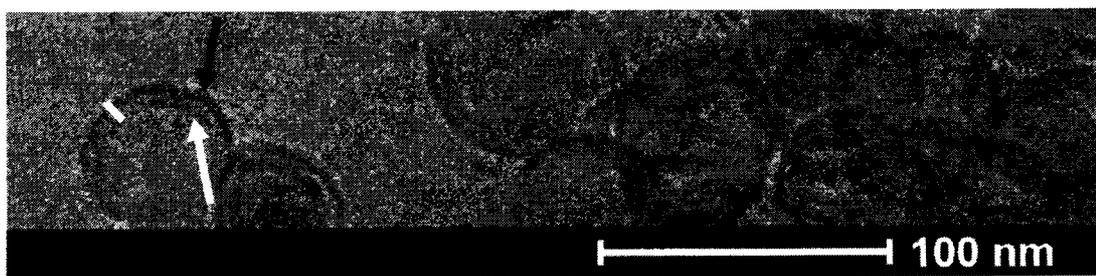
25

7 výkresů

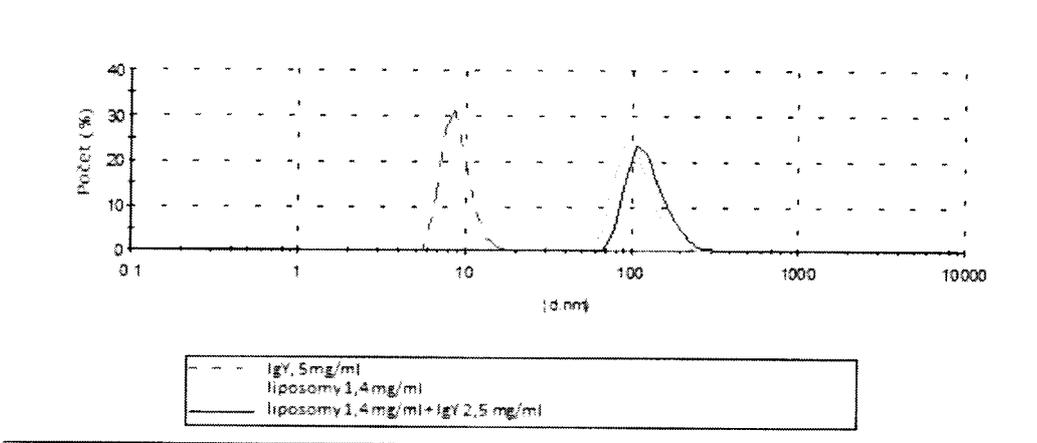
Obr. 1:



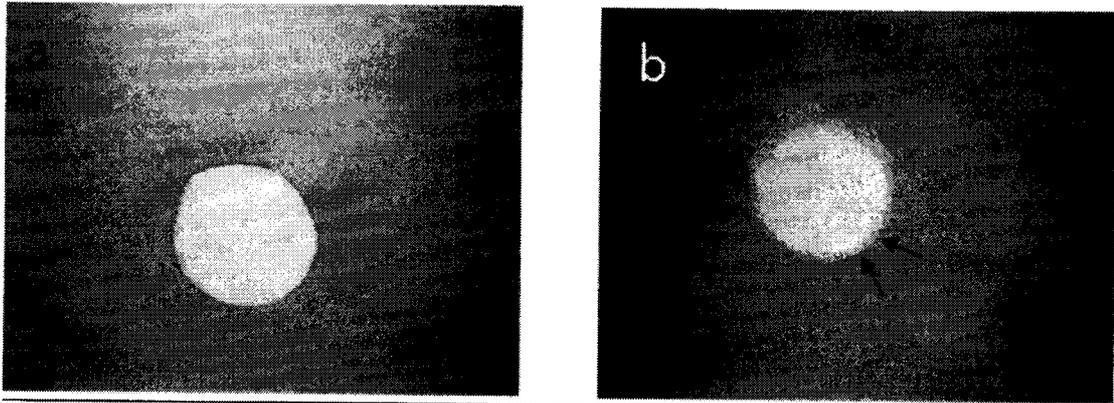
Obr. 2:



Obr. 3:

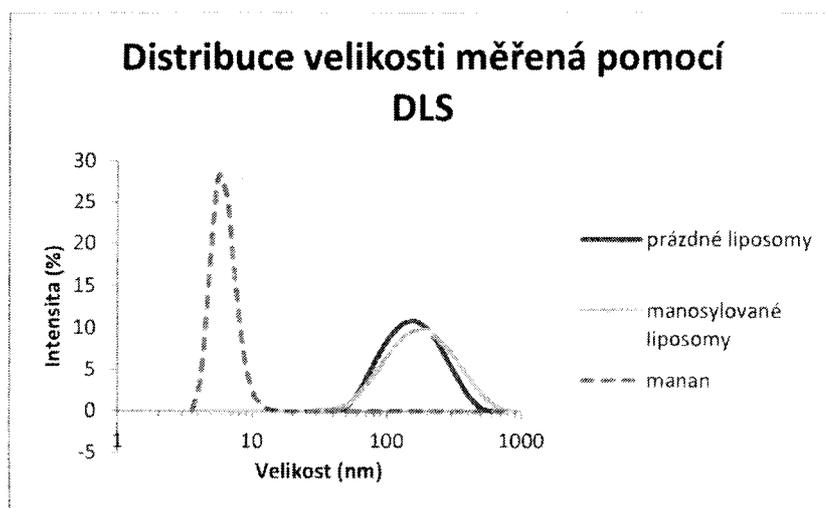


Obr. 4:

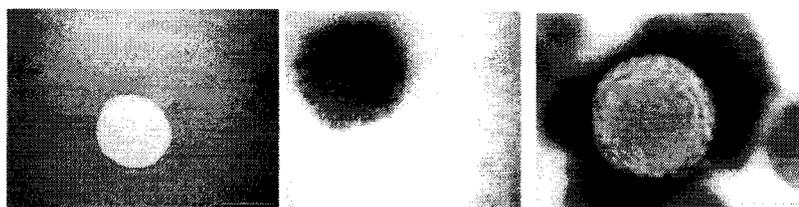




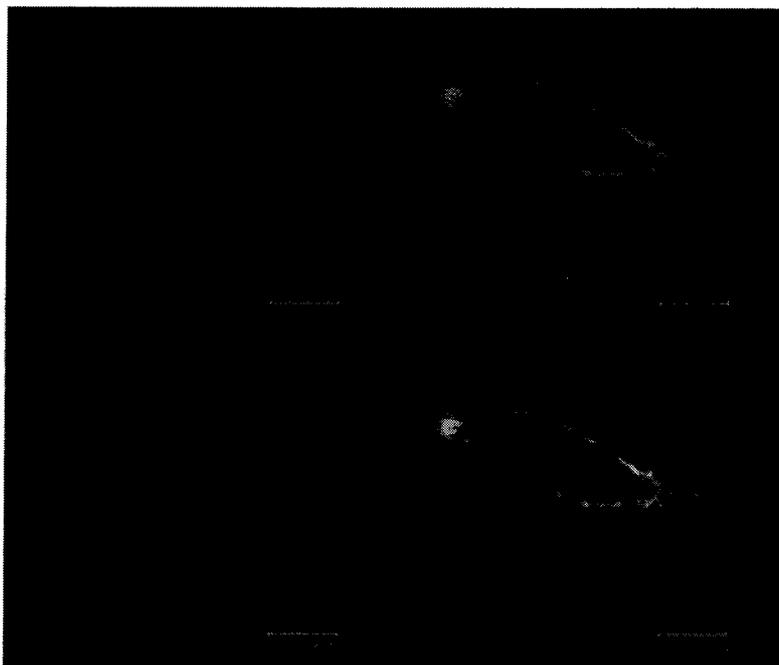
Obr. 5:



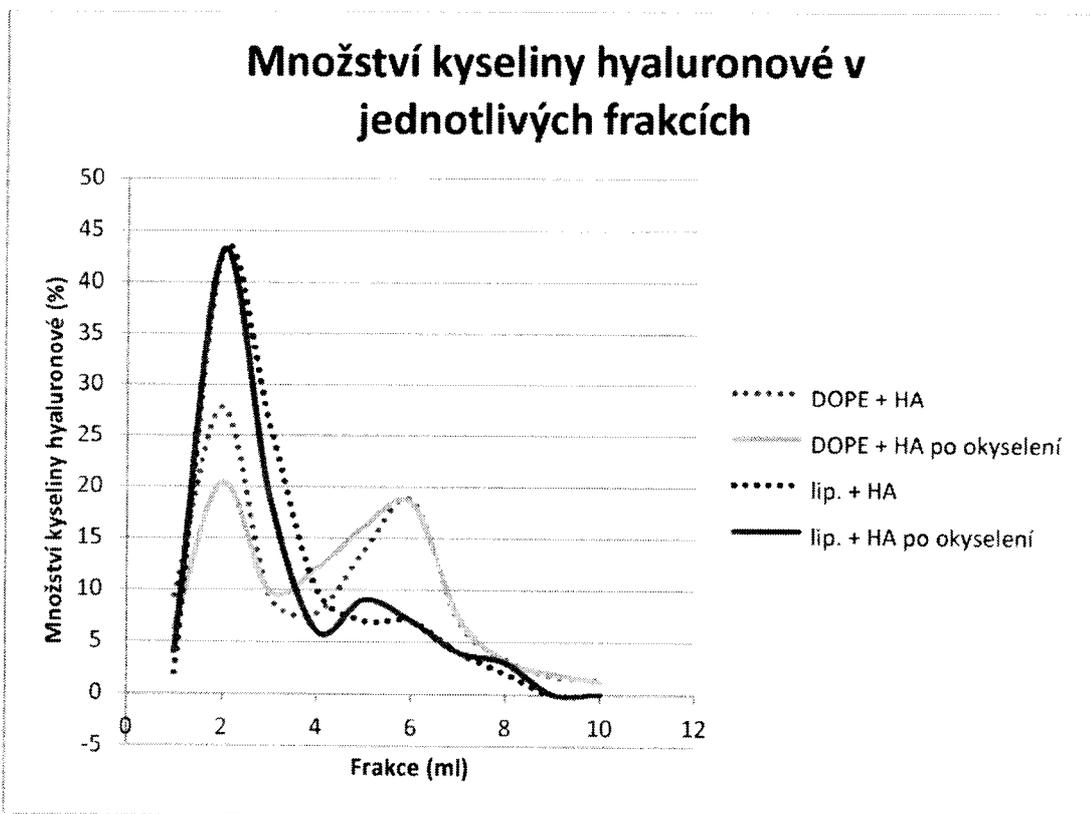
Obr. 6:



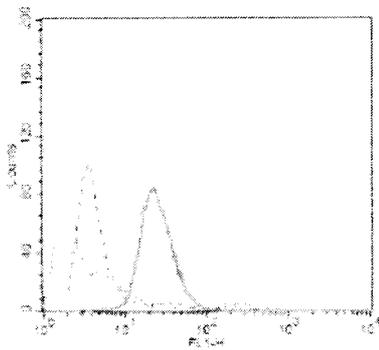
Obr. 7:



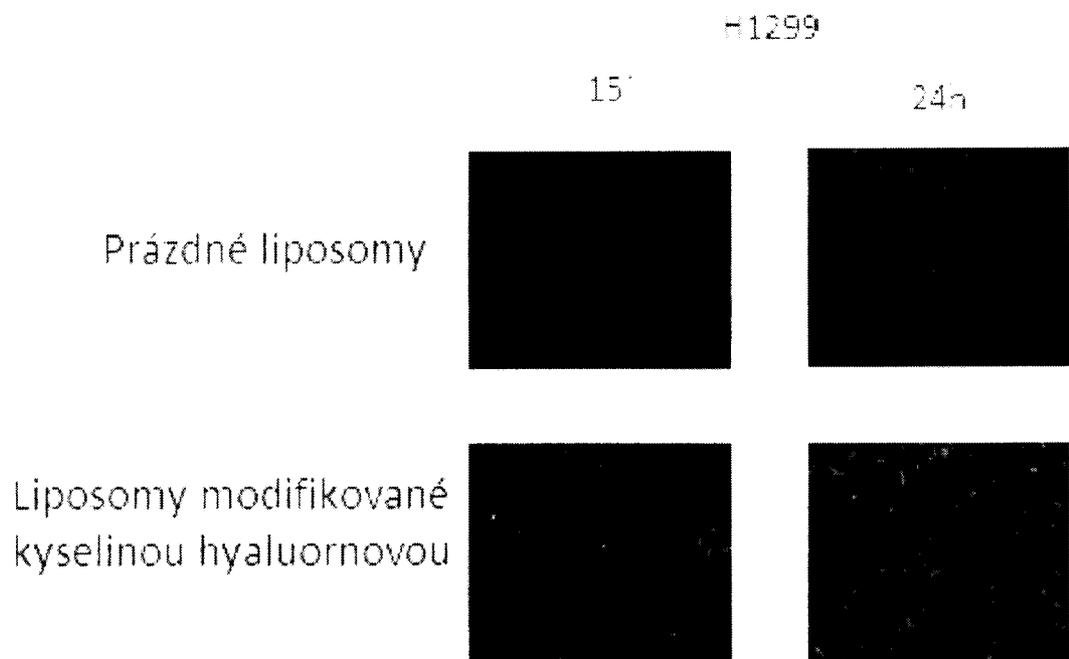
Obr. 8:



Obr. 9:



Obr. 10:



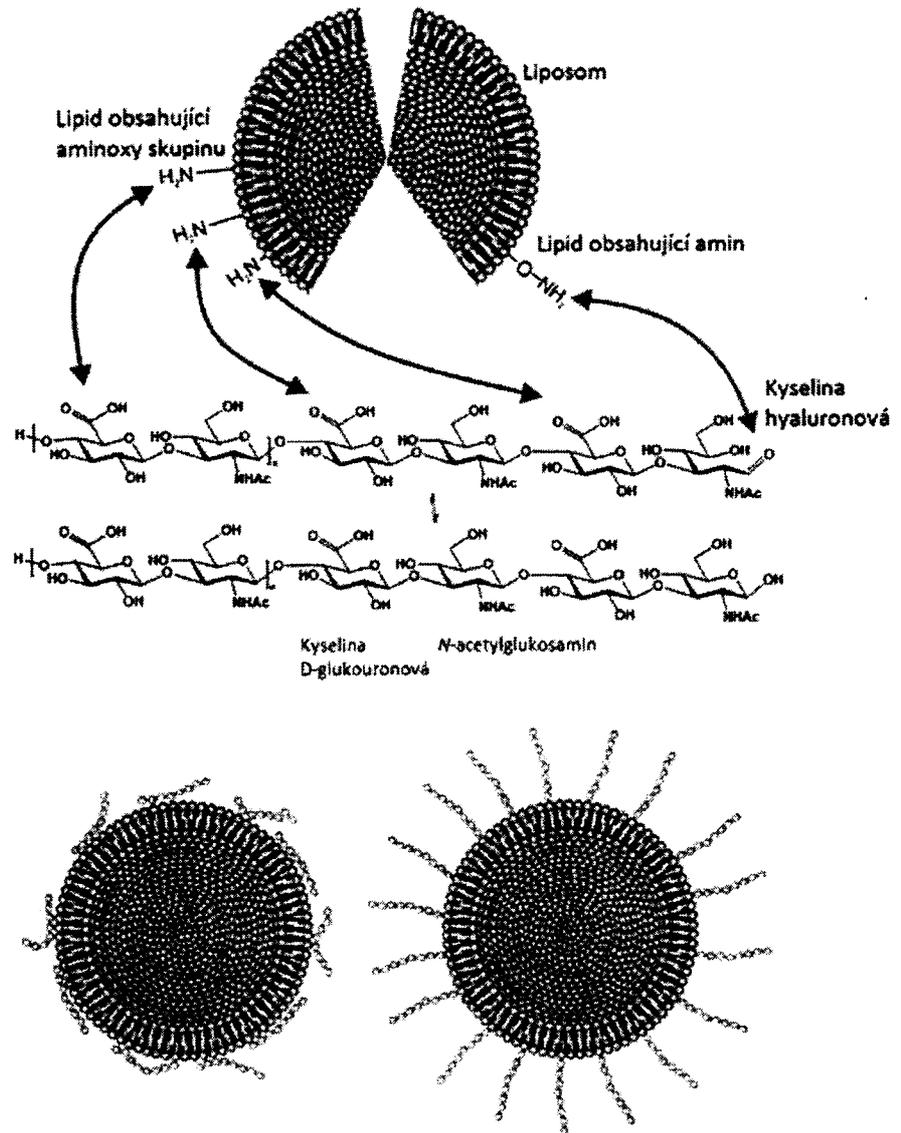
Tab. 1:

Pokus	apoptické buňky (%)		
	kontrola	EPC-lip	<i>N</i> -oxy-lip
1	0	0,1	0,1
2	0,1	0	0,1
3	0	0	0
4	0	0	0
5	0	0,1	0,3

Tab. 2:

Parametr	kontrola	LPS	manosylované liposomy
CD11c+/CD80+	15	83	74
CD11c+/CD83+	45	88	83
CD4+	0	15	15
CD8+	0	21	24
CD3+	0	17	17

Obr. 11



Konec dokumentu