

PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

305 332

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.:

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2013-816**
(22) Přihlášeno: **25.10.2013**
(40) Zveřejněno: **06.05.2015**
(Věstník č. 18/2015)
(47) Uděleno: **24.06.2015**
(24) Oznámení o udělení ve věstníku: **05.08.2015**
(Věstník č. 31/2015)

C07D 403/12 (2006.01)
C07D 401/12 (2006.01)
C07D 213/60 (2006.01)
C07D 213/69 (2006.01)
C07D 213/72 (2006.01)
C07D 213/74 (2006.01)
C07D 241/18 (2006.01)
C07D 241/20 (2006.01)
C07C 211/50 (2006.01)
C07C 211/53 (2006.01)
C07C 215/68 (2006.01)
C07H 21/00 (2006.01)

(56) Relevantní dokumenty:

WO 02/101007 A; WO 2008/038018 A; US 4 460 403 A; US 2006/0003349 A.

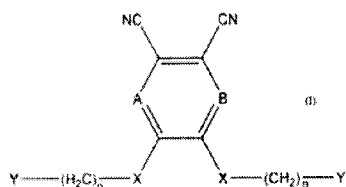
(73) Majitel patentu:
Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta
v Hradci Králové, Hradec Králové, CZ

(72) Původce:
PharmDr. Miroslav Miletín, Ph.D., Vysoká nad
Labem, CZ
PharmDr. Kamil Kopecký, Ph.D., Desná, CZ
PharmDr. Veronika Nováková, Ph.D., Zruč-Senec,
CZ
doc. PharmDr. Petr Zimčík, Ph.D., Hradec Králové,
CZ
Mgr. Antonín Cidlina, Praha 4 - Chodov, CZ
Mgr. Jan Švec, Ph.D., Červený Kostelec, CZ

(74) Zástupce:
Inventia s.r.o., RNDr. Kateřina Hartvichová, Na
Bělidle 3, 150 00 Praha 5

(54) Název vynálezu:
**Použití derivátů pyrazinu a jejich isosterů
jako sloučenin vážících se do malého žlábků
DNA**

(57) Anotace:
Sloučeniny obecného vzorce I pro použití jako látek
vážících se do malého žlábků dvoušroubovice DNA
(minor groove) a v důsledku toho zvyšujících pevnost
vazby komplementárních řetězců DNA účastnících se
interakce, a tedy teplotu tání vznikajícího duplexu.
Řešení je využitelné zejména pro metody identifikace či
kvantifikace nukleových kyselin.



CZ 305332 B6

Použití derivátů pyrazinu a jejich isosterů jako sloučenin vážících se do malého žlábků DNA

5 Oblast techniky

Předkládaný vynález se týká látek schopných vsunout se a vázat do malého žlábků dvoušroubovice DNA (minor groove).

10

Dosavadní stav techniky

Je známo, že molekuly některých sloučenin jsou schopné vsunout se a vázat do malého žlábků dvoušroubovice DNA (minor groove) a v důsledku toho zvyšovat pevnost vazby komplementárních řetězců DNA, účastnících se interakce, a tím teplotu tání vznikajícího duplexu. Pro tyto molekuly se obecně používá anglický termín Minor Groove Binders (MGB).

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 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; WILSON W. D., TANIOUS F. A., MATHIS A. TEVIS D., HALL J. E., BOYKIN D. W. *Biochimie* 2008, vol. 90, p. 999–1014; ARAFA R. K., ISMAIL M. A., MUNDE M., WILSON W. D., WENZLER T., BRUN R., BOYKIN D. W. *Eur. J. Med. Chem.* 2008, vol. 4, p. 2901–2908; BARALDI P. G., BOVERO A., FRUTTAROLO F., PRETI D., TABRIZI M. A., PAVANI M. G., ROMAGNOLI R. *Med. Res. Rev.* 2004, vol. 24, p. 475–528). 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. Velkou oblastí využití MGB je potom molekulární biologie a diagnostika. Ke stabilizaci duplexů DNA lze využít i látky s interkalační aktivitou (US 4 835 263), MGB jsou však zpravidla k tomuto účelu výhodnější. Mezi nejvýznamnější molekuly z této skupiny patří sloučeniny typu Hoechst (PJURA P. E., GRZESKOWIAK K., DICKERSON R. E. *J. Mol. Biol.* 1987, vol. 197, p. 257–271).

Strukturně jsou MGB poměrně různorodé, uvedenou aktivitu vykazují molekuly typu heterocyklických oligoamidů (netropsin, distamycin a jejich analogy), diamidino- resp. diguanidinosubstituované látky (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. Relativně novější aplikací MGB s velkým významem pro praxi

je jejich využití ke stabilizaci duplexů nukleových kyselin, vznikajících při molekulárně biologických a genetických metodách, využívaných pro detekci cílové sekvence DNA, mutací, apod. K tomuto účelu je patentováno využití přírodních látek typu distamycinu a jeho derivátů či jiných oligoamidických molekul (US 5 955 590; US 6 949 367). 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.

V současné době existuje za tímto účelem několik přímých chemických modifikací nukleových kyselin a minimálně u dvou z nich byla jejich komercializace úspěšná. Jedná se o tzv. Locked nucleic acids (LNA, O2'–C4'–methylenovou skupinou přemostěný cyklus ribosy, např. Metabion GmbH; www.metabion.com/) a Bridged Nucleic Acids (BNA, O2'–C4'–methylenamino-skupinou přemostěný cyklus ribosy, např. Biosynthesis Inc.; <http://www.biosyn.com/>).

Z MGB využívají molekuly nezveřejněné struktury komerčně např. firmy Exiqon A/S (<http://www.exiqon.com/lna-technology>), Nanogen Inc. (a) <http://nanogen.com> b) <http://www.groovebiopharma.com/?q=node/10>) a Applied Biosystems Inc. (nyní Life Technologies Corp.; <http://www.lifetechnologies.com/cz/en/home.html>). Podobné modifikace jsou nyní široce využívány v molekulární biologii. Potenciál těchto látek, vázaných na syntetické molekuly nukleových kyselin, je tedy zejména jejich použití ve vývoji a výrobě diagnostik a potenciálně také jako nová genová terapeutika. Dosud se ve světovém měřítku k tomuto účelu používají 2 až 3 takové molekuly, nejsou však vhodné pro všechny aplikace, neboť jsou do značné míry sekvenčně specifické. Nejčastěji používaný je pravděpodobně CDPI₃ (trimer–amid 1,2–dihydro–(3*H*)–pyrrolo[3,2–*e*]indol–7–karboxylové kyseliny) a několik jeho derivátů. Základní struktura, 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). Použití podléhá patentové ochraně, je velmi nákladné a CDPI₃ také není vhodný pro všechny aplikace (US 5 801 155, US 6 084 102, US 7 582 739 B2, US 2011/0172289 A1). Není běžně dostupný jako modifikující chemikálie, pouze ve formě již kompletně nasyntetizovaných oligonukleotidových sond (US 7 205 105 B2). Lze ho využít pro modifikaci oligonukleotidů na 3'– nebo 5'–konci oligonukleotidu (US 2013/0030166 A1).

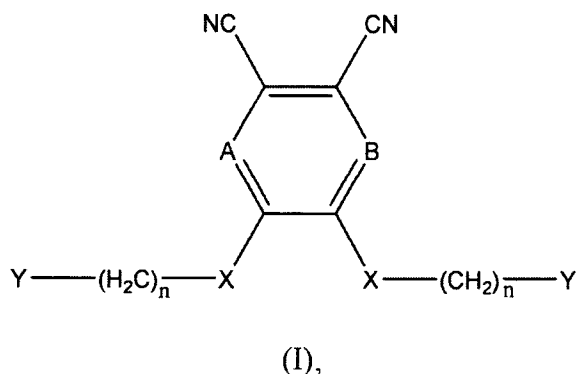
O dosažení vyšší stability duplexu DNA se snaží kromě uvedených i další technologie, např. vazba organických polyaminů (<http://www.metabion.com/products/zna.php>; NOIR R., KOTERA M., PONS B., REMY J. S., BEHR J. P. *J. Am. Chem. Soc.* 2008, vol. 130, p. 13500–13505; US 8 465 921).

Většina chemických sloučenin používaných jako sloučeniny vážící se do malého žlábků dvoušroubovice DNA jsou flexibilní molekuly obsahující několik aromatických jader spojených můstky (např. distamycin) nebo naopak malé rigidní molekuly typu benzimidazolu s vlastní fluorescencí, která může v některých aplikacích využívajících fluorescenční barviva s emisí v nižších vlnových délkách rušit stanovení. Přetrvává potřeba poskytnout sloučeniny vážící se do malého žlábků dvoušroubovice DNA, které by byly flexibilní, ale zároveň snadno připravitelné, s nízkou molekulovou hmotností a bez vlastní fluorescence.

Podstata vynálezu

Předmětem vynálezu je *in vitro* použití látek obecného vzorce I jako sloučenin vážících se do malého žlábků dvoušroubovice DNA. Jsou to bazické molekuly na bázi aromatického kruhu substituovaného dvěma CN skupinami a dále substituovaného flexibilními uhlíkovými řetězci obsahujícími heteroatom, které jsou schopné vhodného prostorového zakřivení molekuly a díky přítomnosti volných elektronových párů tvorby vodíkových vazeb s dusíky nukleových bází.

Vynález se týká sloučenin obecného vzorce I



kde A a B vzájemně nezávisle značí N nebo CH;

5 X je vybrán ze skupiny obsahující kyslík, síru;

n = 1 až 10;

10 Y je vybrán ze skupiny obsahující NH₂, NH(alkyl), N(alkyl)₂, NH(hydroxyalkyl), N(hydroxyalkyl)₂, NH(alkyloxyalkyl), N(alkyloxyalkyl)₂, NH(hydroxyalkyloxyalkyl), N(hydroxyalkyloxyalkyl)₂;

příčemž alkyl obsahuje 1 až 6 atomů uhlíku a cykloalkyl obsahuje 3 až 8 atomů uhlíku.

15 Vynález se dále týká solí sloučenin obecného vzorce I vytvořených reakcí substituentu Y s anorganickou kyselinou, s výhodou vybranou ze skupiny zahrnující HCl, H₂SO₄, H₃PO₄ a HNO₃.

20 Předmětem vynálezu je použití látek obecného vzorce I nebo jejich solí vzniklých reakcí substituentu Y s anorganickou kyselinou, s výhodou vybranou ze skupiny zahrnující HCl, H₂SO₄, H₃PO₄ a HNO₃, jako látek vážících se do malého žlábků dvoušroubovice DNA (minor groove). V důsledku toho tyto látky zvyšují pevnost vazby komplementárních řetězců DNA účastnících se interakce (Minor Groove Binder (MGB)), vedoucí ke zvýšení teploty tání duplexu DNA.

25 Nově bylo zjištěno, že látky obecného vzorce I je možné použít jako látky vážící se do malého žlábků dvoušroubovice DNA. Jejich předností je snadná příprava, nízká molekulová hmotnost, bazicita a flexibilita a absence vlastní fluorescence. 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. 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. Vynález je rovněž užitečný pro metody identifikace či kvantifikace nukleových kyselin.

35

Objasnění výkresů

40 Obr. 1 znázorňuje graf zvýšení teploty tání duplexu DNA v závislosti na koncentraci testované sloučeniny II.

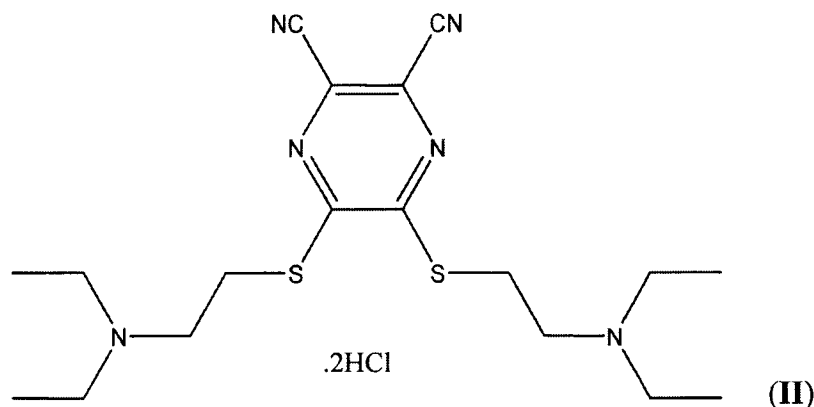
Obr. 2 ukazuje graf zvýšení teploty tání duplexu DNA v závislosti na koncentraci testované sloučeniny III.

Příklady uskutečnění vynálezu

Příklad 1

5

Příprava a charakterizace sloučeniny vzorce II

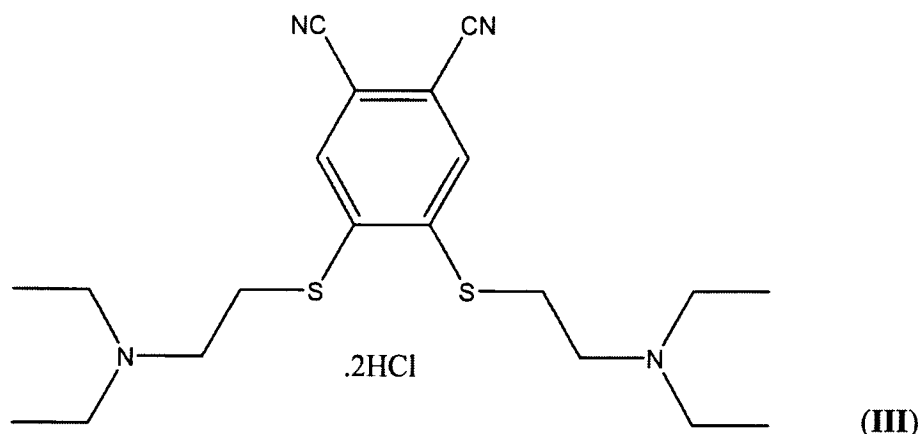


- 10 Roztok 2-(diethylamino)ethanthiol-hydrochloridu (3,56 g, 21 mmol) ve vodě (20 ml) se smísil s 1M roztokem NaOH (43,5 ml, 43,5 mmol) a míchal se při pokojové teplotě 10 minut. Poté se
- 15 přidal najednou roztok 5,6-dichlorpyrazin-2,3-dikarbonitrilu (2 g, 10 mmol) v tetrahydrofuranu (50 ml) a směs se míchala dále 30 minut při pokojové teplotě. Ke směsi se následně přidal diethylether (50 ml), organická fáze se oddělila a vodná promyla ještě dvakrát diethyletherem. Orga-
- 20 nické fáze byly spojeny, odpařeny, znovu rozpuštěny v diethyletheru a přefiltrovány. Dále byl roztok třikrát vytřepán s okyselenou vodou (HCl). Vodná fáze byla zneutralizována (do mírně bazické reakce) roztokem NaOH a produkt byl třikrát vytřepán do diethyletheru. Organická fáze byla vysušena (Na₂SO₄), odpařena a produkt byl přečištěn sloupcovou chromatografií na silikagelu (aceton/diethylether 1:1). Frakce s čistým produktem nebyly odpařeny, ale produkt byl
- 25 ihned převeden na dihydrochlorid probubláním plynným HCl. Byla získána bílá pevná látka, která poskytla čistý produkt po překrystalizování ze směsi methanol/diethylether. Výtěžek: 3,95 g (84 %). Data pro dihydrochlorid 5,6-bis[2-(diethylamino)ethylsulfanyl]pyrazin-2,3-dikarbonitrilu: T.t. 215 až 217 °C za rozkladu. IČ (KBr) 2995, 2983, 2927, 2587, 2560, 2455, 2237(CN), 1486, 1459, 1317, 1160, 1140, 983. ¹³C NMR (CD₃OD) δ 9,5, 25,3, 50,4, 114,8, 128,5, 159,9.
- ¹H NMR (CD₃OD) δ 4,85 (s, 2H, NH), 3,80 – 3,68 (m, 4H, S-CH₂), 3,54 – 3,43 (m, 4H, N-CH₂), 3,36 (q, 8H, J = 7,3 Hz, N-CH₂), 1,42 (t, 12H, J = 7,4 Hz, CH₃).

Příklad 2

30

Příprava a charakterizace sloučeniny vzorce III



K bezvodému uhličitanu draselnému (7,7 g, 57 mmol) byl přidán dimethylsulfoxid (100 ml) a směs byla ponořena do ultrazvukové lázně na 30 minut. Poté byl do směsi přidán hydrochlorid 2-(diethylamino)ethanthiolu (3,39 g, 20 mmol). Po úplném rozpuštění hydrochloridu 2-(diethylamino)ethanthiolu byl do směsi přidáván po částech 4,5-dichlorftalonitril (1,576 g, 8 mmol) po dobu 2 hodin. Reakce se zřetelně zbarvovala do žluté barvy. Poté byla reakční směs míchána 24 hodin za pokojové teploty. Po ukončení reakce byla suspenze převedena do kádinky s ledem a vodou. Produkt se vysrážel a byl následně odfiltrován. Kvůli potenciálně špatné stabilitě byl produkt převeden na stabilnější dihydrochlorid a dále čištěn v této formě. Vysušený produkt byl rozpuštěn v diethyletheru (100 ml) a za stálého míchání byl roztok sycen plynným HCl (vyvíjen pomocí NaCl + H₂SO₄). Vysrážený dihydrochlorid byl odfiltrován a získaný produkt následně překrystalizován ze směsi isopropanol (70 ml): ethanol (200 ml). Bylo připraveno 2,46 g bílé, pevné krystalické látky, což odpovídá výtěžku 66 %. Data pro dihydrochlorid 4,5-bis[2-(diethylamino)ethylsulfanyl]ftalonitrilu: T.t. 239 až 244 °C za rozkladu, elementární analýza (%) pro C₂₀H₃₂Cl₂N₄S₂: C 51,82; H 6,96; N 12,09; S 13,84; nalezeno: C 51,55; H 6,91; N 12,25; S 13,28. ¹H NMR (300 MHz, D₂O) δ (ppm) 7,94 (s, 2H, ArH), 3,60 – 3,42 (m, 8H, CH₂), 3,31 (q, 9H, J = 7,3 Hz, CH₂), 1,31 (t, 12H, J = 7,3 Hz, CH₃). ¹³C NMR (75 MHz, D₂O) δ (ppm) 142,9; 131,8; 116,3; 113,1; 50,4; 48,4; 27,1; 8,8.

Příklad 3

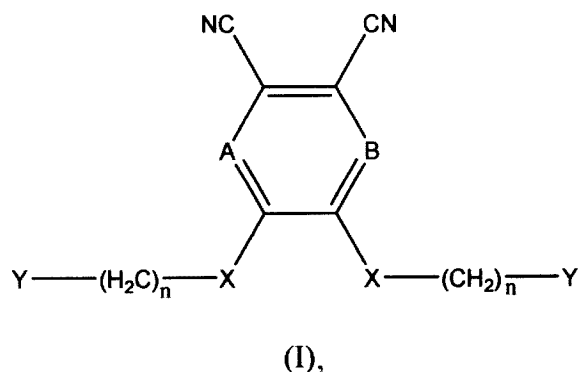
Metoda stanovení vlivu látek na zvýšení teploty tání duplexu DNA a k použití látek obecného vzorce (I)

Metoda se provádí ve vodném prostředí za přítomnosti pufru pro Taq polymerázu, používaném běžně pro PCR. V roztoku jsou přítomny 2 navzájem komplementární oligonukleotidy. Jeden je značen fluoroforem na 5'-konci (FAM) a druhý zhášecem na 3'-konci (BHQ-1). Stanovení teploty tání duplexu se provádí v přístroji pro real-time PCR, kde dochází k postupnému zvyšování teploty ze stavu, kdy jsou oligonukleotidy vázány v duplexu, až do teploty, kdy jsou oligonukleotidy denaturovány. Denaturace je doprovázena zvýšením fluorescence, neboť vzdálenost mezi zhášecem a fluoroforem je v denaturovaném stavu větší a nedochází ke zhášení fluoroforu zhášecem.

Zvyšování teploty tání probíhá v přírůstcích 0,2 °C každých 5 s. Ve stejných intervalech je měřena fluorescence v každé z 96 jamek na destičce. Výsledkem je záznam, kdy na ose x je teplota a na ose y fluorescence. Derivací změny fluorescence podle teploty získáme graf, kde maxima odpovídají teplotě tání duplexu. Na jedné desce se vyhodnocuje škála koncentrací (200 μM až 32 nM) analyzované látky a látky lze mezi sebou porovnat podle koncentrace, ve které účinně zvyšují teplotu tání. Pro analýzu se mohou použít různé dvojice oligonukleotidů. Výsledky stanovení vlivu látek vzorce II a III na zvýšení teploty tání duplexu DNA jsou uvedeny na obr. 1 a 2.

PATENTOVÉ NÁROKY

- 5 1. Použití *in vitro* sloučenin obecného vzorce I



kde A a B vzájemně nezávisle značí N nebo CH;

10

X je vybrán ze skupiny obsahující kyslík, síru;

n = 1 až 10;

15

Y je vybrán ze skupiny obsahující NH₂, NH(alkyl), N(alkyl)₂, NH(hydroxyalkyl), N(hydroxyalkyl)₂, NH(alkyloxyalkyl), N(alkyloxyalkyl)₂, NH(hydroxyalkyloxyalkyl), N(hydroxyalkyloxyalkyl)₂,

20

příčemž alkyl obsahuje 1 až 6 atomů uhlíku a cykloalkyl obsahuje 3 až 8 atomů uhlíku; a/nebo jejich soli vytvořených reakcí substituentu Y s anorganickou kyselinou, jako látek vážících se do malého žlábků dvoušroubovice DNA.

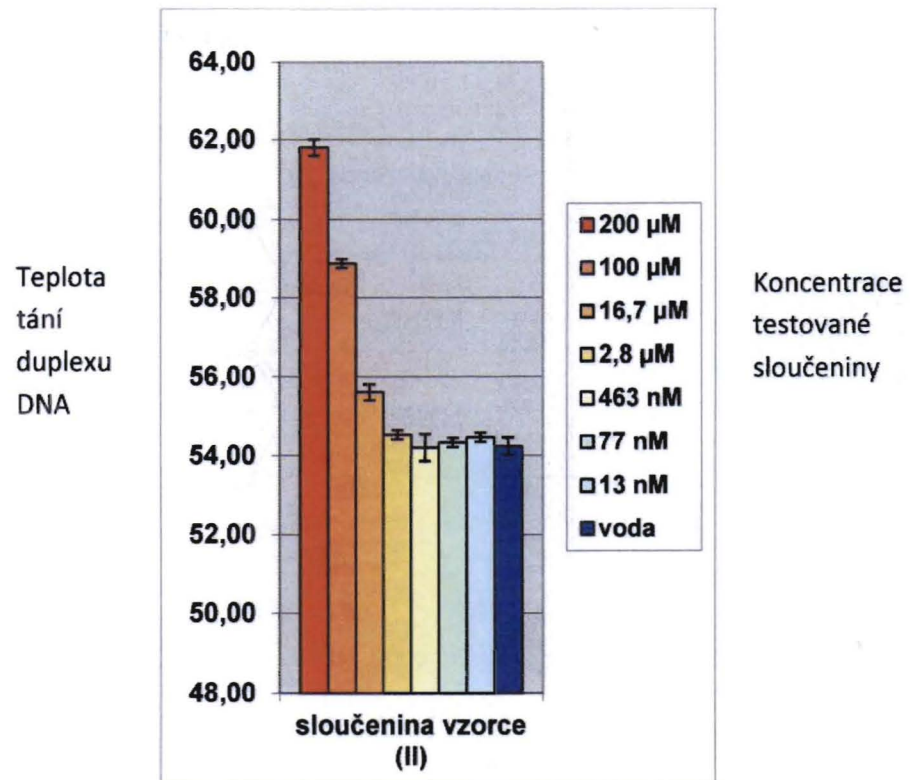
25

2. Použití látky obecného vzorce I a/nebo její soli podle nároku 1 pro zvýšení pevnosti vazby komplementárních řetězců DNA účastnících se interakce, a tedy teploty tání vznikajícího duplexu.

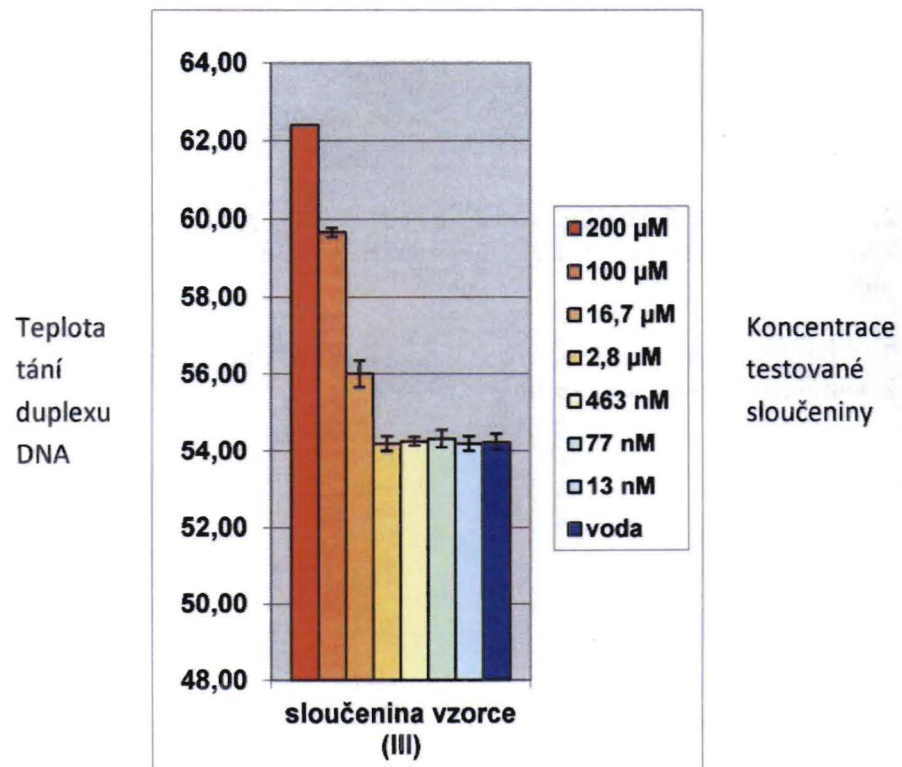
30

3. Použití látky obecného vzorce I a/nebo její soli podle nároku 1 pro metody identifikace či kvantifikace nukleových kyselin.

1 výkres



Obr. 1



Obr. 2