

C07D 219/10 (2006.01)
C07D 219/12 (2006.01)
C07D 219/06 (2006.01)
C07D 219/04 (2006.01)
A61K 49/00 (2006.01)
C12Q 1/6876 (2018.01)

(19)
 ČESKÁ
 REPUBLIKA



ÚŘAD
 PRŮMYSLOVÉHO
 VLASTNICTVÍ

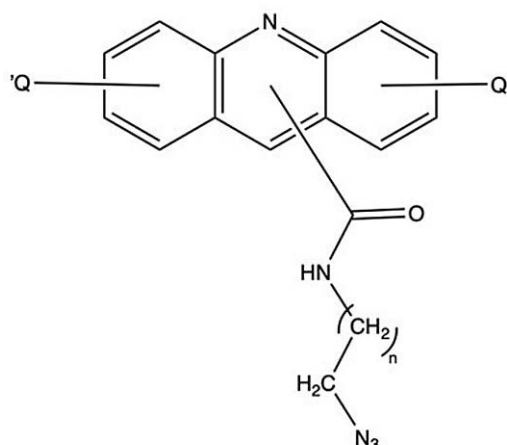
(21) Číslo přihlášky: **2020-154**
 (22) Přihlášeno: **19.03.2020**
 (40) Zveřejněno: **29.09.2021**
(Věstník č. 39/2021)
 (47) Uděleno: **02.11.2023**
 (24) Oznámení o udělení ve věstníku: **13.12.2023**
(Věstník č. 50/2023)

(56) Relevantní dokumenty:
 IMOTO, Shuhei; HIROHAMA, Tomoya; NAGATSUGI, Fumi. New Methodology to Search for DNA Binding Ligands Based on Duplex DNA-Templated Click Chemistry. In: Nucleic Acids Symposium Series. Oxford University Press, 2008. p. 381-382; ISSN 1746-8272; IMOTO, Shuhei; HIROHAMA, Tomoya; NAGATSUGI, Fumi. DNA-templated click chemistry for creation of novel DNA binding molecules. Bioorganic & medicinal chemistry letters, 2008, 18.20: 5660-5663; ISSN: 0960-894X; HOWELL, Lesley A., et al. Synthesis and evaluation of 9-aminoacridines derived from benzyne click chemistry. Bioorganic & medicinal chemistry letters, 2009, 19.20: 5880-5883; ISSN 0960-894X.

(73) Majitel patentu:
 Univerzita Karlova, Praha 1, Staré Město, CZ
 GENERI BIOTECH s.r.o., Hradec Králové, Třebeš, CZ

(72) Původce:
 Mgr. Filip Kostelanský, Považská Bystrica, SK
 doc. PharmDr. Veronika Nováková, Ph.D., Hradec Králové, Slezské Předměstí, CZ
 prof. PharmDr. Petr Zimčík, Ph.D., Hradec Králové, Nový Hradec Králové, CZ
 doc. PharmDr. Miroslav Miletín, Ph.D., Vysoká nad Labem, CZ
 Ing. Zuzana Havlínová, Ph.D., Pardubice, Studánka, CZ
 PharmDr. Antonín Libra, Ph.D., Vysoká nad Labem, CZ
 Mgr. Pavel Flídr, Lubná, CZ

(74) Zástupce:
 MACHU IP | patentová kancelář, Mgr. Matěj Machů, Ph.D., Senovážné náměstí 978/23, 110 00 Praha 1, Nové Město



(54) Název vynálezu:
Použití derivátů akridinu jako sloučenin interkalujících se do DNA

(57) Anotace:
 Použití derivátů akridinu nesoucích substituent vázaný k aromatickému jádru prostřednictvím karboxamidové skupiny obsahující uhlíkatý řetězec zakončený azidoskupinou sloužící k azido-alkynové cykloadici jako meziproductů k přípravě interkalátorů zvyšujících pevnost vazby komplementárních řetězců DNA a ovlivňujících její teplotu tání. Tento substituent je navázaný v kterékoli volné poloze tricyklického jádra, přičemž modifikace jádra slouží k upevnění vazby na dvoušroubovici DNA pomocí vodíkových vazeb s dusíkem a kyslíkem guaninu, dále pak pomocí vodíkové vazby amidického vodíku přes molekulu vody na fosfátovou skupinu mezi příslušným guanosinem a sousedním nukleosidem.

Použití derivátů akridinu jako sloučenin interkalujících se do DNA

Oblast techniky

5

Předkládaný vynález náleží do oblasti organické chemie, biochemie a molekulární genetiky. Týká se látek schopných interkalovat se do dvoušroubovice DNA, a zvýšit tak její teplotu tání.

Dosavadní stav techniky

Za účelem stabilizace duplexu dvoušroubovice DNA je v současné době zkoumáno nebo již existuje několik typů chemických modifikací nukleových kyselin.

15 Patří sem tzv. Locked nucleic acids (LNA, O2'-C4'-methylenovou skupinou přemostěný cyklus ribosy), resp. Bridged Nucleic Acids (BNA, O2'-C4'-methylenaminoskupinou přemostěný cyklus ribosy).

20 O dosažení vyšší stability duplexu DNA usilují i další technologie, např. využití organických polyaminů (NOIR R., KOTERA M., PONS B., REMY J.S., BEHR J.P. *J. Am. Chem. Soc.* 2008, vol. 130, p. 13500-13505; US 8465921).

25 Velký potenciál má pak využití molekul vázajících se do malého žlábků DNA (MGB, Minor Groove Binders) nebo působících jako interkalátory. Je známo, že molekuly některých sloučenin jsou schopné vsunout se a vázat do malého žlábků dvoušroubovice DNA (minor groove) nebo mezi báze dvoušroubovice DNA (interkalovat se), a v důsledku toho zvyšovat pevnost vazby komplementárních řetězců DNA účastnících se interakce, a tím teplotu tání vznikajícího duplexu.

30 Řada molekul působících mechanismem vazby do malého žlábků dvoušroubovice DNA je zkoumána, testována a v některých případech i klinicky využívána pro svou schopnost do určité míry sekvenčně specificky blokovat realizaci genetické informace jako terapeutika, především bakteriálních a parazitárních infekcí, ale i jako potenciální antivirotika či antineoplastika (WARTELL R.M., LARSON J.E., WELLS R.D. *J. Biol. Chem.* 1974, vol. 249, p. 6719-6731; ZIMMER C. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 1975, vol. 15, p. 285-318; NGUYEN B., NEIDLE S., WILSON W.D. *Acc. Chem. Res.* 2009, vol. 42, p. 11-21; ARAFA R.K., ISMAIL M.A., MUNDE M., WILSON W.D., WENZLER T., BRUN R., BOYKIN D.W. *Eur. J. Med. Chem.* 2008, vol. 43, p. 2901-2908; FU X.B., LIU D.D., LIN Y., et al. *Dalton Trans.*, 2014, vol. 43, p. 8721-8737; WANG M., YU Y., LIANG CH., et al. *Int. J. Mol. Sci.* 2016, vol. 17, p. 779-795; ALNISS H.Y. *J. Med. Chem.* 2019, vol. 62, p. 385-402; aj.). Díky vazbě v malém žlábků komplikují transkripci a následně tedy translaci a množení nežádoucích buněk či tkání. Z klinicky významných je možno uvést např. pentamidin.

45 Velkou oblastí využití MGB i interkalátorů je molekulární biologie a diagnostika. Z MGB patří mezi nejvýznamnější molekuly pro tyto aplikace sloučeniny typu Hoechst (PJURA P.E., GRZESKOWIAK K., DICKERSON R.E. *J. Mol. Biol.* 1987, vol. 197, p. 257-271). Komerčně v oblasti molekulární biologie jako MGB využívá molekuly nezveřejněné struktury např. společnost Applied Biosystems Inc. (nyní Life Technologies Corp.). Jako komponentu pro syntézu oligonukleotidů dodává společnost Glen Research MGB charakteru trimeru pyrroloindolu CDPI₃ (trimer-amid 1,2-dihydro-(3*H*)-pyrrolo[3,2-*e*]indol-7-karboxylové kyseliny). Základní struktura této molekuly, odvozená ze struktury duokarmycinů, je známa již řadu let, její syntéza je poměrně komplikovaná a problematická může být i stabilita (BOGER D.L., COLEMAN R.S., INVERGO B.J. *J. Org. Chem.* 1987, vol. 52, no. 8, p. 1521-1530). Ani CDPI₃ však není vhodný pro všechny aplikace (US 5801155, US 6084102, US 7582739, US 20110172289) a je zakázáno používat uvedenou komponentu pro komerční výrobu oligonukleotidů bez další licenční dohody.

55

Strukturně jsou látky působící mechanismem MGB poměrně různorodé, např. heterocyklické oligoamidy netropsin, distamycin a jejich analogy, diamidino- resp. diguanidinosubstituované látky jako pentamidin, berenil, 4',6'-diamidino-2-fenylindol (LARSEN T.A., GOODSELL D.S., CASCIO D., GRZESKOWIAK K., DICKERSON R.E. *J. Biomol. Struct. Dyn.* 1989, vol. 7, p. 477-491) i méně bazické deriváty benzimidazolu (Hoechst sloučeniny), případně kombinace uvedených struktur (SHENG J., GAN J., HUANG Z. *Med. Res. Rev.* 2013, vol. 33, no. 5, p. 1119-1173). Předpokladem vazby do malého žlábků DNA je vhodné prostorové zakřivení molekuly, schopnost vytvářet van der Waalsovy a vodíkové vazby s exocyklickými skupinami a heterocyklickými dusíky nukleových bází a výhodou je vzhledem k anionickému charakteru nativních řetězců DNA bazicita MGB molekul (KIELKOPF C.L., WHITE S., SZEWCZYK J.W., TURNER J.M., BAIRD E.E., DERVAN P.B., REES D.C. *Science* 1998, vol. 282, p. 111-115; SQUIRE C.J., BAKER L.J., CLARK G.R., MARTIN R.F., WHITE J. *Nucleic Acids Res.* 2000, vol. 28, p. 1252-1258; NEIDLE S., MANN J., RAYNER E., BARON A., BOAHEN Y., SIMPSON I.J., SMITH N.J., FOX K.R., HARTLEY J.A., KELLAND L.R. *Chem. Commun.* 1999, p. 929-930). Jednotlivé typy vazeb se uplatňují u molekul MGB v různé míře; van der Waalsovy vazby jsou základem interakce látek typu Hoechst s DNA, naproti tomu vodíkové vazby jsou klíčové u oligoamidů (netropsin, distamycin). Mezi MGB patří jak molekuly s poměrně flexibilní strukturou, jejichž příkladem je pentamidin, tak i poměrně rigidní, např. již zmíněné deriváty benzimidazolu. Několik typů látek působících mechanismem MGB je patentováno za účelem využití pro stabilizaci duplexů nukleových kyselin, např. distamycin a jeho deriváty (US 5955590, US 6949367). Publikovány byly i duplex stabilizující konjugáty oligonukleotidů s analogy barviva Hoechst 33258 (RAJUR S.B., ROBLES J., WIEDERHOLT K., KUIMELIS R.G., MCLAUGHLIN L.W. *J. Org. Chem.* 1997, vol. 62, p. 523-529) nebo DAPI.

Podobně je i řada molekul působících jako interkalátory zkoumána, testována, a to mnohem častěji než MGB, pro svou schopnost blokovat realizaci genetické informace jako terapeutika bakteriálních a parazitárních infekcí, jako potenciální antivirotika, klinicky jsou však interkalátory využívány především jako antineoplastika (např. GOFTAR M.K., KOR N.M., KOR Z.M. *Int. J. Adv. Biol. Biom. Res.* 2014, vol. 2(3), p. 811-822). Interkalací mezi báze DNA se komplikuje transkripce a následně i translace a množení buněk. Z klinicky významných interkalátorů možno uvést např. doxorubicin, mithoxanthron, aktinomycin.

Předpokladem pro interkalační účinek je přítomnost relativně velké planární části molekuly, nejčastěji tri- a vícecyklického útvaru, skládajícího se z sp^2 hybridizovaných atomů uhlíku, případně stericky odpovídajících heteroatomů. Interkalační účinek je pak často podpořen přítomností polární části molekuly (sacharidu nebo analogické struktury), která díky hydroxylovým skupinám a aminoskupinám vytváří vodíkové můstky k interkalované DNA a „kotví“ tak interkalátor.

Co se týče použití v molekulární biologii, je z interkalátorů možné zmínit např. ethidium bromid. Interkalátory mají výhodu v silnější stabilizaci duplexu DNA.

Přetrvává potřeba uvést do praktického použití sloučeniny interkalující DNA či vázající se do malého žlábků dvoušroubovice DNA, které by byly flexibilní, ale zároveň snadno připravitelné, s relativně malou molekulou, nízkou molekulovou hmotností a konjugovatelné na oligonukleotidové sondy.

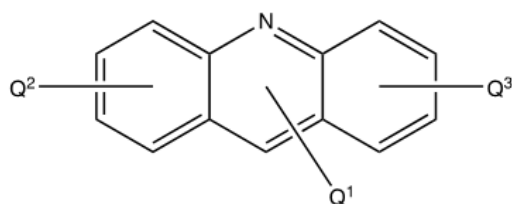
Ze stavu techniky, příkladně z dokumentů IMOTO, Shuhei; HIROHAMA, Tomoya; NAGATSUGI, Fumi. *New Methodology to Search for DNA Binding Ligands Based on Duplex DNA-Templated Click Chemistry In: Nucleic Acids Symposium Series.* Oxford University Press, 2008. p. 381-382; IMOTO, Shuhei; HIROHAMA, Tomoya; NAGATSUGI, Fumi. *DNA-templated click chemistry for creation of novel DNA binding molecules. Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 2008, 18.20: 5660-5663; HOWELL, Lesley A., et al. *Synthesis and evaluation*

of 9-aminoacridines derived from benzyne click chemistry. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 2009, 19.20: 5880-5883, jsou známé sloučeniny na bázi akridinu nesoucí azidovou skupinu vázanou přes aromatický amin, které mohou být použity pro zvýšení teploty tání DNA a přípravu oligonukleotidových sond. Při přípravě těchto sond je ovšem nutné se vyhnout použití silně bazických činidel, příkladně při deprotečních krocích, jelikož nevýhodou těchto sloučenin je nízká stabilita v bazickém prostředí. V důsledku toho je nutné používat drahé, komplikované a méně efektivní syntetické postupy.

10 Podstata vynálezu

Předmětem vynálezu jsou deriváty akridinu, které odstraňují uvedené nedostatky dosavadního stavu techniky. Vynálezem je použití látek obecného vzorce I jako sloučenin pro zvýšení teploty tání dvoušroubovice DNA. Jedná se o molekuly na bázi aromatického jádra akridinu, výhodně nesoucí skupinu obsahující uhlíkatý řetězec zakončený bazickou funkcí, substituovaného karboxamidovou skupinou s řetězcem zakončeným azidoskupinou sloužící ke kovalentní vazbě příkladně na oligonukleotidovou sondu. Modifikace jádra slouží k upevnění vazby na dvoušroubovici DNA pomocí vodíkových vazeb s dusíkem a kyslíkem guaninu, dále pak pomocí vodíkové vazby amidického vodíku přes molekulu vody na fosfátovou skupinu mezi příslušným guanosinem a sousedním nukleosidem. Azidoskupina sloužící k azido-alkynové cykloadici (takzvané click reakci) na vhodně modifikovaný řetězec, příkladně oligonukleotidu.

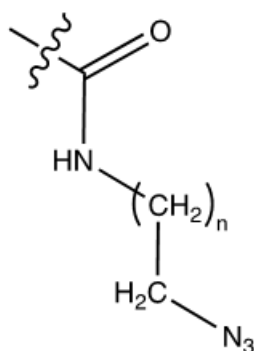
Vynález se týká použití derivátů akridinu obecného vzorce I:



25 (I),

kde:

30 substituent Q^1 navázaný v kterékoliv volné poloze tricyklického jádra představuje skupinu obecného vzorce II:



35 (II),

kde:

n je celé číslo od 0 do 9;

dále substituenty Q^2 a Q^3 navázané v kterékoli volné poloze tricyklického jádra jsou nezávisle na sobě vybírány ze skupiny zahrnující: -H, -NH₂ a -X-(CH₂)_n-T, kde:

5 X je -CONH-, -O-, -S-, -CH₂-, -NH- nebo -NR¹-, kde R¹ je alkyl nebo aryl;

n je celé číslo od 0 do 10;

10 T je -COOH, -CONH₂, -CONHR², -CONR²R³, -COOR², -NH₂, -NHR² nebo -NR²R³, kde R² a R³ jsou nezávisle na sobě alkyl nebo aryl;

a dále jejich solí vzniklých reakcí s HCl, H₂SO₄, H₃PO₄ nebo HNO₃

15 jako meziproductů k přípravě interkalátorů zvyšujících pevnost vazby komplementárních řetězců DNA účastnících se interakce a ovlivňujících teplotu tání vznikajícího duplexu.

Sloučeniny obecného vzorce I lze tedy použít dle vynálezu jako látky zvyšující teplotu tání dvoušroubovice DNA. Jejich předností je nízká molekulová hmotnost, bazicita, a tedy možnost tvorby ve vodě velmi dobře rozpustných solí, flexibilita a vysoká stabilizace duplexu DNA. Lze je použít například v kombinaci s vhodnými dvojicemi oligonukleotidů jako systém interní kontroly v analýze teploty tání pro real-time PCR, kde má význam sledovat vliv látek v reakci na teplotu tání (např. u analýz genetických polymorfismů), přičemž sekvence oligonukleotidů se volí tak, aby nebyly komplementární s DNA sekvencemi běžně se vyskytujícími v přírodě. Oproti stavu techniky je možné při přípravě oligonukleotidů s navázanou molekulou stabilizující DNA aplikovat postupy ochrany využívající silně bazická činidla, které by u sloučenin dle stavu techniky vedla k odštěpení substituentů z aromatického jádra.

Sloučeniny je dále možné použít v kombinaci s dvojicemi vhodných oligonukleotidů například v metodách srovnání vlivu dalších sloučenin na zvýšení teploty tání duplexu a experimentech zjišťujících závislost vlivu na zvýšení teploty tání duplexu na sekvenci oligonukleotidů. Sloučeniny obecného vzorce I obsahující ve své molekule azidoskupinu dle vynálezu jsou, mimo použití popsané výše, současně vhodné pro připojení kovalentní vazbou například na oligonukleotidové sondy. Vzniklé struktury je možné následně využít při zjišťování bodových mutací v genech.

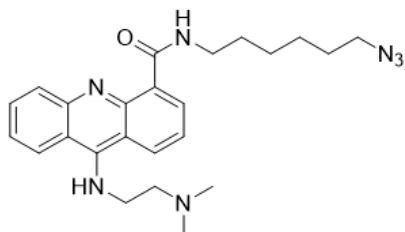
35

Příklady uskutečnění vynálezu

Příklad 1

40

Příklad č. 1 demonstruje přípravu a charakterizaci sloučeniny vzorce (V).



(V)

45

K bezvodému uhličitanu draselnému (5 g) se přidá kyselina anthranilová (6,8 g) a kyselina 2-chlorbenzoová (7,8 g). Do směsi se přidá isoamylalkohol (70 ml) a katalytické množství práškové mědi. Směs se 24 h míchá při teplotě 140 °C. Poté se ze směsi za sníženého tlaku

oddestiluje isoamylalkohol a surový produkt se převede do horké vody (1 l). Směs se míchá a zahřívá do rozpuštění produktu. Následně se do směsi přidává koncentrovaná kyselina chlorovodíková do kyselé reakce. Vzniklá sraženina se odsaje a promyje horkou vodou (0,5 l). Sraženina se rozpustí v 1M NaOH a za míchání a zahřívání se přidá aktivní uhlí (0,5 g). Směs se přefiltruje a k filtrátu se přidá koncentrovaná kyselina chlorovodíková. Sraženina se odsaje, promyje horkou vodou (0,5 l) a vysuší. Vysušená sraženina se rozpustí za horka v 96% ethanolu (1 l). Za míchání se přidá destilovaná voda do stálého zakalení. Směs se ponechá k vysrážení 20 h. Vzniklá sraženina se odsaje a vysuší. Připraví se 5,14 g jemně žluté, pevné krystalické látky, což odpovídá výtěžku 32 %.

K 2,2'-iminodibenzoové kyselině (7,78 g, 30,24 mmol) se přidá POCl₃ (90 ml), směs se míchá 1 h při 140 °C pod zpětným chladičem. Poté se do směsi ochlazené na 50 °C pomalu přidává bezvodý MeOH (100 ml) po dobu 2 h. Poté se do směsi přidává POCl₃ do rozpuštění krystalů a směs se míchá 12 h. Přebytný MeOH se ze směsi oddestiluje a vzniklé krystaly se odsají a rekrystalizují z horkého MeOH. Krystaly se odsají, promyjí ledovým MeOH a vysuší. Získá se 6,11 g hnědožluté krystalické látky, což odpovídá výtěžku 79 %.

K methylesteru kyseliny 9-oxoakridan-4-karboxylové (0,5 g, 1,97 mmol) se přidá SOCl₂ (1 ml) a katalytické množství DMF. Směs se míchá při teplotě 80 °C pod zpětným chladičem. Poté se ze směsi oddestiluje SOCl₂ za sníženého tlaku. Do surového produktu se přidá suchý fenol (1,86 g, 19,74 mmol) a směs se zahřeje na 110 °C po dobu 15 minut. Poté se teplota sníží na 55 °C a do směsi se přidá 2-dimethylaminoethylamin (434 mg, 4,92 mmol). Směs se míchá při stejné teplotě 24 hodin. Po ukončení reakce se směs převede do chloroformu a vytřepe 1x 2M roztokem hydroxidu sodného (20 ml). Organická vrstva se vysuší Na₂SO₄ a odpaří. Produkt se přecistí sloupcovou chromatografií na silikagelu (hexan:ethylacetát 7:3). Frakce s čistým produktem se odpaří.

K roztoku methylesteru 9-{[2-(dimethylamino)ethyl]amino}akridin-4-karboxylové kyseliny (63 mg, 0,195 mmol) v THF se přidá nasycený roztok NaOH ve směsi MeOH/H₂O 5:1 v nadbytku. Směs se míchá 1 h při laboratorní teplotě. Poté se ze směsi oddestilují organická rozpouštědla za sníženého tlaku. Směs se rozpustí ve vodě a vytřepe 3x chloroformem. Organické vrstvy se spojí a vysuší Na₂SO₄. Směs se zahustí za sníženého tlaku. Poté se směs vytřepe 10% HCl a organická vrstva se vysuší Na₂SO₄ a odpaří za sníženého tlaku. Produkt se přecistí sloupcovou chromatografií na silikagelu.

K roztoku 9-{[2-(dimethylamino)ethyl]amino}akridin-4-karboxylové kyseliny (150 mg, 0,485 mmol) v bezvodém dichlormethanu se přidá HBTU (368 mg, 0,97 mmol) a triethylamin (98 mg, 0,97 mmol). Směs se na 15 minut vloží do ultrazvukové lázně. Poté se do směsi přidá 6-azidoethylamin (0,485 mmol) a směs se míchá 2 hodiny za laboratorní teploty. Po ukončení reakce se ze směsi oddestiluje dichlormethan za sníženého tlaku. Produkt se přecistí sloupcovou chromatografií na silikagelu.

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 12,51 (s, 1H); 8,87 (d, *J* = 7,1; 1,4 Hz, 1H); 8,29 (d, *J* = 8,7; 1,5 Hz, 1H); 8,18 (d, *J* = 8,8; 0,9 Hz, 1H); 7,93 (d, *J* = 8,7; 1,3 Hz, 1H); 7,71 (t, *J* = 8,3; 6,6; 1,3 Hz, 1H); 7,45 – 7,34 (m, 2H); 7,14 (s, 1H); 3,91 (t, *J* = 5,8 Hz, 2H); 3,68 (q, *J* = 6,9; 5,3 Hz, 2H); 3,28 (t, *J* = 7,0 Hz, 2H); 2,82 – 2,76 (m, 2H); 2,69 (q, *J* = 7,1 Hz, 4H); 1,83 (p, *J* = 7,0 Hz, 2H); 1,70 – 1,57 (m, 4H); 1,57 – 1,47 (m, 2H); 1,13 (t, *J* = 7,1 Hz, 6H); ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 166,54; 152,91; 147,87; 147,43; 134,59; 130,57; 128,98; 127,91; 126,81; 123,03; 122,80; 121,51; 116,13; 115,26; 52,18; 51,40; 46,37; 46,07; 39,55; 29,66; 29,50; 28,81; 27,01; 26,54; 11,87.

Příklad 2

Příklad č. 2 demonstruje obecnou přípravu a charakterizaci oligonukleotidu s navázanou DNA interkalující molekulou metodou click reakce.

5 Oligonukleotid se syntetizuje na syntetizéru DNA/RNA ABI 394, v průběhu syntézy se s využitím standardních komerčních monomerů provede modifikace fosfátem na 3'-konci, 6-karboxyfluoresceinem (6-FAM) na 5'-konci a v pozici 7 se inkorporuje deoxythymidin modifikovaný dibenzocyklooktynem.

10 Syntetizovaný oligonukleotid se ponechá neodštěpený na pevné fázi. 0,01 mmol DNA interkalující molekuly se rozpustí v 0,2 ml methanolu, přidá se 6 mg pevné fáze s navázaným DBCO modifikovaným oligonukleotidem (200 nmol) a třepe se za laboratorní teploty na třepačce přes noc.

15 Poté se roztok DNA interkalující molekuly v methanolu odpipetuje a pevná fáze se promyje opakovaně methanolem a dichlormethanem, dokud není rozpouštědlo bezbarvé. Pak se pevná fáze vysuší, přidá se 0,5 ml 50mM roztoku K_2CO_3 v methanolu a třepe se za laboratorní teploty na třepačce 8 hodin.

Methanolickeý roztok se poté odpipetuje od pevné fáze, k ní se přidá 0,5 ml vody, protřepe se, voda se opět odpipetuje a přidá se k methanolickeému roztoku odblokovaného oligonukleotidu.

20 Vznikne tak 1 ml roztoku, který se následně zbaví nízkomolekulárních vedlejších produktů gelovou chromatografií. Roztok surového oligonukleotidu z gelové chromatografie se pak odpaří do sucha, zbytek se rozpustí v definovaném objemu příslušného rozpouštědla a přečistí se na HPLC.

25 Pro analýzu modifikovaných oligonukleotidových sond se aplikuje chromatografická metoda, která umožňuje také semi-preparativní purifikaci, a to při následujících separačních podmínkách: kolona Luna-PhenylHexyl 150×3,0 mm, 5 μ m, izokratická eluce s využitím mobilní fáze ACN:TEAA (83:17, v/v).

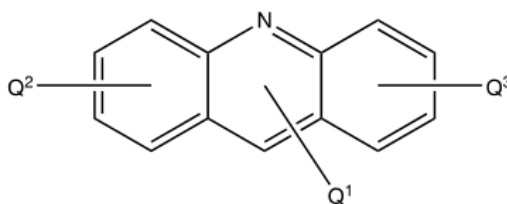
30

Průmyslová využitelnost

Vynález je průmyslově využitelný při výrobě oligonukleotidových DNA sond a činidel pro studium DNA.

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Použití derivátů akridinu obecného vzorce I:

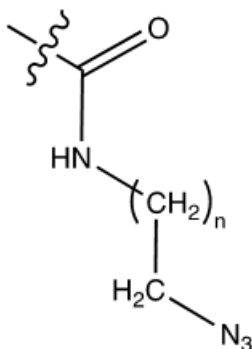


5

(I),

kde:

substituent Q¹ navázaný v kterékoli volné poloze tricyklického jádra představuje skupinu obecného vzorce II:



10

(II),

kde:

n je celé číslo od 0 do 9;

dále substituenty Q² a Q³ navázané v kterékoliv volné poloze tricyklického jádra jsou nezávisle na sobě vybírány ze skupiny zahrnující: -H, -NH₂ a -X-(CH₂)_n-T, kde:

15 X je -CONH-, -O-, -S-, -CH₂-, -NH- nebo -NR¹-, kde R¹ je alkyl nebo aryl;

n je celé číslo od 0 do 10;

T je -COOH, -CONH₂, -CONHR², -CONR²R³, -COOR², -NH₂, -NHR² nebo -NR²R³, kde R² a R³ jsou nezávisle na sobě alkyl nebo aryl;

a dále jejich soli vzniklé reakcí s HCl, H₂SO₄, H₃PO₄ nebo HNO₃

20 jako meziproductů k přípravě interkalátorů zvyšujících pevnost vazby komplementárních řetězců DNA a ovlivňujících její teplotu tání.