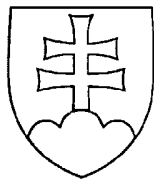


SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19) SK



ÚRAD  
PRIEMYSELNÉHO  
VLASTNÍCTVA  
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

## PATENTOVÝ SPIS

- (21) Číslo prihlášky: **631-98**  
(22) Dátum podania prihlášky: **8. 11. 1996**  
(24) Dátum nadobudnutia účinkov patentu: **6. 11. 2001**  
Vestník ÚPV SR č.: **11/2001**  
(31) Číslo prioritnej prihlášky: **95/13490**  
(32) Dátum podania prioritnej prihlášky: **14. 11. 1995**  
(33) Krajina alebo regionálna organizácia priority: **FR**  
(40) Dátum zverejnenia prihlášky: **4. 11. 1998**  
Vestník ÚPV SR č.: **11/1998**  
(47) Dátum sprístupnenia patentu verejnosti: **1. 10. 2001**  
(62) Číslo pôvodnej prihlášky v prípade vylúčenej prihlášky:  
(86) Číslo podania medzinárodnej prihlášky podľa PCT: **PCT/FR96/01774**  
(87) Číslo zverejnenia medzinárodnej prihlášky podľa PCT: **WO97/18185**

(11) Číslo dokumentu:

# 282 173

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.<sup>7</sup>:

**C07C 237/06**  
**C07K 5/06**  
**A61K 47/48**  
**C12N 15/87**  
**C12N 15/88**  
**A61K 48/00**

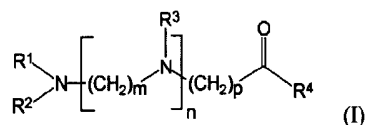
(73) Majiteľ: **RHONE-POULENC RORER S. A., Antony, FR;**

(72) Pôvodca: **Byk Gérardo, Créteil, FR;**  
**Scherman Daniel, Paris, FR;**  
**Schwartz Bertrand, Maisons-Alfort, FR;**  
**Dubertret Catherine, Sévres, FR;**

(74) Zástupca: **Čechvalová Dagmar, Bratislava, SK;**

(54) Názov: **Lipopolyamíny ako transfekčné činidlá, spôsob ich prípravy a farmaceutické kompozície s ich obsahom**

(57) Anotácia:  
Opisujú sa lipopolyamíny všeobecného vzorca (I), v ktorom jednotlivé substituenty sú definované v patentových nárokoch, farmaceutické kompozície, ktoré tieto lipopolyamíny obsahujú, a ich použitie na transfekciu *in vitro* alebo *in vivo* do buniek.



### Oblasť techniky

Vynález sa týka nových zlúčenín, ktoré sú blízke skupine lipopolyamínov, farmaceutických kompozícií, ktoré tieto zlúčeniny obsahujú, ich použitia na transfekciu *in vivo* a alebo/ *in vitro* nukleových kyselín a spôsobu ich prípravy.

### Doterajší stav techniky

Mnohé genetické choroby súvisia s defektnou a alebo/ abnormálnou expresiou, t. j. s nedostatočnou alebo nadmernou expresiou jednej alebo niekoľkých nukleových kyselín. Jedným z hlavných cieľov gémovej terapie je korigovať tento typ genetických anomálií realizáciou bunkovej expresie *in vivo* alebo *in vitro* klonovaných génov.

V súčasnosti sa navrhuje niekoľko spôsobov doručenia potrebnej genetickej informácie dovnútra bunky. Jeden z týchto spôsobov spočíva v použití chemických alebo biochemických vektorov. Uvedené syntetické vektory majú dve základné funkcie, ktoré spočívajú v zahutnení DNA určenej na transfekciu a podporení väzby DNA v cieľovej bunke a jej prechodu cez plazmovú membránu a prípadne cez obe jadrové membrány.

Výrazný pokrok pri tomto spôsobe transfekcie sa dosiahol vývojom technológie založenej na použití kationového lipidu. Dokázalo sa totiž, že kladne nabitý kationový lipíd, ktorým je N-[1-(2,3-dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimetylamónium chlorid (DOTMA), spontánne interferuje vo forme lipozómov alebo malých vačkov (vezikúl) s DNA, ktorá je nabitá záporne, pričom vznikajú komplexy lipidy-DNA, ktoré sú schopné fúzovať s bunkovými membránami, a umožňujú tak vnútrobunkovú dodávku. Ale, nech už je táto molekula akokoľvek účinná na úrovni transfekcie, vyznačuje sa nevýhodou spočívajúcou v tom, že nie je biologicky odbúrateľná a má proti bunkám toxický charakter.

Od okamihu, keď sa pripravil lipíd DOTMA, sa vyvinuli ďalšie kationové lipidy na základe štruktúrneho modelu: lipofilná skupina spojená s aminoskupinou prostredníctvom ramena, ktoré sa označuje ako „spacer“. Z týchto kationových lipidov možno uviesť najmä zlúčeniny, ktoré ako lipofilnú skupinu obsahujú dve mastné kyseliny alebo derivát cholesterolu, a ktoré okrem toho prípadne obsahujú miesto aminoskupiny kvartérnu amóniovú skupinu. Ako reprezentantov tejto kategórie kationových lipidov možno uviesť najmä lipidy DOTAP, DOBT alebo ChOTB. Ďalšie zlúčeniny takéhoto typu, ako napríklad DOCS a ChOSC, sa vyznačujú prítomnosťou cholinovej skupiny miesto kvartérnej amóniovej skupiny. Vo všeobecnosti však možno konštatovať, že transfekčná účinnosť týchto zlúčenín je pomerne nízka.

Opisuje sa aj iná kategória kationových lipidov, ktorú tvoria lipopolyamíny. V rámci vynálezu výraz lipopolyamín označuje amfifilnú molekulu obsahujúcu aspoň jednu polyamínovú hydrofilnú oblasť spojenú oblasťou nazývanou spacer s lipofilnou oblasťou. Kationovo nabitá polyamínová oblasť lipopolyamínov je schopná viazať sa reverzibilným spôsobom s negatívne nabitou nukleovou kyselinou. Táto interakcia silne zahusťuje nukleovú kyselinu. Lipofilná oblasť robí túto iónovú interakciu necitlivú proti vonkajšiemu prostrediu tým, že pokrýva vytvorenú časticu lipidovým povlakom. V tomto type zlúčenín môže byť kationová skupina reprezentovaná napríklad L-5-karboxysperminovou skupinou, ktorá obsahuje štyri amóniové skupiny, z toho dve primárne a dve sekundárne. Ako príklady týchto zlúčenín možno uviesť najmä DOGS a

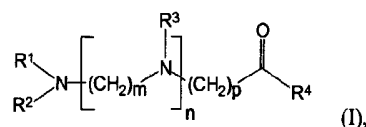
DPPEs. Tieto lipopolyamíny sú obzvlášť účinné na transfekciu primárnych endokrinných buniek.

Ideálne syntetické transfekčné činidlo by v skutočnosti malo zaisťovať vysokú mieru transfekcie, a to pre široké spektrum buniek, malo by mať pri aplikačných dávkach nulovú alebo veľmi nízku toxicitu a v neposlednom rade by malo byť biodegradovateľné, aby sa zamedzilo všetkým vedľajším účinkom na úrovni ošetrovaných buniek.

Cieľom vynálezu je navrhnúť nové lipopolyamíny s originálnou polyamínovou frakciou, ktoré by boli schopné účinného použitia na transfekciu *in vitro* a/alebo *in vivo* buniek a najmä schopné použitia na vektorizáciu nukleových kyselín.

### Podstata vynálezu

Predmetom vynálezu sú lipopolyamíny s konfiguráciou D, L alebo LD a ich soli všeobecného vzorca (I)



v ktorom

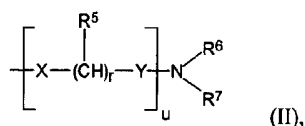
$R^1$ ,  $R^2$  a  $R^3$  nezávisle jeden od druhého znamenajú atóm vodíka alebo skupinu  $-(CH_2)_q-NRR'$ , v ktorej  $q$  môže mať hodnotu 1, 2, 3, 4, 5 a 6, pričom môže mať v jednotlivých skupinách  $R^1$ ,  $R^2$  a  $R^3$  rovnaký alebo odlišný význam, a

$R$  a  $R'$  nezávisle od seba znamenajú atóm vodíka alebo skupinu  $-(CH_2)_{2q}NH_2$ , v ktorej

$q'$  môže mať hodnotu 1, 2, 3, 4, 5 a 6, pričom môže mať v jednotlivých skupinách  $R$  a  $R'$  rovnaký alebo odlišný význam,

$m$ ,  $n$  a  $p$  nezávisle od seba znamenajú celé číslo od 0 do 6, pričom, ak je  $n$  vyššie než 1,  $m$  môže mať rôzne hodnoty a  $R^3$  môže mať rôzne významy v rámci všeobecného vzorca (I), a

$R^4$  znamená skupinu všeobecného vzorca (II)



v ktorom

$R^6$  a  $R^7$  nezávisle od seba znamenajú atóm vodíka alebo nasýtenú alebo nenasýtenú alifatickú skupinu obsahujúcu 10 až 22 uhlíkových atómov, pričom aspoň jeden zo symbolov  $R^6$  a  $R^7$  je odlišný od atómu vodíka,

$u$  znamená celé číslo od 0 do 10, pričom, ak  $u$  znamená celé číslo vyššie než 1, symboly  $R^5$ ,  $X$ ,  $Y$  a  $r$  môžu mať v jednotlivých štruktúrnych jednotkách  $(X-(CHR^5))_r$  odlišné významy,

$X$  znamená atóm kyslíka, atóm síry alebo monoalkylovanú alebo nemonoalkylovanú aminoskupinu,

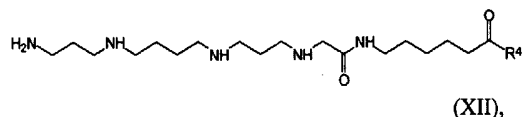
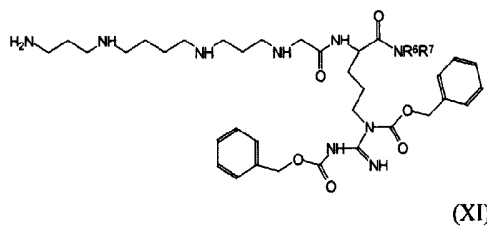
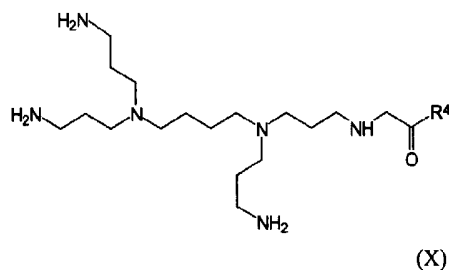
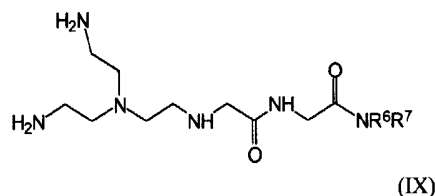
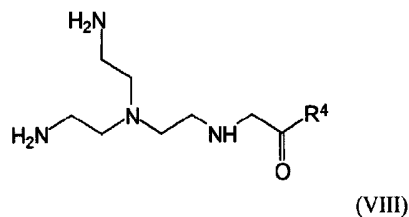
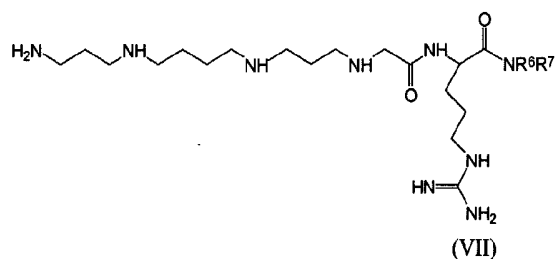
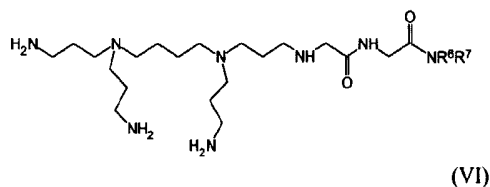
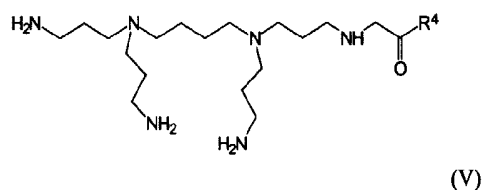
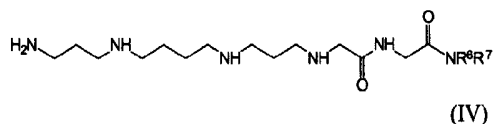
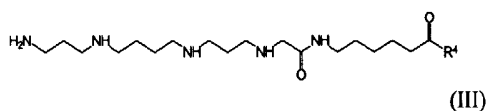
$Y$  znamená karbonylovú alebo metylénovú skupinu,  $R^5$  znamená atóm vodíka alebo bočný reťazec prírodnej aminokyseliny, ktorý je prípadne substituovaný, a

$r$  znamená celé číslo od 1 do 10, pričom ak  $r$  sa rovná 1,  $R^5$  znamená bočný reťazec prírodnej aminokyseliny, ktorý je prípadne substituovaný, a ak  $r$  je väčšie než 1,  $R^5$  znamená atóm vodíka.

Pod pojmom bočný reťazec prírodnej aminokyseliny sa v rámci vynálezu rozumejú najmä reťazce obsahujúce amidínové štruktúrne jednotky, ako napríklad bočný reťazec arginínu. Ako sa už uviedlo, môže byť tento reťazec substituovaný nasýtenými alebo nenasýtenými priamymi, rozvetvenými alebo cyklickými alifatickými skupinami obsahujúcimi 1 až 24 uhlíkových atómov, akými sú napríklad cholesterylová skupina, arachidonylová skupina alebo retinoylová skupina, alebo mono- alebo polyaromatickými skupinami, akými sú napríklad substituované alebo nesubstituované benzyloxykarbonylové, benzylesterové alebo rodaminylové deriváty.

Uvedené nové zlúčeniny všeobecného vzorca (I) sa môžu vyskytovať vo forme farmaceuticky prijateľných netoxických solí. Tieto netoxické soli zahŕňajú soli s minerálnymi kyselinami (s kyselinou chlorovodíkovou, kyselinou sírovou, kyselinou bromovodíkovou, kyselinou fosforečnou alebo kyselinou dusičnou) alebo s organickými kyselinami (s kyselinou octovou, kyselinou propiónovou, kyselinou jantárovou, kyselinou maleínovou, kyselinou hydroxymaleínovou, kyselinou benzoovou, kyselinou fumarovou, kyselinou metánsulfónovou alebo kyselinou šťaveľovou) alebo s minerálnymi bázami (s hydroxidom draselným, hydroxidom sodným, hydroxidom lítym alebo oxidom vápenatým) alebo s organickými bázami (s terciárnymi amínmi, napríklad s trietylaminom, alebo s piperidínom alebo benzylaminom).

Ako príklady zlúčenín podľa vynálezu možno uviesť najmä zlúčeniny nasledovných všeobecných podvzorcov:



v ktorých symboly  $R^4$ ,  $R^6$  a  $R^7$  majú uvedené významy. Výhodne  $R^4$  znamená skupinu  $NR^6R^7$ , v ktorej  $R^6$  a  $R^7$  figurujúce v podvzorcoch (III) až (XII) znamenajú identickú skupinu vybranú z množiny zahŕňajúcej skupiny  $(CH_2)_{17}CH_3$ ,  $(CH_2)_{11}CH_3$ ,  $(CH_2)_{13}CH_3$  a  $(CH_2)_{12}CH_3$ .

V rámci obzvlášť výhodného uskutočnenia obsahujú nárokované zlúčeniny navyše zameriavací prvok umožňujúci orientovať prenos nukleovej kyseliny, na ktorú sú naviazané uvedené zlúčeniny. Tento zameriavací prvok je zabudovaný v zlúčenine všeobecného vzorca (I) na úrovni bočného reťazca aminokyseliny reprezentovaného všeobecným substituentom  $R^5$ . Výhodnejšie je tento zameriavací prvok viazaný kovalentne alebo nekovalentne na zlúčeninu podľa vynálezu.

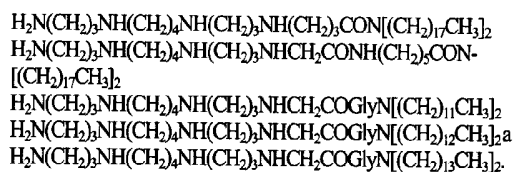
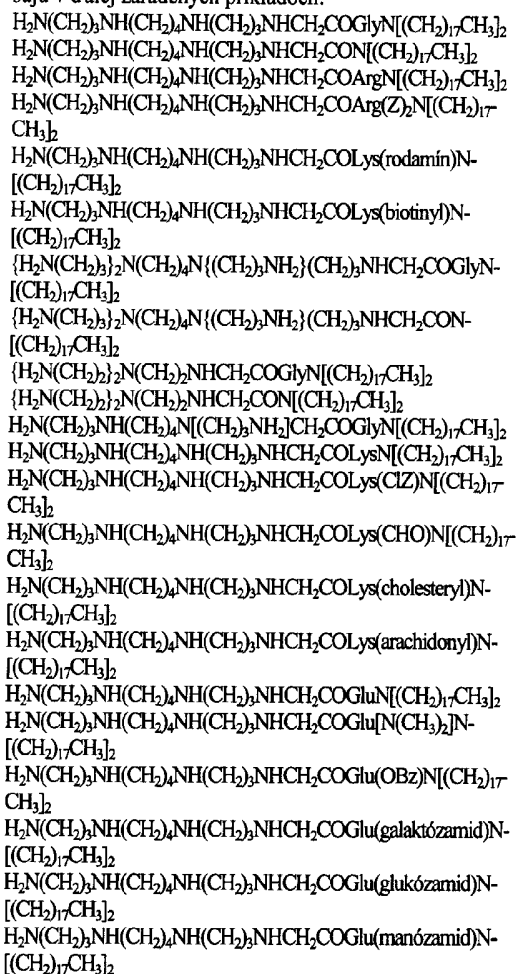
Môže ísť o extracelulárny zameriavací prvok, ktorý umožňuje orientovať prenos nukleovej kyseliny do niektorých bunkových typov alebo do niektorých požadovaných tkanív (nádorové bunky, hepatopoetické bunky, atď.). Z tohto hľadiska môže ísť o bunkový receptorový ligand prítomný na povrchu cieľového bunkového typu, ako napríklad cukor, folát, transferín, inzulín, azialoorozomukoidný proteín alebo o akúkoľvek bioaktívnu molekulu rozlíšenú

extracelulárnymi receptormi. Môže ísť aj o intracelulárny zameriavací prvok, umožňujúci orientovať prenos nukleovej kyseliny do určitých privilegovaných bunkových oblastí (mitochondrie, jadro, atď.), ako napríklad o signálnu sekvenciu jadrovej lokalizácie (nls), ktorá uprednostňuje akumuláciu transfekovanej DNA v jadre bunky.

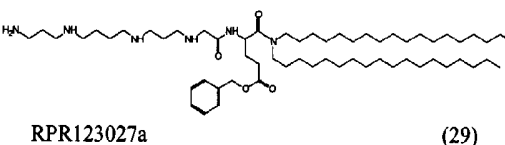
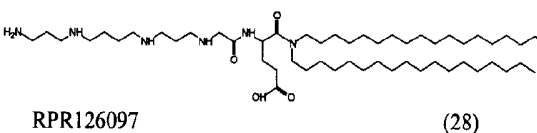
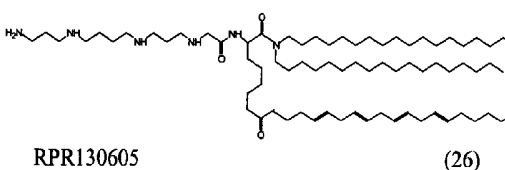
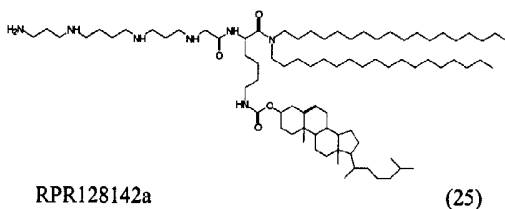
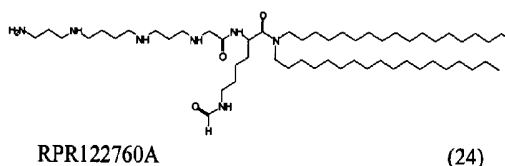
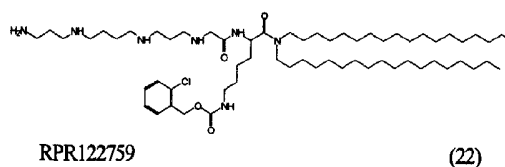
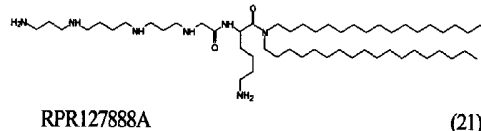
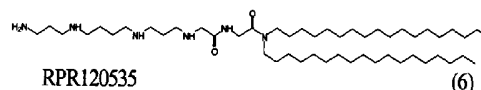
Z hľadiska všeobecnejšej špecifikácie zameriavacie prvky, ktoré sú schopné použitia v rámci vynálezu, zahŕňajú cukry, peptidy, oligonukleotidy, steroidy alebo lipidy. Výhodne ide o cukry a alebo/ peptidy, akými sú protilátky alebo fragmenty protilátok, ligandy bunkových receptorov alebo ich fragmenty, receptory alebo fragmenty receptorov, a pod. Môže ísť najmä o ligandy receptorov rastových faktorov, receptory cytokínov, receptory bunkových lektínov alebo receptory adhézných proteínov, akými sú integríny. Možno uviesť aj receptor transferínu, lipidy HDL a lipidy LDL. Zameriavacím prvkom môže byť aj cukor umožňujúci zacieliť lektíny, ako azialoglykoproteínové receptory, alebo aj fragment Fab protilátky umožňujúci zacieliť receptor fragmentu Fc imunoglobulínov.

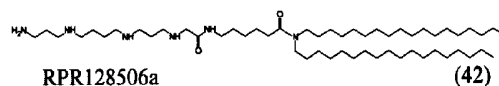
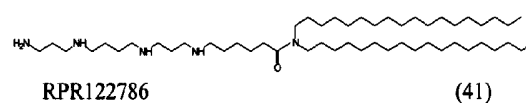
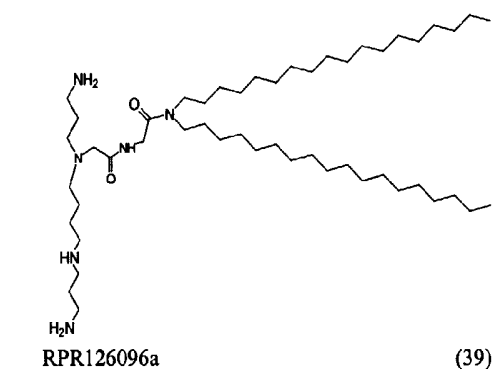
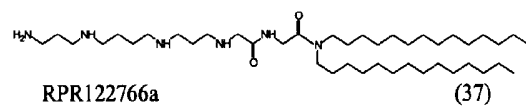
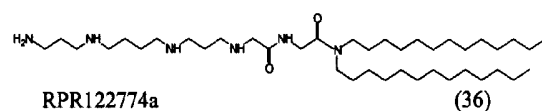
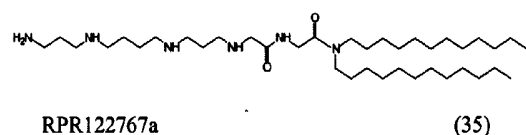
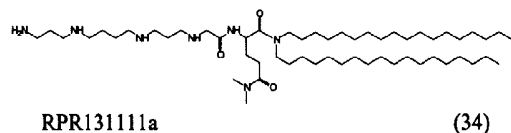
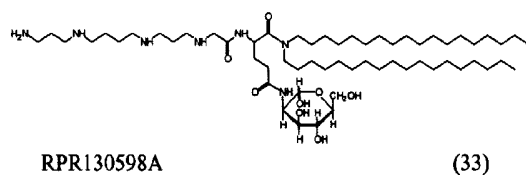
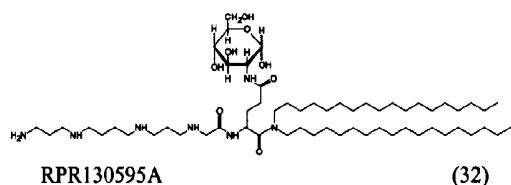
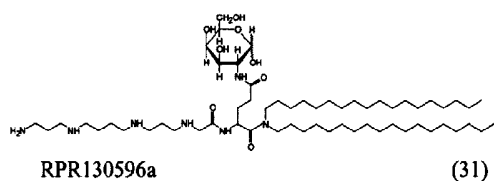
Rovnako možno počítať aj so spojením zlúčeniny všeobecného vzorca (I) s markerom typu biotínu, rodamínu alebo folátu, ktorý je napríklad viazaný na bočný reťazec aminokyseliny R<sup>5</sup>. Týmto markerom môže byť aj priama alebo cyklická peptidová, alebo pseudopeptidová sekvencia zahŕňajúca rozlišovací epitop Arg-Gly-Asp primárnych a alebo/ sekundárnych receptorov adhézných proteínov typu integrínov.

Ako príklady nárokováných lipopolyamínov možno uviesť najmä nasledovné zlúčeniny, ktoré sa detailnejšie opisujú v ďalej zaradených príkladoch:



Ako príklady obzvlášť reprezentatívnych zlúčenín podľa vynálezu možno uviesť najmä zlúčeniny nasledovných vzorcov:





V rámci vynálezu sa navyše vyvinula pôvodná metódika v tuhej fáze na prípravu asymetrických funkcionalizovaných polyamínov, z ktorých sa odvodzujú polyamíny podľa vynálezu.

Pri klasickom spôsobe je prístup k asymetrickým funkcionalizovaným aminoskupinám obmedzený nutnosťou zaviesť do lineárnych alebo rozvetvených polyamínov selektívnym spôsobom určitú modifikáciu. Chemické rozdiely medzi primárnymi a sekundárnymi aminoskupinami polyamínu vyžadujú pri uskutočňovaní reakcií, medzi ktoré patria alkylácie, adície Michaelovho typu a acylácie, značnú selektivitu. Navyše selektivita vynútená takýmito chemickými rozdielmi nie je zlučiteľná so selektívnou alkyláciou v skupine niekoľkých primárnych a sekundárnych aminoskupín, ako je to bežné pri polyamínoch. Klasickou odpoveďou na takéto reštrikcie je tvorba asymetrických funkcionalizovaných polyamínov z blokovaných monomérov nesúcich na jednej strane aminoskupinu schopnú polyaminácie a na druhej strane vhodnú chránenú asymetrickú funkciu. Tento prístup teda vyžaduje náročnú niekoľkostupňovú syntézu a najmä ortogonálnu ochranu funkčných skupín.

Metóda vyvinutá v rámci vynálezu má za cieľ eliminovať nedostatky, ktorými sa až doteraz vyznačoval uvedený spôsob syntézy. Výhodou metódy podľa vynálezu je skutočnosť, že vedie pohodlne a rýchlo k polyamínom, ktoré sú selektívne funkcionalizované na jedinej primárnej aminoskupine alkyláciou alebo redukčnou alkyláciou symetrických polyamínov.

Podstata nárokovaného spôsobu je založená na použití syntéznej metódy v tuhej fáze uskutočnenej s cieľom uprednostniť bimolekulárnu reakciu medzi alkylačným činidlom a polyamínom, čo eliminuje možnosť polyalkylácie tohto polyamínu. Presnejšie špecifikovane sa vynález z tohto hľadiska vzťahuje na spôsob, ktorého podstata spočíva v tom, že sa uskutoční kopolácia aspoň jednej lipidovej frakcie aspoň s jednou asymetrickou polyamínovou frakciou, pričom táto polyamínová frakcia sa získala bimolekulárnou reakciou medzi alkylačným činidlom, kovalentne viazaným k tuhému nosiču, a symetrickým polyamínom. Podľa tohto prístupu sa alkylačné činidlo kovalentne viaže na polymérny nosič esterifikáciou alebo amidáciou. Symetrický polyamín reaguje s alkylačným činidlom v tuhej fáze mechanizmom bimolekulárnej reakcie, ktorá vedie k monofuncionalizovanému asymetrickému polyamínu viazanému na nosič. Voľné aminy uvedeného produktu sú zvyčajne chránené v tuhej fáze ochrannými skupinami typu Boc alebo Z. Nakoniec sa uvedené produkty odštiepia od nosiča v tuhej fáze. Tieto polyaminokyseliny sa potom v prípade, že je to vhodné, viažu na lipidové frakcie, čím sa získajú požadované transfekčné činidlá. Na túto kopoláciu možno použiť zvyčajné peptidové kopoláčne činidlá, akými sú napríklad Bop, Pybop, BopCl a DCC. Uvedená metódika umožňuje zostaviť na tuhom nosiči aj celé transfekčné činidlo, pričom do molekuly možno prípadne zaviesť značkovacie peptidy, cukry alebo fluorescenčné sondy. Samozrejme sa ukázalo, že tento typ výstavby reťazca možno uskutočniť aj na voľnom lipopolyamíne.

Životnosť uvedeného spôsobu sa dokázala syntézou niekoľkých asymetrických a funkcionalizovaných priamych alebo rozvetvených polyaminokyselín.

Predmetom vynálezu je aj terapeutické použitie opísaných lipopolyamínov buď samotných, t. j. priamo, alebo v rámci farmaceutických kompozícií.

Ako sa už vysvetlilo, ukázalo sa, že zlúčeniny všeobecného vzorca (I) sú obzvlášť zaujímavé na transfekciu *in vivo* a *in vitro* nukleových kyselín. Tieto zlúčeniny účinne zhutňujú DNA a majú výhodne veľmi nízku toxicitu.

S cieľom dosiahnuť maximálny účinok kompozícií podľa vynálezu sa obsahy zlúčeniny všeobecného vzorca (I) a nukleovej kyseliny výhodne určia tak, že pomer kladných nábojov uvažovaného lipopolyamínu a záporných nábojov nukleovej kyseliny R má optimálnu hodnotu. Tento optimálny pomer sa mení najmä podľa spôsobu aplikácie (*in vivo* alebo *in vitro*) a podľa bunkového typu určeného na transfekciu a je potrebné optimalizovať ho od prípadu k prípadu. Táto optimalizácia je v kompetencii odborníka v danom odbore.

Vo farmaceutických kompozíciách podľa vynálezu môže byť polynukleotidom tak kyselina deoxyribonukleová, ako aj kyselina ribonukleová. Môže ísť o sekvencie prirodzeného alebo umelého pôvodu a najmä o genómovú DNA, DNAC, RNAm, RNAt a RNAr, o hybridné sekvencie alebo o modifikované alebo nemodifikované syntetické alebo semisyntetické oligonukleotidové sekvencie. Tieto nukleové kyseliny môžu mať ľudský, zvierací, rastlinný, bakteriálny, vírusový alebo iný pôvod. Môžu sa získať ľubovoľnou známou technikou a najmä vytriedením bánk, chemickou syntézou alebo enzymatickou modifikáciou sekvencií získaných vytriedením bánk. Tieto kyseliny môžu byť zabudované do vektorov, akými sú plazmidové vektory.

Pokiaľ ide o kyseliny deoxyribonukleové, môžu byť jedno- alebo dvojitlákove a môže ísť o krátke oligonukleotidy alebo o dlhšie sekvencie. Tieto kyseliny deoxyribonukleové môžu niesť terapeutické gény, regulačné sekvencie transkripcie alebo replikácie, modifikované alebo nemodifikované antimediatorové sekvencie, väzbové oblasti na ostatné bunkové zložky, atď.

Terapeutickým génom sa v rámci vynálezu rozumie každý gén kódujúci proteínový produkt, ktorý sa vyznačuje terapeutickým účinkom. Týmto takto kódovaným proteínovým produktom môže byť proteín, peptid, atď. Tento proteínový produkt môže byť homológny proti cieľovej bunke (ide teda o produkt, ktorý je normálne exprimovaný v cieľovej bunke v prípade, že sa táto cieľová bunka nevyznačuje žiadnou patológiou). V tomto prípade umožňuje expresia proteínu napríklad liečbu nedostatočnej expície v bunke alebo expresiu neaktívneho alebo málo aktívneho proteínu alebo aj nadmernú expresiu uvedeného proteínu. Terapeutický gén môže kódovať aj mutant bunkového proteínu, ktorý má zvýšenú stabilitu, modifikovanú aktivitu, atď. Uvedený proteínový produkt môže byť aj heterológny proti cieľovej bunke. V tomto prípade môže exprimovaný proteín napríklad dopĺňať alebo úplne poskytovať deficitnú aktivitu v bunke a tým jurobiť schopnú boja proti patológii alebo v nej stimulovať imunitnú ozvu.

Z terapeutických produktov v zmysle vynálezu možno uviesť najmä enzýmy, krvné deriváty, hormóny, lymfokíny, interleukíny, interferóny, TNF, atď. (FR 92 03120), rastové faktory, neurotransmitory alebo ich prekurzory alebo syntézne enzýmy, trofické faktory: BDNF, CNTF, NGF, IGF, GMF, sFGF, bFGF, NT3, NT5, HARP/pleiotrofin, atď., dystrofin alebo minidystrofin (FR 91 11947), proteín CFTR združený s mukoviscidózou, gény supresie nádorov: p53, Rb, Rap1A, DCC, k-rev, atď. (FR 93 04745), gény kódujúce faktory implikované v koagulácii: faktory VII, VIII, IX, gény intervenujúce pri rozdelení DNA, samovražedné gény (tymidín-kináza, cytozín-deamináza), gény hemoglobínu a ostatné proteínové transportné činitele, gény zodpovedajúce proteínom implikovaným v metabolizme lipidov apolipoproteínového typu, vybraným z množiny zahŕňajúcej apoli-

poproteíny A-I, A-II, A-IV, B, C-I, C-II, C-III, D, E, F, G, H, J a apo(a), enzýmy metabolizmu, ako napríklad lipoproteín-lipáza, hepatická lipáza, lecitincholesterol-acyltransferáza, 7- $\alpha$ -cholesterol-hydroxyláza, kyselina fosfatidová-fosfatáza alebo aj proteíny prenosu lipidov, ako proteín prenosu esterov cholesterolu a proteín prenosu fosfolipidov, väzbový proteín lipidov LDL, receptory chylomikrónremnantov a nosičové receptory, atď.

Terapeutickou nukleovou kyselinou môže byť aj gén alebo antimediatorová sekvencia, ktorých expresia v cieľovej bunke umožňuje regulovať expresiu génov alebo transkripciu bunkových RNAm. Takéto sekvencie sa napríklad môžu prepísať do cieľovej bunky na RNA, ktoré sú komplementárne k bunkovým RNAm, a blokovat tak ich prepis na proteíny, pričom sa použije technika opísaná v patentovom dokumente EP 140 308. Terapeutické gény obsahujú aj sekvencie kódujúce ribozómy, ktoré sú schopné selektívne zničiť cieľové RNA.

Ako sa už uviedlo, môže nukleová kyselina obsahovať aj jeden alebo niekoľko génov kódujúcich antigénový peptid, ktorý je schopný vyvolať u človeka alebo zvieratá imunitnú ozvu. V rámci tohto špecifického uskutočnenia umožňuje vynález realizovať buď vakcíny alebo imunoterapeutickú liečbu človeka alebo zvieratá zameranú najmä proti mikroorganizmom, vírusom alebo rakovinám. Môže ísť najmä o špecifické antigénové peptidy vírusu Eppstein-Barrovej, vírusu HIV, vírusu hepatitídy B (EP 185 573), vírusu pseudobesnoty, vírusu typu „syncytia forming virus“ a ďalších vírusov alebo aj nádorovo špecifických vírusov (EP 259 212).

Výhodne nukleová kyselina obsahuje aj sekvencie umožňujúce expresiu terapeutického a génu alebo/ génu kódujúceho antigénový peptid v požadovanej bunke alebo v požadovanom orgáne. Môže ísť o sekvencie, ktoré sú prirodzene zodpovedné za expresiu uvažovaného génu v prípade, že sú tieto sekvencie schopné funkcie v infikovanej bunke. Môže ísť aj o sekvencie rôzneho pôvodu (sekvencie zodpovedné za expresiu ostatných proteínov alebo dokonca syntetické sekvencie). Môže ísť najmä o promotorové sekvencie eukaryotických alebo vírusových génov. Tak môže ísť napríklad o promotorové sekvencie pochádzajúce z genómu bunky, ktorá má byť infikovaná. Rovnako môže ísť o promotorové sekvencie pochádzajúce z genómu vírusu. Z tohto hľadiska možno uviesť napríklad promotory génov E1A, MLP, CMV, RSV, atď. Navyše môžu byť tieto expresné sekvencie modifikované adíciou aktivačných sekvencií, regulačných sekvencií, atď. Môže ísť o indukovateľný alebo represibilný promotor.

Inak môže nukleová kyselina obsahovať, a to najmä pred terapeutickým génom, aj signálnu sekvenciu smerujúcu syntetizovaný terapeutický produkt do sekrečných ciest cieľovej bunky. Túto signálnu sekvenciu môže tvoriť prirodzená signálna sekvencia terapeutického produktu, i keď môže ísť aj o každú inú funkčnú signálnu sekvenciu alebo o umelú signálnu sekvenciu. Nukleová kyselina môže obsahovať aj signálnu sekvenciu smerujúcu syntetizovaný terapeutický produkt do špecifickej oblasti bunky.

V rámci inej formy uskutočnenia sa vynález týka kompozícií obsahujúcich nukleovú kyselinu, nárokovany lipopolyamín a prísadu schopnú pridružiť sa ku komplexu lipopolyamín-nukleová kyselina a vylepšiť tak rezultujúcu transfekčnú potenciú. Prihlasovateľ skutočne dokázal, že transfekčná potencia lipopolyamínov sa môže neočakávane zvýšiť v prítomnosti niektorých prísad (príkladmi takýchto prísad sú lipidy, peptidy alebo proteíny), ktoré sú schopné spojiť sa s komplexom lipopolyamínu-nukleová kyselina.

V rámci tohto zistenia môžu kompozície podľa vynálezu obsahovať ako prísadu jeden alebo niekoľko neutrálnych lipidov. Takéto kompozície sú obzvlášť výhodné najmä v prípade, keď je pomer R nízky. Prihlasovateľ v skutočnosti dokázal, že prídavok neutrálneho lipidu umožňuje zvýšiť tvorbu nukleolipidových častíc a prekvapivo podporiť penetráciu častice do bunky na základe destabilizácie jej membrány.

Výhodne sú neutrálnymi lipidmi použitými v rámci vynálezu lipidy s dvoma mastnými reťazcami.

Výhodne sa používajú prírodné lipidy, syntetizované lipidy, zwitteriónové lipidy alebo lipidy zbažené vo fyziologických podmienkach iónového náboja. Tieto lipidy môžu byť vybrané najmä z množiny zahŕňajúcej dioleoylfosfatidyletanolamín (DOPE), oleoyl-palmitoylfosfatidyletanolamín (POPE) a distearoyl-, dipalmitoyl- a dimirstoylfosfatidyletanolamíny, ako aj ich mono- až tri-N-metylované deriváty, fosfatidylglyceroly, diacylglyceroly, glykozyldiacylglyceroly, cerebrozidy (najmä galaktocerebrozidy), sfingolipidy (najmä sfingomyelíny) alebo aj azialogangliozidy (najmä azialo-GM1 a GM2).

Tieto rôzne lipidy sa môžu získať buď syntézou, alebo extrakciou z orgánov (napríklad z mozgu), alebo z vajíčok známymi klasickými technikami. Takáto extrakcia lipidov sa môže uskutočniť najmä použitím organických rozpúšťadiel (pozri napríklad Lehninger, „Biochemistry“).

V bezprostrednej minulosti prihlasovateľ dokázal, že obzvlášť výhodné je použiť ako uvedenú prísadu aj zlúčeniny pôsobiace priamo alebo nepriamo na úrovni kondenzácie uvedenej nukleovej kyseliny (WO 96/25508).

Prítomnosť takejto kyseliny v transfekčnej kompozícii na báze lipopolyamínu umožňuje výrazné zníženie množstva tohto činidla bez toho, aby došlo k akémukoľvek zhoršeniu transfekčnej účinnosti uvedenej kompozície, čo má priaznivé dôsledky z toxikologického hľadiska. Naopak táto transfekčná kompozícia sa vyznačuje vyššou mierou transfekčnej aktivity.

Zlúčeninou pôsobiacou na úrovni kondenzácie nukleovej kyseliny sa tu rozumie zlúčenina, ktorá priamo alebo nepriamo zhutňuje nukleovú kyselinu. Z hľadiska presnejšej špecifikácie môže táto zlúčenina pôsobiť priamo na úrovni nukleovej kyseliny určenej na transfekciu alebo môže zasahovať na úrovni príbalej zlúčeniny, ktorá sa priamo implikuje v kondenzácii uvedenej nukleovej kyseliny. Výhodne uvedená zlúčenina pôsobí priamo na úrovni nukleovej kyseliny.

V rámci výhodnej formy uskutočnenia zasahuje toto činidlo na úrovni kondenzácie nukleovej kyseliny a tvoria ho úplne alebo čiastočne peptidové motívy (KTPKKAKKP) a alebo/ (ATPAKKA), pričom počet týchto motívov sa môže pohybovať od 2 do 10. V štruktúre zlúčeniny podľa vynálezu sa môžu tieto motívy opakovať kontinuálne alebo diskontinuálne. Takto môžu byť tieto motívy oddelené väzbovými členmi biochemického charakteru, napríklad jednou alebo niekoľkými aminokyselinami, alebo väzbovými členmi chemického charakteru. Takéto činidlo sa môže odvodiť úplne alebo čiastočne od histónu, nukleolínu, protamínu a alebo/ niektorého z ich derivátov.

Výhodne kompozície podľa vynálezu obsahujú 0,01 až 20 ekvivalentov prísady na jeden ekvivalent nukleových kyselín, uvažované hmotnostne, výhodnejšie 0,5 až 5 ekvivalentov prísady na jeden ekvivalent nukleových kyselín.

Kompozície podľa vynálezu sa môžu formulovať do galenických foriem vhodných na topické, kutánne, orálne, rektálne, vaginálne, parenterálne, intranasálne, intravenózne, intramuskulárne, subkutánne, intraokulárne, transdermálne a iné podanie. Výhodne obsahujú farmaceutické

kompozície podľa vynálezu farmaceuticky prijateľný nosič na injikovateľnú formuláciu, najmä na priamu injekciu na úrovni požadovaného orgánu, alebo na podanie topickou cestou (na pokožku a alebo/ na sliznicu). Môže ísť najmä o sterilné izotonické roztoky alebo o suché kompozície, najmä lyofilizované, ktoré po pridaní vody alebo fyziologického roztoku umožnia rekonštitúciu injikovateľných tekutín. Dávky nukleovej kyseliny použité na injekciu, ako aj počet podaní sa môžu určiť v závislosti od mnohých faktorov a najmä v závislosti od použitého spôsobu podania, od liečeného patologického stavu, od exprimovaného génu alebo aj od požadovanej dĺžky liečby. Pokiaľ ide o spôsob podania, môže ísť najmä o priamu injekciu do tkaniva alebo krvného obehu alebo o ošetrovanie bunkovej kultúry a jej následnú reimplantáciu *in vivo* prostredníctvom injekcie alebo štepu.

Vynález takto poskytuje obzvlášť výhodný spôsob liečby chorôb zahŕňajúcich podanie *in vitro* alebo *in vivo* nukleovej kyseliny schopnej korigovať uvedenú chorobu a združenú so zlúčeninou všeobecného vzorca (I) použitím uvedených podmienok. Tento spôsob možno aplikovať najmä na choroby, ktorých príčinou je nedostatok určitého proteínového alebo nukleového produktu, pričom podaná nukleová kyselina kóduje uvedený proteínový produkt alebo obsahuje uvedený nukleový produkt.

Vynález sa vzťahuje na každé použitie lipopolyamínu podľa vynálezu na transfekciu buniek *in vivo* alebo *in vitro*.

#### Prehľad obrázkov na výkresoch

Obr. 1 znázorňuje mieru transfekčnej účinnosti po ošetrovaní buniek NIH 3T3 (embryonálne myšie bunky - fibroblasty) rôznymi kationovými lipidmi.

Obr. 2 znázorňuje mieru transfekčnej účinnosti po ošetrovaní králičích buniek SMC (primárna kultúra buniek hladkých svalov králičej aorty) rôznymi kationovými lipidmi.

Obr. 3 znázorňuje mieru transfekčnej účinnosti po ošetrovaní buniek 3LL (pulmonárny Lewisov karcinóm) rôznymi kationovými lipidmi.

Obr. 4 znázorňuje mieru transfekčnej účinnosti po ošetrovaní buniek NIH 3T3 (embryonálne myšie bunky - fibroblasty) rôznymi kationovými lipidmi.

Obr. 5 znázorňuje vplyv koncentrácie DOPE na transfekčnú účinnosť buniek 3LL.

Obr. 6 znázorňuje transfekciu buniek NIH 3T3 použitím premenlivých množstiev DNA a pri stabilnom pomere nmol lipofektantu/  $\mu$ g DNA.

#### Použité skratky a symboly:

AcOEt	etylacetát
Boc	<i>tert</i> -butoxykarbonyl
BOP	benzotriazol-1-yloxytris(dimetylamino)fosfóniumhexafluorofosfát
DCC	dicyklohexylkarbodiimid
DCU	dicyklohexylmočovina
DMAP	4-dimetylamínopyridín
DMF	dimetylformamid
DMSO	dimetylsulfoxid
DODA	dioktadecylamín
EP	petroléter
EzOH	etanol
NEt <sub>3</sub>	trietylamín
R <sub>f</sub>	retenčný frontálny koeficient
TFA	kyselina trifluóroctová
THF	tetrahydrofurán

TMS	tetrametylsilán
UV	ultrafialové žiarenie
SPPS	syntéza peptidov v tuhej fáze
CLHP	vysokotlaková kvapalinová chromatografia
Z	benzyloxykarbonyl
CIZ	p-chlórbenzyloxykarbonyl

### Príklady uskutočnenia vynálezu

V nasledovnej časti opisu sa vynález bližšie objasní pomocou príkladov jeho konkrétneho uskutočnenia, pričom tieto príklady majú len ilustračný charakter a nijako neobmedzujú rozsah vynálezu, ktorý je jednoznačne vymedzený formuláciou patentových nárokov.

#### A. Látky a metódy použité pri chemických syntézach

##### 1. Látky

###### a) Zlúčeniny

Východiskové polyamíny sú komerčne dostupné, napríklad spermidín, spermin, tris(2-aminoetyl)amín, fenyléndiamín, diamino-etán, (propán, bután, pentán, hexán, atď.), alebo sa môžu syntetizovať klasickými postupmi, napríklad úplnou kyanoetyláciou komerčne dostupných aminorov, akými sú diaminoetán (propán, bután, pentán, hexán, atď.), spermidín, spermin, pričom vznikajú rozvetvené polyamíny.

Alkylačné činidlá sa volia v závislosti od použitej alkylačnej metódy nasledovným spôsobom:

pri klasickej alkylácii: kyselina brómoctová a kyseliny  $\omega$ -halogénkarboxylové,

pri redukčnej alkylácii: kyseliny  $\omega$ -aldehydkarboxylové, ako je kyselina glyoxalová, semialdehyd kyseliny jantárovej, atď. alebo ketokyseliny, ako je kyselina octoťová alebo kyselina pyrohroznová.

Použitými polymérmí sú živice komerčne dostupné na syntézu peptidov v tuhej fáze (Merrifieldova syntéza), napríklad živice typu Chlorotrytylchlorid, živice HMP, ktoré poskytujú produkty nesúce voľné kyselinové funkcie alebo živice typu Rink. Polyaminokyseliny sa môžu syntetizovať priamo na predbežne syntetizovanom peptide na tuhej fáze nesúcim brómoalkylovú funkciu alebo  $\omega$ -aldehydkyselinu.

Dioktadecylamin, trietylamin, kyselina trifluoťová, BOP, DMAP, benzylchloroformiát sú komerčne dostupné (firma Aldrich). Roztoky NaCl a NaHCO<sub>3</sub> sú nasýtenými roztokmi. Roztok KHSO<sub>4</sub> má koncentráciu 0,5 M.

###### b) Fyzikálne merania

Protónové nukleárne magnetickorezonančné spektrum sa zaznamenalo na spektrometroch Bruker 400 a 600 MHz.

Hmotnostné spektrá sa získali na zariadení API-MS/III.

###### c) Chromatografické techniky

Vysokotlakové kvapalinové chromatografie sa uskutočnili na zariadení Merck-Hitachi vybavenom automatickým vzorkovačom AS-2000A, inteligentným čerpadlom L-6200A a UV detektorom L-4000 s regulovateľnou vlnovou dĺžkou nastavenou na 220 nm pri analytických separáciách a na 235 nm pri preparatívnych separáciách. Ako kolóny pri analytických separáciách sa použili kolóny BU-300 a quapore Butyl 7m, 300 A 300 x 4,6 dodávané firmou Perkin-Elmer a pri preparatívnych separáciách sa použili kolóny Biosil C<sub>18</sub> HL 90 - 10 250 x 10 mm dodávané firmou Biorad. Mobilnými fázami sú voda (0,1 % TFA) a acetonitril (0,1 % TFA). Prietok sa pri analytických separáciách na-

stavil na 1 ml/min. zatiaľ čo pri preparatívnych separáciách sa nastavil na 4 ml/min.

Chromatografie na tenkej vrstve (CCM) sa uskutočnili na silikagelových doskách Merck s hrúbkou 0,2 mm.

Chromatografie na kolóne sa uskutočnili na stĺpci silikagelu Merck 60 s granulometriou 0,063 - 0,200 mm.

Dosky sa vyvolávali buď ultrafialovým žiarením (pri 254 nm) alebo ninhydrinom, pričom sa použilo naprašenie (jemný postrek) etanolickým roztokom ninhydrínu (40 mg/100 ml EtOH) a zohriatie na teplotu 150 °C s cieľom detegovať aminy alebo amidy, alebo fluorescaminom, pričom sa použilo naprašenie roztokom fluorescamínu v acetóne (40 mg/100 ml acetónu) s cieľom detegovať primárne aminom, alebo jódom, pričom sa doska pokryla práškovým jódom.

###### d) Technika syntézy v tuhej fáze (SPPS)

Syntéza v tuhej fáze sa uskutočňuje v manuálnom reaktore na syntézu peptidov SPPS zhotovenom remeselným spôsobom, pričom reaktor je vybavený miešadlom Flask Shaker, model A5-6021. Priebeh kopulácie polyamínov na tuhú fázu, ako aj priebeh ochrany polyamínov v SPPS sa sleduje Kaiserovým testom (Kaiser E., Colescott D. L., Bossinger C. D., Cook P. I., Anal. Biochem. 34(2), 595 (1970)). Živicou použitou v príkladoch na syntézu SPPS je Chlorotrytyl chloride Resin dodávaná firmou Novabiochem.

#### 2. Všeobecná metodika

##### a) Syntéza symetrických polyamínov ilustrovaná prípravou (N,N,N',N'-tetraaminopropyl)-1,4-diaminobutánu

Do trojhrdlej banky s obsahom 2 litre sa predloží 147 g 1,4-diaminobutánu a 1000 ml demineralizovanej vody. Roztok v banke sa mieša magnetickým miešadlom. Pri zachovaní teploty 38 °C sa do banky zavedie v priebehu jednej hodiny pomocou izobarického lievika 443 g akrylonitrilu. K banke sa potom pripojí chladič na destiláciu so spätným tokom a obsah banky sa zohrieva na vodnom kúpeli na teplotu 80 °C počas 1 hodiny. Test na fluoresceín je negatívny a nadbytok akrylonitrilu sa odparí za vákuu pri teplote 40 °C.

Takýmto spôsobom sa získajú dve fázy. Spodná organická fáza sa oddelí, premyje sa 300 ml vody a prevedie sa do banky s obsahom 1 liter. Pridá sa 170 ml zmesi vody a metanolu v objemovom pomere 1 : 1 a zmes sa ponechá kryštalizovať cez noc. Na druhý deň sa kryštály odfiltrujú cez sklenenú fritu s porozitou 3. Filtračný koláč sa premyje metanolom (2 x 170 ml) a éterom (2 x 150 ml). Produkt sa vysuší na podložke v exikátore za vákuu 3,5 kPa cez noc. Takýmto spôsobom sa získa 461 g (93 %) produktu. Produkt sa analyzuje nukleárnou magnetickorezonančnou spektroskopiou a hmotnostnou spektroskopiou, pričom sa získajú kompatibilné výsledky. Produkt sa následne hydrogenuje bez akéhokoľvek ďalšieho čistenia.

Do autoklávu z nehrdzavejúcej ocele s obsahom 1 liter sa predloží 30 g (0,1 mol) polynitrilu pripraveného uvedeným spôsobom. V kadičke sa pripraví roztok 140 ml etanolu (95 %) a 8 g (0,2 mol) hydroxidu sodného. Keď sa hydroxid sodný rozpustí, zavedie sa získaný roztok do autoklávu. Autokláv sa prepláchne dusíkom, zavedie sa do neho 8 ml Raneyovho niklu na uhlí a autokláv sa uzatvorí. Východiskový tlak vodíka je 5,2 MPa a tento tlak v priebehu 5 hodín pri teplote miestnosti poklesne na 2,85 MPa. Výsledná hydrogenačná suspenzia sa prefiltruje cez papierový filter, filtračný koláč sa premyje etanolom (2 x 25 ml) a filtrát sa za vákuu odparí dosucha. Získaný olej sa zmieša s 30 ml vody a extrahuje sa 100 ml dichlórmetánu. Organická fáza sa vysuší nad síranom horečnatým, prefiltruje a



odparí za vákuu, čím sa získa 27 g (85 %) žltkastej olejovitej kvapaliny.

Získaný produkt sa následne analyzuje chromatografiou na tenkej vrstve (tu sa získa iba jediná škvrna), nukleárnou magnetickorezonančnou spektroskopiou a hmotnostnou spektroskopiou, pričom sa získajú kompatibilné výsledky. Získaný produkt sa použije v ďalšom reakčnom stupni bez akéhokoľvek ďalšieho čistenia.

b) Metóda A: Zakotvenie kyselinovej funkcie na polymérnom nosiči

Do reaktora sa zavedie živica Chlorotrietyl chloride (5 g, 1,2 mmol Cl/g živice), pričom reaktor je špecificky určený na syntézu SPPS, pridá sa 50 ml dichlórmetánu a získaná zmes sa mieša počas 5 minút. Potom sa pridá kyselina brómoctová (1,05 g, 7 mmol) a DIEA (0,95 ml, 7,5 mmol). Obsah reaktora sa mieša pri teplote miestnosti počas dvoch hodín. Vzniknutá kvapalina sa prefiltruje a živica sa premyje dichlórmetánom a izopropylalkoholom (10 x 50 ml) a potom ešte metanolom (2 x 50 ml). Nakoniec sa živica vysuší v prúde dusíka.

c) Metóda B: Reakcia polyamínov s brómoacetylovanou živicom

Polyamín (10-násobný molárny nadbytok) sa rozpustí v 50 ml dichlórmetánu a roztok sa zavedie do reaktora obsahujúceho produkt získaný metódou A. Reaktor sa mieša pri teplote miestnosti počas dvoch hodín. Rozpúšťadlo sa odstráni filtráciou a živica sa premyje dichlórmetánom a izopropylalkoholom (10 x 50 ml). Kaiserov test je pozitívny.

d) Metóda C a D: Ochrana polyaminokyselín na živici

Metóda C

Di-*tert*-butyldikarbonát (48 mmol) a DIEA (50 mmol) sa rozpustia v dichlórmetáne (50 ml) a získaný roztok sa zavedie do reaktora obsahujúceho produkt získaný metódou B. Obsah reaktora sa potom mieša cez noc. Na druhý deň poskytuje Kaiserov test negatívny výsledok. Rozpúšťadlo sa odstráni filtráciou a živica sa premyje striedavo dichlórmetánom a izopropylalkoholom (10 x 50 ml), metylalkoholom (2 x 50 ml) a éterom (2 x 50 ml). Živica sa vysuší v prúde dusíka. Kaiserov test je stále negatívny.

Metóda D

Živica získaná metódou B (1,5 g) sa zavedie do banky, pridá sa dichlórmetán (20 ml) a potom DIEA (20 mmol). Obsah banky sa mieša magnetickým miešadlom a do banky sa prikvapká v priebehu 5 minút benzylochloroformiát (14 mmol), pričom sa pH udržiava na hodnote 11 pridaním DIEA. Po celonočnom miešaní sa živica prevedie do reaktora SPPS, prefiltruje sa a alternatívne sa premyje dichlórmetánom a izopropylalkoholom (10 x 20 ml) a éterom (2 x 20 ml). Živica sa vysuší v prúde dusíka.

e) Metóda E: Odštiepenie chránených polyaminokyselín zo živice

Živice získané metódami C a D sa zavedú do banky s obsahom 250 ml vybavenej magnetickým miešadlom. Do banky sa potom pridá roztok tvorený 50 ml dichlórmetánom a 25 ml 2,2,2-trifluóretanolu a získaná zmes sa mieša počas dvoch hodín. Roztok sa prefiltruje, živica sa premyje dichlórmetánom (2 x 10 ml) a takto získané organické fázy sa spoja a odparia sa za vákuu. Produkty sa potom prečistia flash-chromatografiou na silikagéli, pričom sa ako elučné činidlo použije zmes chloroformu a metanolu v objemovom pomere 9 : 1. Frakcie obsahujúce požadované produkty sa

identifikujú pomocou chromatografie na tenkej vrstve (postup sa detailnejšie opisuje v ďalej zaradených príkladoch).

f) Metóda F: Kopulácia aminokyselín s dilipidylamínmi

BOC-aminokyselina (10 mmol) a dilipidylamín s 12 až 22 uhlíkovými atómami (10 mmol) sa zavedú do banky s obsahom 250 ml. Do banky sa potom pridá chloroform (100 ml) a obsah banky sa mieša až do okamihu, keď sa všetok tuhý podiel rozpustí. Potom sa do banky pridá TEA (30 mmol) a BOP (33 mmol). pH sa udržiava na hodnote 10 pomocou kyseliny trifluóroctovej, pričom sa obsah banky mieša počas dvoch hodín. Po ukončení reakcie (detegované chromatografiou na tenkej vrstve) sa chloroform odparí a tuhý podiel sa vypláchne etylacetátom (300 ml). Organická fáza sa premyje roztokom hydrogensíranu draselného (4 x 100 ml), roztokom hydrogenuhličitanu sodného (4 x 100 ml) a roztokom chloridu sodného (4 x 100 ml). Organická fáza sa vysuší nad síranom horečnatým, prefiltruje a odparí za vákuu. Produkty sa analyzujú chromatografiou na tenkej vrstve, nukleárnou magnetickorezonančnou spektroskopiou a hmotnostnou spektroskopiou a použijú sa v ďalšom reakčnom stupni bez akéhokoľvek ďalšieho čistenia. Výťažky produktov sú asi 90 %.

g) Metóda G a H: Kopulácia chránených polyaminokyselín s dilipidylamidmi kyselín a odštiepenie ochranných skupín BOC a Z

Metóda G

Produkt získaný metódou F (9 mmol) sa zavedie do banky vybavenej magnetickým miešadlom a do banky sa pridá TFA ochladená na teplotu 4°C (30 ml). Roztok sa mieša počas jednej hodiny. TFA sa odparí za vákuu a produkt sa rozpustí pridaním DMF (70 ml). Pridá sa kyselina trifluóroctová (30 ml) a potom chránená polyaminokyselina získaná metódou E (9 mmol), pH sa nastaví na hodnotu 10 a pridá sa BOP (33 mmol). Roztok sa mieša počas dvoch hodín a uskutoční sa analýza vzorky reakčnej zmesi chromatografiou na tenkej vrstve. Ak je kopulácia ukončená (stanovené chromatografiou na tenkej vrstve), pridá sa roztok hydrogensíranu draselného (700 ml) a produkt sa extrahuje etylacetátom (3 x 100 ml). Organická fáza sa premyje roztokom hydrogensíranu draselného (3 x 50 ml), roztokom hydrogenuhličitanu sodného (3 x 50 ml) a roztokom chloridu sodného (3 x 50 ml), vysuší sa nad síranom horečnatým, prefiltruje a odparí za vákuu. Produkty sa analyzujú nukleárnou magnetickorezonančnou spektroskopiou, chromatografiou na tenkej vrstve a hmotnostnou spektroskopiou a následne sa uskutoční ich deproteckcia. Takto získané produkty sa použijú v ďalšom reakčnom stupni bez akéhokoľvek ďalšieho čistenia. K produktu sa pridá kyselina trifluóroctová (50 ml), získaný roztok sa mieša počas 1,5 hod a kyselina trifluóroctová sa odparí. Ak produkt obsahuje ešte skupiny Z alebo ClZ, ktoré nie sú odštiepiteľné účinkom kyseliny trifluóroctovej, bezprostredne sa uskutoční metóda H. Finálne produkty sa prečistia semipreparatívnou vysokotlakovou kvapalinovou chromatografiou (pozri príklady).

Metóda H

Produkty získané metódou G obsahujúce skupinu Z alebo ClZ sa zavedú do banky vybavenej magnetickým miešadlom, kde sa rozpustia v 10 ml metanolu /g produktu. Potom sa do banky pridá pri teplote miestnosti paládium na uhlí (10 %, 1 g/g produktu). Priebeh hydrogenácie sa sleduje vysokotlakovou kvapalinovou chromatografiou. Po

dvoch hodinách je reakcia ukončená. Hydrogenačná zmes sa prefiltruje a filter sa premyje 10 ml metanolu. Pridá sa dvakrát destilovaná voda a získaný roztok sa zmrazí a lyofilizuje. Finálne produkty sa prečistia preparatívnou vysokotlakovou kvapalinovou chromatografiou.

#### h) Metóda I: Deprotekcia ochrannej skupiny Boc

K produktu obsahujúceho skupiny Boc (1 mmol) predloženému do banky sa pridá kyselina trifluóroctová. Získaný roztok sa mieša počas 1,5 hodiny a kyselina trifluóroctová sa odparí. Vzniknutý amín je úplne zbavený ochranných skupín a je pripravený na použitie pri kopuláciách, a to bez akéhokoľvek ďalšieho čistenia.

### B. Materiál a metóda na biologickú štúdiu

#### 1. Plazmidy použité na prenos génov *in vitro*

Plazmidom pCMV-LUC je konštrukt odvodený buď od plazmidu pGL2-Basic Vector (Promega), alebo od plazmidu pGL2-Control Vector (Promega) inzerciou fragmentu Mlu I - Hind III obsahujúceho promótor ľudského cytomegalovírusu (CMV) extrahovaný z vektorového plazmidu pcDNA3 (Invitrogen).

#### 2. Protokol na prípravu roztokov použitých na transfekciu

Produkty opísané v rámci výnálezu sa prevedú do roztoku (20 mmol) v etanole alebo vo vode, a zriedia sa vodou tak, aby finálna koncentrácia etanolu bola nižšia ako 10 %.

Roztoky nukleovej kyseliny zriedené fyziologickým sérom (0,15 M roztok chloridu sodného) sa pridajú k roztokom lipofektantu v pomere 1 : 1 (hm./hm.). Po homogenizácii rozmiešaním a 15 minútovej inkubácii pri teplote miestnosti sa roztoky DNA/lipofektant distribuuju (9 % obj./obj. finálne) do jamiek titračnej platne, kde sa bunky premyjú rastovým kultivačným prostredím zbaveným proteínov (sérum) a prevedú sa na rastové prostredie zbavené či nezbavené séra.

### C. Materiál pre testy *in vivo*

#### 1. Materiál

##### a) Experimentálne modely

- dospelé myšie samičky C57/BL6 (staršie ako 8 týždňov),

- nádory typu 3LL (Lewis-Lungov karcinóm) získané prenosom nádorových fragmentov zo zvierat na zvierat a implantované pod kožu na úrovni boku.

##### b) Použité plazmidy

Plazmid pXL 2622 je odvodený od pGL2 Basic Vector (Promega), do ktorého sa inzeroval promótor cytomegalovírusu (CMV) extrahovaný z plazmidu pcDNA3 (Invitrogen) pred génom kódujúcim luciferázu. Tento plazmid sa získal technikou zrážania PEG (Ausubel) a uchovával sa v Tris-pufri (10 mM EDTA, pH 8) pri teplote 4° C a koncentrácii asi 10 µg DNA na 1 µl.

#### 2. Protokoly

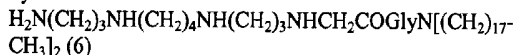
##### Injikované roztoky

DNA určená na transfekciu sa najskôr solubilizuje v pufrí, pridá sa peptid (KTPKAKKPP)<sub>2</sub> (sekvencia SEQ ID NO: 1) a po 20 minútach sa k zmesi pridá vysoko koncentrovaný (20 alebo 40 mM) roztok kationových lipidov. Po pridaní všetkých produktov zmes obsahuje okrem DNA (vo finálnej koncentrácii 0,5 mg/ml) peptid (0,75 mg/ml), ka-

tiónový lipid, 150 mM chloridu sodného, 5 % D-glukózy a 5 mM MES pri pH 6,2. Injekcia sa uskutoční 20 až 30 minút po príprave roztoku.

#### Príklad 1

##### Syntéza



##### a) Syntéza kyseliny {Boc-[3-(Boc-{4-[Boc-(3-Boc-aminopropyl)-amino]butyl}amino)propyl]amino}octovej (3)

Živica získaná metódou A sa podrobí reakcii so sperminom metódami B, C a E. Chránený produkt sa prečistí chromatografiou na silikagéli. Výťažok je 40 %.

##### Chromatografia na tenkej vrstve:

$R_f = 0,32$  (CHCl<sub>3</sub>/MeOH v objemovom pomere 9 : 1);

Vysokotlaková kvapalinová chromatografia:

$R_t = 4,22$  min. (H<sub>2</sub>O/MeCN): 3 min. (40 : 60), 3 - 20 min. (0 : 100), 35 min. (0 : 100);

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO-d<sub>6</sub> s prídavkom niekoľkých kvapiek CD<sub>3</sub>COOD-d<sub>4</sub>, δ v ppm):

1,40 (4 s, 36 H: C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>),

1,46 (mt, 4H: (CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub> centrálné butylu),

1,64 a 1,74 (2 mts, 2H každý: CH<sub>2</sub> centrálny propyl),

2,96 (t, J = 7 Hz, 2H: CH<sub>2</sub>NCOO),

3,15 (mt, 8H: CH<sub>2</sub>NCH<sub>2</sub>),

3,83 (s, 2H: OCONCH<sub>2</sub>COO);

Hmotnostné spektrum: 661 (M + H)<sup>+</sup>.

##### b) Syntéza kyseliny {Z-[3-(Z-{4-[Z-(3-Z-aminopropyl)-amino]butyl}-amino)propyl]amino}octovej (4)

Živica získaná metódou A sa podrobí reakcii so sperminom metódami B, C a D. Chránený produkt sa prečistí chromatografiou na silikagéli. Výťažok je asi 20 %.

##### Chromatografia na tenkej vrstve:

$R_f = 0,85$  (CHCl<sub>3</sub>/MeOH v objemovom pomere 8 : 2);

Vysokotlaková kvapalinová chromatografia:

$R_t = 6,92$  min. (H<sub>2</sub>O/MeCN): 3 min. (40 : 60), 3 - 20 min. (0 : 100), 35 min. (0 : 100);

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO-d<sub>6</sub> pri teplote 413 K, δ v ppm):

1,49 (mt, 4H: (CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub> centrálny butyl),

1,74 a 1,81 (2 mts, 2H každý: CH<sub>2</sub> centrálny propyl),

3,07 (q, J = 7 Hz, 2H: CH<sub>2</sub>NCOObenzyl),

3,15 - 3,30 (mt, 8H: CH<sub>2</sub>NCH<sub>2</sub>),

3,33 (t, J = 7,5 Hz, 2H: NCH<sub>2</sub>COO),

3,70 (s, 2H: OCONCH<sub>2</sub>COO),

5,07, 5,10, 5,12 a 5,13 (4 s, 2 H každý, ArCH<sub>2</sub>OCON),

6,65 (mf, 1H: NHCO),

7,25 - 7,40 (mt, 20 H: CH aromatické);

Hmotnostné spektrum: 797 (M + H)<sup>+</sup>.

##### c) Boc-Gly-Dioktadecylamid (5)

Boc-Gly sa kopuluje s dioktadecylamínom použitím metódy F. Výťažok je 90 %.

##### Chromatografia na tenkej vrstve:

$R_f = 0,9$  (CHCl<sub>3</sub>/MeOH v objemovom pomere 9 : 1);

Hmotnostné spektrum: 679 (M + H)<sup>+</sup>;

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ v ppm):

0,89 (t, J = 7 Hz, 6H: CH<sub>3</sub>),

1,29 (mt, 60 H: CH<sub>2</sub> centrálny masťný reťazec),

1,49 (s, 9H: C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>),

1,55 (mt, 4H: 1 CH<sub>2</sub> každého masťného reťazca),

3,15 a 3,33 (2 t, J = 7,5 Hz, 2H každý: NCH<sub>2</sub> mastných reťazcov),

3,95 (d, J = 5 Hz, 2H: OCONCH<sub>2</sub>CON),  
5,57 (mf, 1H: CONH);

d) H<sub>2</sub>N(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NH(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NH(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NHCH<sub>2</sub>COGlyN-  
[(CH<sub>2</sub>)<sub>18</sub>]<sub>2</sub> (6)

Produkty (3) a (5) alebo (4) a (5) sa kopulujú použitím metódy G. Produkty sa zbavujú ochranných skupín postupmi v rámci metódy G v prípade produktu chráneného ochrannou skupinou Boc alebo postupmi v rámci metódy H v prípade produktu chráneného ochrannou skupinou Z. Produkt sa prečistí semipreparatívnou vysokotlakovou kvapalinovou chromatografiou a získané frakcie sa analyzujú vysokotlakovou kvapalinovou chromatografiou.

Vysokotlaková kvapalinová chromatografia:

R<sub>t</sub> = 15,35 min. (H<sub>2</sub>O/MeCN): 3 min. (40 : 60), 3 - 20 min. (0 : 100), 35 min. (0 : 100);

<sup>1</sup>H-NMR (BYK 2 053, 400 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO-d<sub>6</sub> s prídavkom niekoľkých kvapiek CD<sub>3</sub>COOD-d<sub>4</sub> pri teplote 300 K, δ v ppm):

0,83 (t, J = 7 Hz, 6H: CH<sub>3</sub>),

1,23 (mt, 60 H: CH<sub>2</sub> centrálné mastných reťazcov),

1,43 a 1,53 (2 mts, 2H každý: 1 CH<sub>2</sub> každého mastného reťazca),

1,63 (mt, 4H: (CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub> centrálné butylu),

1,96 (mt, 4H: CH<sub>2</sub> centrálné propylu),

2,93 - 3,00 a 3,22 (3 mts, 16H celkove: NCH<sub>2</sub>),

3,83 (s, 2H: NCH<sub>2</sub>CON),

4,03 (s, 2H: CONCH<sub>2</sub>CON);

Hmotnostné spektrum: 821 (M + H)<sup>+</sup>.

Príklad 2

Syntéza

H<sub>2</sub>N(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NH(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NH(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NHCH<sub>2</sub>CON[(CH<sub>2</sub>)<sub>18</sub>]<sub>2</sub> (7)

Produkt (3) sa kopuluje s dioktadecylaminom použitím metódy F a následne sa zbaví ochranných skupín použitím metódy G. Produkt sa potom prečistí semipreparatívnou vysokotlakovou kvapalinovou chromatografiou a získané frakcie sa analyzujú vysokotlakovou kvapalinovou chromatografiou.

Vysokotlaková kvapalinová chromatografia:

R<sub>t</sub> = 15,20 min. (H<sub>2</sub>O/MeCN): 3 min. (40 : 60), 3 - 20 min. (0 : 100), 35 min. (0 : 100);

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, v zmesi 2/3 CF<sub>3</sub>COOD a 1/3 CD<sub>3</sub>COOD-d<sub>4</sub>, δ v ppm):

0,78 (t, J = 7 Hz, 6H: CH<sub>3</sub>),

1,20 (mt, 60 H: CH<sub>2</sub> centrálné mastných reťazcov),

1,52 (mt, 4H: 1 CH<sub>2</sub> každého mastného reťazca),

1,80 (mt, 4H: (CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub> centrálné butylu),

2,23 a 2,32 (2 mts, 2H každý: CH<sub>2</sub> centrálné propylu),

3,10 - 3,40 (3 mts, 16H celkove: NCH<sub>2</sub>),

4,15 (s, 2H: NCH<sub>2</sub>CON);

Hmotnostné spektrum: 764 (M + H)<sup>+</sup>.

Príklad 3

Syntéza H<sub>2</sub>N(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NH(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NH(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NHCH<sub>2</sub>COArgN-  
[(CH<sub>2</sub>)<sub>18</sub>]<sub>2</sub> (9)

a) Boc-Arg(Z)<sub>2</sub>-Dioktadecylamid

Produkt sa syntetizuje kopuláciou Boc-Arg(Z)<sub>2</sub> a dioktadecylaminu použitím metódy F. Výťažok je 91 %.

Chromatografia na tenkej vrstve:

R<sub>f</sub> = 0,9 (CHCl<sub>3</sub>/MeOH v objemovom pomere 9 : 1);

Hmotnostné spektrum: 1046 (M + H)<sup>+</sup>.

b) H<sub>2</sub>N(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NH(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NH(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NHCH<sub>2</sub>COArgN-  
[(CH<sub>2</sub>)<sub>18</sub>]<sub>2</sub> (9)

Produkt (3) alebo (4) sa kopuluje s produktom (8) použitím metódy G a zbaví sa ochranných skupín použitím metódy G v prípade ochrannej skupiny Boc a alebo/ metódy H v prípade ochrannej skupiny Z. Finálny produkt sa prečistí semipreparatívnou vysokotlakovou kvapalinovou chromatografiou a frakcie sa analyzujú vysokotlakovou kvapalinovou chromatografiou.

Vysokotlaková kvapalinová chromatografia:

R<sub>t</sub> = 13,83 min. (H<sub>2</sub>O/MeCN): 3 min. (40 : 60), 3 - 20 min. (0 : 100), 35 min. (0 : 100);

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO-d<sub>6</sub>, δ v ppm):

0,90 (t, J = 7 Hz, 6H: CH<sub>3</sub>),

1,28 (mt, 60 H: CH<sub>2</sub> centrálné mastných reťazcov),

1,40 - 1,80 (mt, 12H: CH<sub>2</sub>),

1,93 (mt, 4H: CH<sub>2</sub> centrálné propylu),

2,80 - 3,10 (mt, 16H: NCH<sub>2</sub> a NCH<sub>2</sub> mastných reťazcov),

3,42 (mt, 2H: CH<sub>2</sub>N amidoskupiny),

3,77 (mt, 2H: NCH<sub>2</sub>CON),

4,67 (mt, 1H: NCHCON),

6,80 - 7,50 (mf rozlož., 2H: NH<sub>2</sub>),

7,78, 7,92, 8,80 a 9,03 (mt resp. 3 mfs, 1H, 2H, 4H resp.

1H: CONH, NH a NH<sub>2</sub>);

Hmotnostné spektrum: 920 (M + H)<sup>+</sup>.

Príklad 4

Syntéza

H<sub>2</sub>N(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NH(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NH(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NHCH<sub>2</sub>COArg(Z)<sub>2</sub>N-  
[(CH<sub>2</sub>)<sub>17</sub>CH<sub>3</sub>]<sub>2</sub> (10)

Produkt (3) sa kopuluje s produktom (8) použitím metódy G a ochranné skupiny Boc sa odštiepia použitím tej istej metódy. Produkt sa prečistí semipreparatívnou vysokotlakovou kvapalinovou chromatografiou a získané frakcie sa analyzujú analytickou vysokotlakovou kvapalinovou chromatografiou.

Vysokotlaková kvapalinová chromatografia:

R<sub>t</sub> = 17,753 min. (H<sub>2</sub>O/MeCN): 3 min. (40 : 60), 3 - 20 min. (0 : 100), 35 min. (0 : 100);

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO-d<sub>6</sub>, δ v ppm):

0,87 (t, J = 7 Hz, 6H: CH<sub>3</sub>),

1,25 (mt, 60 H: CH<sub>2</sub> centrálné mastných reťazcov),

1,40 a 1,57 (2 mts, 2H každý: 1 CH<sub>2</sub> každého mastného reťazca),

1,65 (mt, 8H: (CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub> centrálné butylu),

1,95 (mt, 4H: CH<sub>2</sub> centrálné propylu),

2,85 - 3,05 (mt, 15H celkove: NCH<sub>2</sub>),

3,23 (t, J = 7,5 Hz, 2H: NCH<sub>2</sub>),

3,75 (s, 2H: NCH<sub>2</sub>CON),

3,85 a 3,95 (2 mts, 1H každý, CH<sub>2</sub>NC),

4,67 (mt, 1H: CONCHCON),

5,07 - 5,25 (AB limit. resp. s, J = 13,5 Hz, 2H každý: NCOOCH<sub>2</sub>Ar),

7,25 - 7,45 (mt, 10H: CH aromatické),

7,95, 8,85, 9,00 a 9,20 (4 mfs, 1H zameniteľné);

Hmotnostné spektrum: 1188 (M + H)<sup>+</sup>.

Príklad 5

Syntéza

H<sub>2</sub>N(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NH(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NH(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NHCH<sub>2</sub>COLys(rodamin)N-  
[(CH<sub>2</sub>)<sub>17</sub>CH<sub>3</sub>]<sub>2</sub> (13)

## a) Boc-Lys(CIZ)-Dioktadecylamid (11)

Produkt (a) sa syntetizuje kopuláciou Boc-Lys(CIZ) s dioktadecylamínom použitím metódy F. Výťažok je 89 %.

Chromatografia na tenkej vrstve:

$R_f = 0,92$  (CHCl<sub>3</sub>/MeOH v objemovom pomere 9 : 1);  
Hmotnostné spektrum: 918 (M + H)<sup>+</sup>.

b) BocHN(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NBoc(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NBoc(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NBocCH<sub>2</sub>-COLys(CIZ)N[(CH<sub>2</sub>)<sub>17</sub>CH<sub>3</sub>]<sub>2</sub> (12)

Produkt (3) sa kopuluje s produktom (11) použitím metódy G (bez deproteckcie ochranných skupín Boc).

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO-d<sub>6</sub> pri teplote 423 K, δ v ppm):

0,92 (t, J = 7 Hz, 6H: CH<sub>3</sub>),  
1,32 (mt, 60 H: CH<sub>2</sub> centrálné mastných reťazcov),  
1,44 (2 s, 36 H celkovo: C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>),  
1,50 a 1,80 (mt, 16H: 1 CH<sub>2</sub> každého mastného reťazca, (CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub> centrálné butylu, (CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub> a CH<sub>2</sub> centrálné propylu),  
3,00 (q, J = 6,5 Hz, 2H: OCONCH<sub>2</sub>),  
3,05 (q, J = 6,5 Hz, 2H: CH<sub>2</sub>NCOO),  
3,15 - 3,40 (mt, 14H: NCH<sub>2</sub> mastných reťazcov, CH<sub>2</sub>NCH<sub>2</sub> a CH<sub>2</sub>N(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>N),  
3,80 (s, 2H, OCONCH<sub>2</sub>CON),  
4,75 (mt, 1H: CONCHCON),  
5,15 (s, 2H: NCOOCH<sub>2</sub>Ar),  
5,97 a 6,53 (2 mts, 1 H každý: OCONH a NHCOO),  
7,08 (d, J = 7,5 Hz, 1H, CONH),  
7,30 - 7,50 (mts, 4H: CH aromatické).

c) H<sub>2</sub>N(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NH(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NH(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NHCH<sub>2</sub>COLys-(rodamín)N[(CH<sub>2</sub>)<sub>17</sub>CH<sub>3</sub>]<sub>2</sub> (13)

Skupina CIZ na lyzine produktu (12) sa odštiepi s použitím metódy H, následne sa takto získaný produkt vysuší vo vákuu, vypláchne sa éterom a premyje sa roztokom hydrogenuhličitanu sodného a chloridom sodným. Éter sa vysuší nad síranom horečnatým a odparí sa vo vákuu. 77 mg (60 μmol) produktu zbaveného ochranných skupín sa rozpustí v 3 ml metanolu, k roztoku sa pridá DIEA (64 μl) a následne tetrametylrodaminizotiokyanát (30 mg, 68 μmol) a roztok sa mieša počas 17 hodín, pričom sa priebeh reakcie sleduje chromatografiou na tenkej vrstve. Na druhý deň sa roztok odparí vo vákuu dosucha, pridá sa kyselina trifluóroctová (4 ml) a zmes sa mieša počas 1 hodiny. Kyselina trifluóroctová sa potom odparí a surový produkt sa prečistí semipreparatívnu vysokotlakovou kvapalinovou chromatografiou. Výťažok finálneho produktu je 30 %.

Chromatografia na tenkej vrstve:

$R_f = 0,05$  (MeOH);

Vysokotlaková kvapalinová chromatografia (semipreparatívna):

$R_t = 61,55$  min. (H<sub>2</sub>O/MeCN): 3 min. (100 : 0), 3 - 45 min. (0 : 100), 45 - 140 min. (0 : 100);

Hmotnostné spektrum: 1335 (M + H)<sup>+</sup>.

## Príklad 6

Syntéza H<sub>2</sub>N(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NH(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NH(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NHCH<sub>2</sub>COLys-(biotinyl)N[(CH<sub>2</sub>)<sub>17</sub>CH<sub>3</sub>]<sub>2</sub> (14)

Produkt (12) (271 mg, 0,12 mmol) sa zbaví ochrany s použitím metódy H a rozpustí sa v dimetylformamide (10 ml). Pridá sa DIEA (0,11 ml) a následne biotín (56,4 mg, 0,23 mmol) a BOP (102 mg, 0,23 mmol), pričom sa pH udržiava na hodnote 10 (DIEA) a koniec reakcie sa overí pomocou fluorescamínu. Produkt získaný postupom v rámci metódy F sa bez akéhokoľvek ďalšieho čistenia zbaví

ochrany s použitím kyseliny trifluóroctovej (5 ml) pôsobiacej počas 1 hodiny. Kyselina trifluóroctová sa potom odparí a získaný produkt sa prečistí semipreparatívnu vysokotlakovou kvapalinovou chromatografiou. Výťažok je 50 %.

Vysokotlaková kvapalinová chromatografia:

$R_t = 13,12$  min. (H<sub>2</sub>/MeCN): 3 min. (40 : 60), 3 - 20 min. (0 : 100), 35 min. (0 : 100);

Hmotnostné spektrum: 1118 (M + H)<sup>+</sup>.

## Príklad 7

Syntéza [H<sub>2</sub>N(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>]<sub>2</sub>N(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>N[(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NH<sub>2</sub>](CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NH-CH<sub>2</sub>COGlyN[(CH<sub>2</sub>)<sub>17</sub>CH<sub>3</sub>]<sub>2</sub> (16)

a) [BochN(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>]<sub>2</sub>N(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>N[(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NHBoc](CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>N-BocCH<sub>2</sub>COOH (15)

Produkt (1) sa zakotví na polyméri s použitím metódy B, uskutoční sa jeho chránenie použitím metódy C a chránený produkt sa odštiepi zo živice použitím metódy E. Získaný produkt sa prečistí chromatografiou na silikagéli. Výťažok je 35 %.

Chromatografia na tenkej vrstve:

$R_f = 0,2$  (CHCl<sub>3</sub>/MeOH v objemovom pomere 8 : 2);

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO-d<sub>6</sub> s prídavkom niekoľkých kvapiek CD<sub>3</sub>COOD-d<sub>4</sub> pri teplote 433 K, δ v ppm):

1,42 (s, 36 H: C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>),  
1,56 (mt, 4H: (CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub> centrálné butylu),  
1,65 - 1,85 (mt, 8H: CH<sub>2</sub> centrálné propylu),  
2,76 (mt, 12H: CH<sub>2</sub>N(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>),  
3,06 (t, J = 6,5 Hz, 6H: OCONCH<sub>2</sub>),  
3,29 (mt, 2H: NCH<sub>2</sub>),  
3,86 (s, 2H, OCONCH<sub>2</sub>COO);  
Hmotnostné spektrum: 775 (M + H)<sup>+</sup>.

b) [H<sub>2</sub>N(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>]<sub>2</sub>N(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>N[(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NH<sub>2</sub>](CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NHCH<sub>2</sub>-COGlyN[(CH<sub>2</sub>)<sub>17</sub>CH<sub>3</sub>]<sub>2</sub> (16)

Produkt (15) sa kopuluje s produktom (5) s použitím metódy G. Získaný produkt sa zbaví ochranných skupín použitím metódy G, následne sa prečistí semipreparatívnu vysokotlakovou kvapalinovou chromatografiou a získané frakcie sa analyzujú analytickou vysokotlakovou kvapalinovou chromatografiou a lyofilizujú sa. Výťažok je 55 %.

Vysokotlaková kvapalinová chromatografia (semipreparatívna):

$R_t = 38,72$  min. (H<sub>2</sub>O/MeCN): 10 min. (100 : 0), 10 - 45 min. (0 : 100), 45 - 140 min. (0 : 100);

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO-d<sub>6</sub> pri teplote 386 K, δ v ppm):

0,90 (t, J = 7 Hz, 6H: CH<sub>3</sub>),  
1,30 (mt, 60 H: CH<sub>2</sub> centrálné mastných reťazcov),  
1,55 (mt, 4H: 1 CH<sub>2</sub> každého mastného reťazca),  
1,65 (mt, 4H: (CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub> centrálné butylu),  
1,97 (mt, 8H: CH<sub>2</sub> centrálné propylu),  
2,80 - 3,05, 3,06 a 3,28 (mt resp. 2 t, J = 7,5 Hz, 18 H, 2H a 4 H: NCH<sub>2</sub>),  
3,80 (s, 2H: NCH<sub>2</sub>CON),  
4,03 (d, J = 5,5 Hz, 2H: CONCH<sub>2</sub>CON),  
6,00 - 9,00 (mf rozlož.: NH<sub>2</sub> a NH),  
8,27 (mt, 1H: CONH);  
Hmotnostné spektrum: 935 (M + H)<sup>+</sup>.

## Príklad 8

Syntéza  $[H_2N(CH_2)_3]_2N(CH_2)_4N[(CH_2)_3NH_2](CH_2)_3NH-CH_2CON[(CH_2)_{17}CH_3]_2$  (17)

Tento produkt sa syntetizuje rovnako ako produkt (7), pričom sa miesto produktu (3) použije produkt (15). Získaný produkt sa prečistí semipreparatívnou vysokotlakovou kvapalinovou chromatografiou a získané frakcie sa analyzujú analytickou vysokotlakovou kvapalinovou chromatografiou a lyofilizujú sa.

Vysokotlaková kvapalinová chromatografia (semipreparatívna):

$R_t = 38$  min. ( $H_2O/MeCN$ ): 10 min. (100 : 0), 10 - 45 min. (0 : 100), 45 - 140 min. (0 : 100);

$^1H-NMR$  (400 MHz,  $(CD_3)_2SO-d_6$  s prídavkom niekoľkých kvapiek  $CD_3COOD-d_6$ ,  $\delta$  v ppm):

0,88 (t,  $J = 7$  Hz, 6H:  $CH_3$ ),

1,29 (mt, 60 H:  $CH_2$  centrálne mastných reťazcov),

1,52 (mt, 4H: 1  $CH_2$  každého mastného reťazca),

1,68 (mt, 4H:  $(CH_2)_2$  centrálna butylu),

1,90 - 2,10 (mt, 8H:  $CH_2$  centrálna propylu),

2,90, 2,95 - 3,15, 3,18 a 3,15 (t, mt resp. 2 t šír.,  $J = 7,5$  Hz, 24H celkovo,  $NCH_2$ ),

4,02 (s, 2H:  $NCH_2CON$ ),

Hmotnostné spektrum: 878 (M + H)<sup>+</sup>.

## Príklad 9

Syntéza  $[H_2N(CH_2)_2]_2N(CH_2)_2NHCH_2COGlyN[(CH_2)_{17}CH_3]_2$  (19)

a)  $[BocHN(CH_2)_2]_2N(CH_2)_2NBocCH_2COOH$  (18)

Tento produkt sa syntetizuje ako produkt (15), pričom sa miesto produktu (1) použije tris(aminometyl)amín. Výťažok je 29 %.

Chromatografia na tenkej vrstve:

$R_f = 0,55$  ( $CHCl_3/MeOH$  v objemovom pomere 8 : 2);

$^1H-NMR$  (400 MHz,  $(CD_3)_2SO-d_6$  pri teplote 393 K,  $\delta$  v ppm):

1,44 (s, 27H:  $C(CH_3)_3$ ),

2,58 (t,  $J = 6,5$  Hz,  $CH_2NCH_2$ ),

2,66 (t,  $J = 7$  Hz, 2H,  $NCH_2$ ),

3,04 (q,  $J = 6,5$  Hz:  $OCONHCH_2$ ),

3,28 (t,  $J = 7$  Hz, 2H:  $OCONCH_2$ ),

3,76 (s, 2H:  $OCONCH_2COO$ ),

6,06 (mf, 2H:  $CONH$ );

Hmotnostné spektrum: 505 (M + H)<sup>+</sup>.

b)  $[H_2N(CH_2)_2]_2N(CH_2)_2NHCH_2COGlyN[(CH_2)_{17}CH_3]_2$  (19)

Tento produkt sa syntetizuje ako produkt (17), pričom sa miesto produktu (15) použije produkt (18). Výťažok je 65 %.

Vysokotlaková kvapalinová chromatografia (semipreparatívna):

$R_t = 122$  min. ( $H_2O/MeCN$ ): 10 min. (100 : 0), 10 - 45 min. (0 : 100), 45 - 140 min. (0 : 100);

$^1H-NMR$  (400 MHz,  $(CD_3)_2SO-d_6$  s prídavkom niekoľkých kvapiek  $CD_3COOD-d_6$ ,  $\delta$  v ppm):

0,87 (t,  $J = 7$  Hz, 6H:  $CH_3$ ),

1,15 - 1,35 (mt, 60 H:  $CH_2$  centrálna mastných reťazcov),

1,45 a 1,55 (2 mts, 2H každý: 1  $CH_2$  každého mastného reťazca),

2,64 (t,  $J = 5,5$  Hz, 4H,  $CH_2NCH_2$ ),

2,75 (t,  $J = 6$  Hz, 2H:  $NCH_2$ ),

2,95 (t,  $J = 5,5$  Hz, 4H:  $NCH_2$ ),

3,08 (t,  $J = 6$  Hz, 2H:  $NCH_2$ ),

3,25 (mt, 4H:  $NCH_2$  mastných reťazcov),

3,88 (s, 2H:  $NCH_2CON$ ),

4,06 (d,  $J = 5$  Hz, 2H:  $CONCHCON$ ),

7,75 (mf rozložený reziduálny:  $NH$ )

8,68 (t reziduálny,  $J = 5$  Hz:  $CONH$ );

Hmotnostné spektrum: 765 (M + H)<sup>+</sup>.

## Príklad 10

Syntéza  $[H_2N(CH_2)_2]_2N(CH_2)_2NHCH_2CON[(CH_2)_{17}CH_3]_2$

Tento produkt sa syntetizuje ako produkt (19), pričom sa miesto produktu (5) použije dioktadecylamín. Výťažok je 73 %.

Vysokotlaková kvapalinová chromatografia:

$R_t = 100,1$  min. ( $H_2O/MeCN$ ): 10 min. (100 : 0), 10 - 45 min. (0 : 100), 45 - 140 min. (0 : 100);

Hmotnostné spektrum: 708 (M + H)<sup>+</sup>.

## Príklad 11

Syntéza  $H_2N(CH_2)_3NH(CH_2)_4NH(CH_2)_3NHCH_2COLysN-[(CH_2)_{17}CH_3]_2$  (21) (RPR 127888A)

Produkt (12) sa zbaví ochrannej skupiny CIZ s použitím metódy H a s použitím metódy I. Finálny produkt sa prečistí semipreparatívnou vysokotlakovou kvapalinovou chromatografiou a získané frakcie sa analyzujú analytickou vysokotlakovou kvapalinovou chromatografiou.

Vysokotlaková kvapalinová chromatografia:

$R_t = 11,76$  min. ( $H_2O/MeCN$ ): 3 min. (60 : 40), 3 - 20 min. (0 : 100), 35 min. (0 : 100);

Hmotnostné spektrum: 765 (M + H)<sup>+</sup>.

$^1H-NMR$  (400 MHz,  $(CD_3)_2SO-d_6$  pri teplote 393 K,  $\delta$  v ppm):

0,91 (t,  $J = 7$  Hz, 6H:  $CH_3$  mastných reťazcov),

1,31 (mt, 60 H:  $(CH_2)_{15}$  centrálna mastných reťazcov),

1,35 - 1,75 (mt, 10H: 1  $CH_2$  každého mastného reťazca,  $(CH_2)_3$  centrálna lyzylu),

1,75 (mt, 4H:  $(CH_2)_2$  centrálna butylu),

2,00 (mt, 4H:  $CH_2$  propylu),

2,82, 2,98, 3,06 a 3,10 - 3,50 (2 t, mt resp. 2 mfs,  $J = 7$  Hz, 18 H celkovo:  $NCH_2$  lyzylu,  $NCH_2$  butylu,  $NCH_2$  propylu a  $NCH_2$  mastných reťazcov),

3,62 (s, 2H:  $NCH_2CON$ ),

4,73 (q,  $J = 7$  Hz, 1H:  $CONCHCON$  lyzylu),

8,18 (d,  $J = 7$  Hz, 1H:  $CONH$  lyzylu);

## Príklad 12

Syntéza  $H_2N(CH_2)_3NH(CH_2)_4NH(CH_2)_3NHCH_2COLys-(CIZ)N[(CH_2)_{17}CH_3]_2$  (22) (RPR 122759A)

Produkt (12) sa zbaví ochranných skupín Boc s použitím metódy I. Finálny produkt sa prečistí semipreparatívnou vysokotlakovou kvapalinovou chromatografiou a získané frakcie sa analyzujú analytickou vysokotlakovou kvapalinovou chromatografiou.

Vysokotlaková kvapalinová chromatografia:

$R_t = 16,79$  min. ( $H_2O/MeCN$ ): 3 min. (60 : 40), 3 - 20 min. (0 : 100), 35 min. (0 : 100);

Hmotnostné spektrum: 1060 (M + H)<sup>+</sup>.

$^1H-NMR$  (400 MHz,  $(CD_3)_2SO-d_6$  pri teplote 373 K,  $\delta$  v ppm):

0,91 (t,  $J = 7$  Hz, 6H:  $CH_3$  mastných reťazcov),

1,31 (mt, 60 H:  $(CH_2)_{15}$  centrálna mastných reťazcov),

1,30 - 1,75 (mt, 10H: 1  $CH_2$  každého mastného reťazca,  $(CH_2)_3$  centrálna lyzylu),

1,72 (mt, 4H:  $(CH_2)_2$  centrálna butylu),

1,95 (mt, 4H: CH<sub>2</sub> propylov),  
 2,98, 3,06 a 2,90 - 3,50 (2 mts resp. mf, 8 H celkove: NCH<sub>2</sub> lyzylu, NCH<sub>2</sub> butylu, NCH<sub>2</sub> propylov a NCH<sub>2</sub> mastných reťazcov),  
 3,59 (s, 2H: NCH<sub>2</sub>CON),  
 4,75 (q, J = 7 Hz, 1H: CONCHCON lyzylu),  
 5,16 (s, 2H: COOCH<sub>2</sub>Ar),  
 6,85 (mf, 1H: OCONH),  
 7,35 - 7,55 (mt, 5H: CH aromatické),  
 8,15 (mf, 1H: CONH lyzylu);

## Príklad 13

Syntéza H<sub>2</sub>N(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NH(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NH(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NHCH<sub>2</sub>COLys-(CHO)N[(CH<sub>2</sub>)<sub>17</sub>CH<sub>3</sub>]<sub>2</sub> (24) (RPR 122760A)

a) BocHN(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NBoc(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NBoc(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NBocCH<sub>2</sub>-COLysN[(CH<sub>2</sub>)<sub>17</sub>CH<sub>3</sub>]<sub>2</sub> (23)

Produkt (12) sa zbaví ochrannej skupiny Clz a použije sa v nasledujúcom stupni bez akéhokoľvek ďalšieho čistenia. Výťažok je 65 %.

Vysokotlaková kvapalinová chromatografia:

R<sub>t</sub> = 20,82 min. (H<sub>2</sub>O/MeCN): 3 min. (60 : 40), 3 - 20 min. (0 : 100), 35 min. (0 : 100);

b) H<sub>2</sub>N(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NH(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NH(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NHCH<sub>2</sub>COLys-(CHO)N[(CH<sub>2</sub>)<sub>17</sub>CH<sub>3</sub>]<sub>2</sub> (24)

Produkt (23) sa kopuluje s kyselinou mravčou s použitím metódy G. Získaný produkt sa následne prečistí semipreparatívnou vysokotlakovou kvapalinovou chromatografiou a získané frakcie sa analyzujú analytickou vysokotlakovou kvapalinovou chromatografiou.

Vysokotlaková kvapalinová chromatografia:

R<sub>t</sub> = 13,60 min. (H<sub>2</sub>O/MeCN): 3 min. (60 : 40), 3 - 20 min. (0 : 100), 35 min. (0 : 100);

Hmotnostné spektrum: 920 (M + H)<sup>+</sup>;

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO-d<sub>6</sub> pri teplote 383 K, δ v ppm):

0,92 (t, J = 7 Hz, 6H: CH<sub>3</sub> mastných reťazcov),  
 1,31 (mt, 60 H: (CH<sub>2</sub>)<sub>15</sub> centrálné bočných reťazcov),  
 1,35 - 1,70 (mt, 10H: 1 CH<sub>2</sub> každého mastného reťazca, (CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub> centrálné lyzylu),  
 1,73 (mt, 4H: (CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub> centrálné butylu),  
 1,98 (mt, 4H: CH<sub>2</sub> propylov),  
 2,85 - 3,50 (mt, 18 H: NCH<sub>2</sub> lyzylu, NCH<sub>2</sub> butylu, NCH<sub>2</sub> propylov a NCH<sub>2</sub> mastných reťazcov),  
 3,62 (s, 2H: NCH<sub>2</sub>CON),  
 4,75 (mt, J = 7 Hz, 1H: CONCHCON lyzylu),  
 7,60 (mf, 1H: CONH),  
 8,05 (s šir., 1H: CH aldehydu),  
 8,18 (mf, 1H: CONH lyzylu).

## Príklad 14

Syntéza H<sub>2</sub>N(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NH(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NH(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NHCH<sub>2</sub>COLys-(cholesteryl)N[(CH<sub>2</sub>)<sub>17</sub>CH<sub>3</sub>]<sub>2</sub> (25) (RPR 128142A)

Produkt (23) sa kopuluje s cholesterylochloroformiátom použitím metódy G (bez použitia reakčnej zložky BOP). Získaný produkt sa prečistí semipreparatívnou vysokotlakovou kvapalinovou chromatografiou a získané frakcie sa analyzujú analytickou vysokotlakovou kvapalinovou chromatografiou.

Vysokotlaková kvapalinová chromatografia:

R<sub>t</sub> = 21,66 min. (H<sub>2</sub>O/MeCN): 3 min. (60 : 40), 3 - 20 min. (0 : 100), 35 min. (0 : 100);

Hmotnostné spektrum: 1304 (M + H)<sup>+</sup>;

<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO-d<sub>6</sub>, δ v ppm):

0,68 a 0,98 (2 s, 3H každý: CH<sub>3</sub> v polohe 18 a 19 cholesterylu),  
 0,86 (mt, 12H: CH<sub>3</sub> mastných reťazcov a CH<sub>3</sub> v polohe 26 a 27 cholesterylu),  
 0,91 (d, J = 7 Hz, 3H: CH v polohe 21 cholesterylu),  
 1,31 (mt, 60 H: (CH<sub>2</sub>)<sub>15</sub> centrálné mastných reťazcov),  
 0,80 - 2,30 (mt, 42H: 1 CH<sub>2</sub> každého mastného reťazca, CH<sub>2</sub> v polohe 1, 2, 4, 7, 11, 12, 15, 16, 22, 23 a 24 cholesterylu, CH v polohe 8, 9, 14, 17, 20 a 25 cholesterylu, (CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub> centrálné lyzylu a CH<sub>2</sub> centrálné propylov),  
 1,65 (mt, 4H: (CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub> centrálné butylu),  
 2,88 a 2,96 (2 mts, 14 H celkove: NCH<sub>2</sub> lyzylu, NCH<sub>2</sub> butylu a NCH<sub>2</sub> propylov),  
 3,20 - 3,50 (mt, 4H: NCH mastných reťazcov),  
 3,64 (s, 2H: NCH<sub>2</sub>CON),  
 4,23 (mt, 1H, CH v polohe 3 cholesterylu),  
 4,63 (mt, 1H: CONCHCON lyzylu),  
 5,30 (mt, 1H: CH v polohe 6 cholesterylu),  
 6,98 (mt, 1H: NHCOO),  
 7,90 (mt, 1H: CONH lyzylu),  
 8,60 - 9,10 (mfs vymeniteľné).

## Príklad 15

Syntéza H<sub>2</sub>N(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NH(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NH(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NHCH<sub>2</sub>COLys-(arachidonyl)N[(CH<sub>2</sub>)<sub>17</sub>CH<sub>3</sub>]<sub>2</sub> (26) (RPR 130605)

Produkt (23) sa kopuluje s kyselinou arachidónovou v atmosfére dusíka a za neprístupu svetla s použitím metódy G. Produkt sa prečistí semipreparatívnou vysokotlakovou kvapalinovou chromatografiou a získané frakcie sa analyzujú analytickou vysokotlakovou kvapalinovou chromatografiou.

Vysokotlaková kvapalinová chromatografia:

R<sub>t</sub> = 20,67 min. (H<sub>2</sub>O/MeCN): 3 min. (60 : 40), 3 - 20 min. (0 : 100), 35 min. (0 : 100);

Hmotnostné spektrum: 1177 (M + H)<sup>+</sup>;

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO-d<sub>6</sub> s prídavkom niekoľkých kvapiek CD<sub>3</sub>COOD-d<sub>4</sub> pri teplote 393 K, δ v ppm):

0,90 (t, J = 7 Hz, 6H: CH<sub>3</sub> mastných reťazcov),  
 0,91 (t, J = 7 Hz, 3H: CH<sub>3</sub> arachidonylu),  
 1,31 (mt, 60 H: (CH<sub>2</sub>)<sub>15</sub> centrálné mastných reťazcov),  
 1,35 - 1,75 (mt, 18H: 1 CH<sub>2</sub> každého mastného reťazca, (CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub> centrálné a CH<sub>2</sub> centrálné arachidonylu a (CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub> centrálné lyzylu),  
 1,75 (mt, 4H: (CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub> centrálné butylu),  
 2,02 (mt, 4H: CH propylov),  
 2,10 (mt, 6H: COCH<sub>2</sub> a obe =CCH<sub>2</sub> arachidonylu),  
 2,80, 2,97, 3,06 a 3,10 - 3,50 (mt, t, mt resp 2 mfs, J = 7 Hz, 24H celkove: =CCH<sub>2</sub>C= arachidonylu, NCH<sub>2</sub> lyzylu, NCH<sub>2</sub> butylu, NCH<sub>2</sub> propylov a NCH<sub>2</sub> mastných reťazcov),  
 3,62 (s, 2H: NCH<sub>2</sub>CON),  
 4,73 (mt, 1H: CONCHCON lyzylu),  
 5,38 (mt, 8H: CH=CH arachidonylu).

## Príklad 16

Syntéza H<sub>2</sub>N(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NH(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NH(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NHCH<sub>2</sub>COGluN-[(CH<sub>2</sub>)<sub>17</sub>CH<sub>3</sub>]<sub>2</sub> (28) (RPR 126097A)

a) Boc-Glu(OBz)-Dioktadecylamin (27)

Tento produkt sa syntetizuje kopuláciou Boc-Glu(OBz) a dioktadecylamínu metódou F. Výťažok je 90 %.

Chromatografia na tenkej vrstve:

$R_f = 0,88$  ( $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  v objemovom pomere 9 : 1).

b)  $\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NHCH}_2\text{COGluN}[(\text{CH}_2)_{17}\text{CH}_3]_2$  (28)

Produkt (3) alebo (4) sa kopuluje s produktom (27) s použitím metódy G a následne sa zbaví ochrannej skupiny ClZ použitím metódy H. Finálny produkt sa prečistí semipreparatívnou vysokotlakovou kvapalinovou chromatografiou a získané frakcie sa analyzujú analytickou vysokotlakovou kvapalinovou chromatografiou.

Vysokotlaková kvapalinová chromatografia:

$R_t = 14,64$  min. ( $\text{H}_2\text{O}/\text{MeCN}$ ): 3 min. (60 : 40), 3 - 20 min. (0 : 100), 35 min. (0 : 100);

Hmotnostné spektrum: 893 (M + H)<sup>+</sup>;

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{SO}-d_6$  pri teplote 383 K,  $\delta$  v ppm):

0,90 (t, J = 7 Hz, 6H:  $\text{CH}_3$  mastných reťazcov),  
1,30 (mt, 60 H:  $(\text{CH}_2)_{15}$  centrálné mastných reťazcov),  
1,56 (mf, 4H: 1  $\text{CH}_2$  každého mastného reťazca),  
1,60 - 2,00 (mt, 2H:  $\text{CH}_2$  centrálné glutarylu),  
1,73 (mt, 4H:  $(\text{CH}_2)_2$  centrálné butylu),  
1,98 (mt, 4H:  $\text{CH}_2$  propylov),  
2,32 (t, J = 7 Hz, 2H:  $\text{COCH}_2$  glutarylu),  
3,00 - 3,06 a 3,45 (t resp. 2 mts, J = 7 Hz, 16H celkove:  $\text{NCH}_2$  butylu,  $\text{NCH}_2$  propylov a  $\text{NCH}_2$  mastných reťazcov),  
3,65 (s šir., 2H:  $\text{NCH}_2\text{CON}$ ),  
4,85 (mt, 1H:  $\text{CONCHCON}$  glutarylu),  
8,19 (d, J = 7,5 Hz, 1H:  $\text{CONH}$  glutarylu).

Príklad 17

Syntéza  $\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NHCH}_2\text{COGlu}(\text{OBz})\text{N}[(\text{CH}_2)_{17}\text{CH}_3]_2$  (29) (RPR 123027A)

Produkt (3) sa kopuluje s produktom (27) a zbaví sa ochranných skupín Boc s použitím metódy G. Finálny produkt sa prečistí semipreparatívnou vysokotlakovou kvapalinovou chromatografiou a získané frakcie sa analyzujú analytickou vysokotlakovou kvapalinovou chromatografiou.

Vysokotlaková kvapalinová chromatografia:

$R_t = 16,02$  min. ( $\text{H}_2\text{O}/\text{MeCN}$ ): 3 min. (60 : 40), 3 - 20 min. (0 : 100), 35 min. (0 : 100);

Hmotnostné spektrum: 983 (M + H)<sup>+</sup>;

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{SO}-d_6$  pri teplote 413 K,  $\delta$  v ppm):

0,89 (t, J = 7 Hz, 6H:  $\text{CH}_3$  mastných reťazcov),  
1,30 (mt, 60 H:  $(\text{CH}_2)_{15}$  centrálné mastných reťazcov),  
1,55 (mf, 4H: 1  $\text{CH}_2$  každého mastného reťazca),  
1,72 (mt, 4H:  $(\text{CH}_2)_2$  centrálné butylu),  
1,75 - 2,00 (mt, 2H:  $\text{CH}_2$  centrálné glutarylu),  
1,99 (mt, 4H:  $\text{CH}_2$  propylov),  
2,47 (t, J = 7 Hz, 2H:  $\text{COCH}_2$  glutarylu),  
2,95 - 3,05 a 3,40 (3 mts, 16H celkove:  $\text{NCH}_2$  butylu,  $\text{NCH}_2$  propylov a  $\text{NCH}_2$  mastných reťazcov),  
3,62 (s šir., 2H:  $\text{NCH}_2\text{CON}$ ),  
4,85 (mt, 1H:  $\text{CONCHCON}$  glutarylu),  
5,14 (AB limit., J = 12 Hz, 2H,  $\text{CH}_2$  benzylu),  
7,35 (mt, 5H, CH aromatické benzylu),  
8,23 (d, J = 7,5 Hz, 1H:  $\text{CONH}$  glutarylu).

Príklad 18

Syntéza  $\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NHCH}_2\text{COGlu}(\text{galaktózamid})\text{N}[(\text{CH}_2)_{17}\text{CH}_3]_2$  (31) (RPR 130096A)

a)  $\text{BocHN}(\text{CH}_2)_3\text{NBoc}(\text{CH}_2)_4\text{NBoc}(\text{CH}_2)_3\text{NBocCH}_2\text{COGluN}[(\text{CH}_2)_{17}\text{CH}_3]_2$  (30)

Produkt (3) sa kopuluje s produktom (27), ochranná skupina OBz bočného reťazca sa odštiepi pomocou metódy H (ClZ) a produkt sa použije v nasledujúcom stupni bez akéhokoľvek ďalšieho čistenia.

Vysokotlaková kvapalinová chromatografia:

$R_t = 22,84$  min. ( $\text{H}_2\text{O}/\text{MeCN}$ ): 3 min. (60 : 40), 3 - 20 min. (0 : 100), 35 min. (0 : 100);

Hmotnostné spektrum: 1293 (M + H)<sup>+</sup>.

b)  $\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NHCH}_2\text{COGlu}(\text{galaktózamid})\text{N}[(\text{CH}_2)_{17}\text{CH}_3]_2$  (31)

Produkt (30) sa kopuluje s D-(+)-galaktózamín-hydrochloridom s použitím metódy G. Finálny produkt sa prečistí semipreparatívnou vysokotlakovou kvapalinovou chromatografiou a získané frakcie sa analyzujú analytickou vysokotlakovou kvapalinovou chromatografiou.

Vysokotlaková kvapalinová chromatografia:

$R_t = 13,71$  min. ( $\text{H}_2\text{O}/\text{MeCN}$ ): 3 min. (60 : 40), 3 - 20 min. (0 : 100), 35 min. (0 : 100);

Hmotnostné spektrum: 1054 (M + H)<sup>+</sup>.

Príklad 19

Syntéza  $\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NHCH}_2\text{COGlu}(\text{galaktózamid})\text{N}[(\text{CH}_2)_{17}\text{CH}_3]_2$  (32) (RPR 130595A)

Produkt (30) sa kopuluje s D-(+)-glukózamín-hydrochloridom použitím metódy G. Finálny produkt sa prečistí semipreparatívnou vysokotlakovou kvapalinovou chromatografiou a získané frakcie sa analyzujú analytickou vysokotlakovou kvapalinovou chromatografiou.

Vysokotlaková kvapalinová chromatografia:

$R_t = 12,27$  min. ( $\text{H}_2\text{O}/\text{MeCN}$ ): 3 min. (60 : 40), 3 - 20 min. (0 : 100), 35 min. (0 : 100);

Hmotnostné spektrum: 1054 (M + H)<sup>+</sup>.

Príklad 20

Syntéza  $\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NHCH}_2\text{COGlu}(\text{manózamid})\text{N}[(\text{CH}_2)_{17}\text{CH}_3]_2$  (33) (RPR 130598A)

Produkt (30) sa kopuluje s D-(+)-manózamín-hydrochloridom s použitím metódy G. Finálny produkt sa prečistí semipreparatívnou vysokotlakovou kvapalinovou chromatografiou a získané frakcie sa analyzujú analytickou vysokotlakovou kvapalinovou chromatografiou.

Vysokotlaková kvapalinová chromatografia:

$R_t = 12,98$  min. ( $\text{H}_2\text{O}/\text{MeCN}$ ): 3 min. (60 : 40), 3 - 20 min. (0 : 100), 35 min. (0 : 100);

Hmotnostné spektrum: 1054 (M + H)<sup>+</sup>.

Príklad 21

Syntéza  $\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NHCH}_2\text{COGlu}[\text{N}(\text{CH}_3)_2]\text{N}[(\text{CH}_2)_{17}\text{CH}_3]_2$  (34) (RPR 131111A)

Produkt (30) sa kopuluje s dimetylaminom s použitím metódy G. Produkt sa prečistí semipreparatívnou vysokotlakovou kvapalinovou chromatografiou a získané frakcie sa analyzujú analytickou vysokotlakovou kvapalinovou chromatografiou.

Vysokotlaková kvapalinová chromatografia:

$R_t = 14,44$  min. ( $H_2O/MeCN$ ): 3 min. (60 : 40), 3 - 20 min. (0 : 100), 35 min. (0 : 100);

Hmotnostné spektrum: 920 (M + H)<sup>+</sup>.

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz,  $(CD_3)_2SO-d_6$ ,  $\delta$  v ppm):

0,89 (t, J = 7 Hz, 6H:  $CH_3$  postranných reťazcov),

1,25 (mt, 60 H:  $(CH_2)_{15}$  centrálné masných reťazcov),

1,43 a 1,60 (2 mts, 2H každý: 1  $CH_2$  každého masného reťazca),

1,65 (mt, 4H:  $(CH_2)_2$  centrálné butylu),

1,65 a 1,85 - 2,00 (2 mts, 1H každý:  $CH_2$  centrálné glutarylu),

1,95 (mt, 4H:  $CH_2$  propylu),

2,32 (AB limit., 2H:  $COCH_2$  glutarylu),

2,80 a 2,92 (2 s, 3H každý:  $CON(CH_3)_2$ ),

2,85 - 3,05 (mt, 12H:  $NCH_2$  butylu a  $NCH_2$  propylu),

3,00, 3,22, 3,45 a 3,58 (4 mts, 1H každý:  $NCH_2$  masných reťazcov),

3,78 (AB, J = 16 Hz, 2H:  $NCH_2CON$ ),

4,75 (mt, 1H:  $CONCHCON$  glutarylu),

8,72 (d, J = 7,5 Hz, 1H:  $CONH$  glutarylu),

8,85 a 8,90 - 9,15 (mfs vymeniteľné).

#### Príklad 22

Syntéza  $H_2N(CH_2)_3NH(CH_2)_4NH(CH_2)_3NHCH_2COGlyN-[(CH_2)_{11}CH_3]_2$  (35) (RPR 122767A)

Produkt sa syntetizuje rovnakým spôsobom ako produkt (6), pričom sa miesto dioktadecylamínu použije didodecylamín. Produkt sa prečistí semipreparatívnu vysokotlakovou kvapalinovou chromatografiou a získané frakcie sa analyzujú vysokotlakovou kvapalinovou chromatografiou.

Vysokotlaková kvapalinová chromatografia:

$R_t = 9,54$  min. ( $H_2O/MeCN$ ): 3 min. (60 : 40), 3 - 20 min. (0 : 100), 35 min. (0 : 100);

Hmotnostné spektrum: 653 (M + H)<sup>+</sup>;

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz,  $(CD_3)_2SO-d_6$  pri teplote 403 K,  $\delta$  v ppm):

0,93 (t, J = 7 Hz, 6H:  $CH_3$  masných reťazcov),

1,33 (mt, 36 H:  $(CH_2)_9$  centrálné masných reťazcov),

1,58 (mt, 4H: 1  $CH_2$  každého masného reťazca),

1,75 (mt, 4H:  $(CH_2)_2$  centrálné butylu),

1,95 a 2,00 (2 mts, 2H každý:  $CH_2$  centrálné propylu),

2,98 a 3,00 (2 mts, 12H celkove:  $NCH_2$  butylu a  $NCH_2$  propylu),

3,30 (t, J = 7 Hz, 4H:  $NCH_2$  masných reťazcov),

3,58 (s, 2H:  $NCH_2CON$ ),

4,05 (s, 2H:  $CONCH_2CON$  glycyly).

#### Príklad 23

Syntéza  $H_2N(CH_2)_3NH(CH_2)_4NH(CH_2)_3NHCH_2COGlyN-[(CH_2)_{12}CH_3]_2$  (36) (RPR 122774A)

Produkt (36) sa syntetizuje rovnakým spôsobom ako produkt (6), ale s použitím ditridecylamínu namiesto dioktadecylamínu. Produkt sa prečistí semipreparatívnu vysokotlakovou kvapalinovou chromatografiou a získané frakcie sa analyzujú vysokovýkonnou kvapalinovou chromatografiou.

Vysokotlaková kvapalinová chromatografia:

$R_t = 10,64$  min. ( $H_2/MeCN$ ): 3 min. (60 : 40), 3 - 20 min. (0 : 100), 35 min. (0 : 100);

Hmotnostné spektrum: 681 (M + H)<sup>+</sup>;

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz,  $(CD_3)_2SO-d_6$  pri teplote 393 K,  $\delta$  v ppm):

0,91 (t, J = 7 Hz, 6H:  $CH_3$  masných reťazcov),

1,33 (mt, 40 H:  $(CH_2)_{10}$  centrálné masných reťazcov),

1,58 (mts, 4H: 1  $CH_2$  každého masného reťazca),

1,75 (mt, 4H:  $(CH_2)_2$  centrálné butylu),

2,00 (mt, 4H:  $CH_2$  centrálné propylu),

2,98 a 3,08 (2 t, J = 7 Hz 12H celkove:  $NCH_2$  butylu a  $NCH_2$  propylu),

3,32 (t, J = 7 Hz, 4H:  $NCH_2$  masných reťazcov),

3,65 (s, 2H:  $NCH_2CON$ ),

4,06 (d, J = 4 Hz, 2H:  $CONCH_2CON$  glycyly),

8,10 (s šir., 1H:  $CONH$  glycyly).

#### Príklad 24

Syntéza  $H_2N(CH_2)_3NH(CH_2)_4NH(CH_2)_3NHCH_2COGlyN-[(CH_2)_{13}CH_3]_2$  (37) (RPR 122766A)

Produkt sa syntetizuje rovnakým spôsobom ako produkt (6), pričom sa miesto dioktadecylamínu použije ditridecylamín. Produkt sa prečistí semipreparatívnu vysokotlakovou kvapalinovou chromatografiou a získané frakcie sa analyzujú vysokotlakovou kvapalinovou chromatografiou.

Vysokotlaková kvapalinová chromatografia:

$R_t = 9,92$  min. ( $H_2O/MeCN$ ): 3 min. (60 : 40), 3 - 20 min. (0 : 100), 35 min. (0 : 100);

Hmotnostné spektrum: 709 (M + H)<sup>+</sup>;

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz,  $(CD_3)_2SO-d_6$  pri teplote 393 K,  $\delta$  v ppm):

0,90 (t, J = 7 Hz, 6H:  $CH_3$  masných reťazcov),

1,31 (mt, 44 H:  $(CH_2)_{11}$  centrálné masných reťazcov),

1,58 (mt, 4H: 1  $CH_2$  každého masného reťazca),

1,76 (mt, 4H:  $(CH_2)_2$  centrálné butylu),

2,00 (mt, 4H:  $CH_2$  centrálné propylu),

2,98 a 3,08 (mt resp. t, J = 7 Hz 12H celkove:  $NCH_2$  butylu a  $NCH_2$  propylu),

3,30 (t, J = 7 Hz, 4H:  $NCH_2$  masných reťazcov),

3,65 (s, 2H:  $NCH_2CON$ ),

4,06 (d, J = 4 Hz, 2H:  $CONCH_2CON$  glycyly),

8,10 (mf, 1H:  $CONH$  glycyly).

#### Príklad 25

Syntéza  $H_2N(CH_2)_3NH(CH_2)_4N[(CH_2)_3NH_2]CH_2COGlyN-[(CH_2)_{13}CH_3]_2$  (39) (RPR 126096A)

a)  $BocHN(CH_2)_3NBoc(CH_2)_4N[(CH_2)_3NHBoc]CH_2COOH$  (38)

V priebehu syntézy produktu (3) sa po prečistení chromatografiou na silikagéli izoluje produkt (38) vo výťažku 8 %.

Chromatografia na tenkej vrstve:

$R = 0,32$  ( $CHCl/MeOH$  v objemovom pomere 9 : 1);

Hmotnostné spektrum: 561 (M + H)<sup>+</sup>.

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz,  $(CD_3)_2SO-d_6$ ,  $\square$  v ppm):

1,30 - 1,60 (mt, 4H:  $(CH_2)_2$  centrálné butylu),

1,40 (s, 27H:  $C(CH_3)_3$ ),

1,56 (mt, 4H:  $CH_2$  propylu),

2,68 a 3,11 (t šir. resp. t, J = 7 Hz, 4H každý:  $NCH_2$  butylu a  $NCH_2$  propylu),

2,90 a 2,96 (2 q, J = 7 Hz, 2H každý:  $BocNHCH_2$  propylu),

3,18 (s, 2H:  $NCH_2COO$ ).

b)  $H_2N(CH_2)_3NH(CH_2)_4N[(CH_2)_3NH_2]CH_2COGlyN-[(CH_2)_{13}CH_3]_2$  (39)

Produkty (38) a (5) sa kopulujú s použitím metódy G. Produkt sa prečistí semipreparatívnu vysokotlakovou kvapalinovou chromatografiou a získané frakcie sa analyzujú vysokotlakovou kvapalinovou chromatografiou.



Vysokotlaková kvapalinová chromatografia:

$R_t = 13,60$  min. ( $H_2O/MeCN$ ): 3 min. (60 : 40), 3 - 20 min. (0 : 100), 35 min. (0 : 100).

Hmotnostné spektrum: 821 (M + H)<sup>+</sup>.

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub> s prídavkom niekoľkých kvapiék AcOH-*d*<sub>4</sub>, δ v ppm):

0,87 (t, J = 7 Hz, 6H: CH<sub>3</sub> mastných reťazcov),  
1,28 (mt, 60 H: (CH<sub>2</sub>)<sub>15</sub> centrálné mastných reťazcov),  
1,46 a 1,54 (2 mts, 2 H každý: 1 CH<sub>2</sub> každého mastného reťazca),  
1,63 (mt, 4H: (CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub> centrálné butylu),  
1,91 (mt, 4H: CH<sub>2</sub> centrálné propylu),  
2,85 - 3,15 (mt, 12 H: NCH<sub>2</sub> butylu a NCH<sub>2</sub> propylu),  
3,24 (mt, 4H: NCH<sub>2</sub> mastných reťazcov),  
3,76 (mf, 2H: NCH<sub>2</sub>CON),  
4,05 (s šir., 2H: CONCH<sub>2</sub>CON glycyly).

Príklad 26

Syntéza H<sub>2</sub>N(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NH(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NH(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NH(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CON-[(CH<sub>2</sub>)<sub>17</sub>CH<sub>3</sub>]<sub>2</sub> (41) (RPR 122786A)

a) BocHN(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NBoc(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NBoc(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NBoc(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-COOH (40)

Produkt (40) sa získa alkylačnou redukciou spermínu v prítomnosti NaCNBH<sub>3</sub> a semialdehydu kyseliny jantárovej v roztoku. Do banky s obsahom 200 ml sa predloží 1,8 g spermínu, 60 ml metanolu a 0,138 g NaCNBH<sub>3</sub>. Získaný roztok sa potom veľmi intenzívne mieša magnetickým miešadlom. Do banky sa potom pomocou izobarického lievika pridá počas 100 minút roztok 5,5 ml kyseliny 4-oxobutánovej (15 %) v 30 ml metanolu. V miešaní sa pokračuje počas ďalších 100 minút. Amíny sa chránia ochrannou skupinou Boc nasledovným spôsobom. K reakčnej zmesi sa prileje 2,8 ml TEA a potom roztok 8,8 g di-*tert*-butyl-dikarbonátu v 30 ml metanolu. Zmes sa mieša cez noc, potom sa odparí vo vákuu, produkt sa vypláchne etylacetátom a extrahuje sa roztokom hydrogenuhličitanu sodného (3 x 50 ml). Vodné vrstvy sa spoja a premyjú sa éterom (3 x 100 ml). pH vodnej vrstvy sa upraví na hodnotu 3 pomocou roztoku hydrogensíranu draselného, pričom dôjde k vzniku zákalu v dôsledku vyzrážania produktu (41). Zmes sa potom extrahuje etylacetátom (3 x 100 ml). Organická vrstva sa vysuší nad síranom horečnatým a odparí sa vo vákuu. Produkt sa použije v nasledujúcom stupni bez akéhokoľvek ďalšieho čistenia.

b) H<sub>2</sub>N(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NH(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NH(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NH(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CON-[(CH<sub>2</sub>)<sub>17</sub>CH<sub>3</sub>]<sub>2</sub> (41)

Produkt (40) a dioktadecylamín sa kopulujú s použitím metódy G. Produkt sa prečistí semipreparatívnu vysokotlakovou kvapalinovou chromatografiou a získané frakcie sa analyzujú vysokotlakovou kvapalinovou chromatografiou.

Vysokotlaková kvapalinová chromatografia:

$R_t = 15,04$  min. ( $H_2O/MeCN$ ): 3 min. (60 : 40), 3 - 20 min. (0 : 100), 35 min. (0 : 100).

Hmotnostné spektrum: 792 (M + H)<sup>+</sup>.

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, pri teplote 383 K, δ v ppm):

0,85 (t, J = 7 Hz, 6H: CH<sub>3</sub> mastných reťazcov),  
1,22 (mt, 60 H: (CH<sub>2</sub>)<sub>15</sub> centrálné mastných reťazcov),  
1,48 (mf, 4 H: 1 CH<sub>2</sub> každého mastného reťazca),  
1,72 (mt, 4H: (CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub> centrálné butylu),  
1,88 (mt, 2H: CH<sub>2</sub> centrálné aminopentanoylu),  
1,99 (mt, 4H: CH<sub>2</sub> propylu),

2,42 (t, J = 7 Hz, 2H: COCH<sub>2</sub> aminopentanoylu),  
2,96 - 3,03 a 3,22 (3 mts, 18 H celkove: NCH<sub>2</sub> aminopentanoylu), NCH<sub>2</sub> butylu, NCH<sub>2</sub> propylu a NCH<sub>2</sub> mastných reťazcov),

Príklad 27

Syntéza H<sub>2</sub>N(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NH(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NH(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NHCH<sub>2</sub>CONH-(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>CON[(CH<sub>2</sub>)<sub>17</sub>CH<sub>3</sub>]<sub>2</sub> (42) (RPR 128506A)

Produkt sa syntetizuje rovnako ako produkt (6), pričom sa však miesto Boc-Gly použije kyselina Boc-6-aminokaproová. Produkt sa prečistí semipreparatívnu vysokotlakovou kvapalinovou chromatografiou a získané frakcie sa analyzujú vysokotlakovou kvapalinovou chromatografiou.

Vysokotlaková kvapalinová chromatografia:

$R_t = 13,94$  min. ( $H_2O/MeCN$ ): 3 min. (60 : 40), 3 - 20 min. (0 : 100), 35 min. (0 : 100).

Hmotnostné spektrum: 877 (M + H)<sup>+</sup>.

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ v ppm):

0,87 (t, J = 7 Hz, 6H: CH<sub>3</sub> mastných reťazcov),  
1,28 (mt, 60 H: (CH<sub>2</sub>)<sub>15</sub> centrálné mastných reťazcov),  
1,48 (mt, 10 H: 1 CH<sub>2</sub> každého mastného reťazca a CH<sub>2</sub> centrálné aminoheksanoylu),  
1,65 (mt, 4H: (CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub> centrálné butylu),  
1,95 (mt, 4H: CH<sub>2</sub> propylu),  
2,27 (t, J = 7 Hz, 2H: COCH<sub>2</sub> aminoheksanoylu),  
2,85 - 3,30 (mts, 18 H: NCH<sub>2</sub> aminoheksanoylu, NCH<sub>2</sub> butylu, NCH<sub>2</sub> propylu a NCH<sub>2</sub> mastných reťazcov),  
3,70 (s šir., 2H: NCH<sub>2</sub>CON),  
7,90 - 9,10 (mfs vymeniteľné).

Príklad 28

Syntéza H<sub>2</sub>N(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NH(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NH(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NHCH<sub>2</sub>COGlu(11-*amid*-undekanyl-hepta-O-acetylaktózo)N[(CH<sub>2</sub>)<sub>17</sub>CH<sub>3</sub>]<sub>2</sub> (43) (RPR 130765A)

Produkt (30) sa kopuluje s 11-aminoundekanyl-hepta-O-acetylaktózou s použitím metódy G. Produkt sa prečistí semipreparatívnu vysokotlakovou kvapalinovou chromatografiou a získané frakcie sa analyzujú vysokotlakovou kvapalinovou chromatografiou.

Vysokotlaková kvapalinová chromatografia:

$R_t = 15,91$  min. ( $H_2O/MeCN$ ): 3 min. (60 : 40), 3 - 20 min. (0 : 100), 35 min. (0 : 100).

Hmotnostné spektrum: 1680 (M + H)<sup>+</sup>.

Príklad 29

Syntéza H<sub>2</sub>N(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NH(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NH(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NHCH<sub>2</sub>COAsm-[β-NAc(Ac)<sub>3</sub>]N[(CH<sub>2</sub>)<sub>17</sub>CH<sub>3</sub>]<sub>2</sub> (45) (RPR 131283A)

a) Fmoc-Asm-β-Glc-NAc(Ac)<sub>3</sub>-Dioktadecylamín

Produkt sa syntetizuje kopuláciou Fmoc-Asm-β-Glc-NAc(Ac)<sub>3</sub>-OH a dioktadecylamínu s použitím metódy F.

Chromatografia na tenkej vrstve:

$R_f = 0,67$  (CHCl<sub>3</sub>/MeOH)

Vysokotlaková kvapalinová chromatografia:

$R_t = 25,31$  min. ( $H_2O/MeCN$ ): 3 min. (60 : 40), 3 - 20 min. (0 : 100), 35 min. (0 : 100).

b) H<sub>2</sub>N(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NH(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NH(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NHCH<sub>2</sub>COAsm[β-NAc(Ac)<sub>3</sub>]N[(CH<sub>2</sub>)<sub>17</sub>CH<sub>3</sub>]<sub>2</sub> (45)

Odštiepenie ochrannej skupiny Fmoc produktu (45).

K 0,7 g produktu (45) sa prileje 20 ml dimetylformidu a 2 ml dietylaminu. Po 6 hodinovom miešaní sa reaktívna zmes odparí vo vákuu. Získaný produkt sa kopuluje s

produktom (3) použitím metódy G. Produkt sa prečistí semipreparatívnu vysokotlakovou kvapalinovou chromatografiou a získané frakcie sa analyzujú vysokotlakovou kvapalinovou chromatografiou.

Vysokotlaková kvapalinová chromatografia:

$R_f = 15,35$  min. ( $H_2O/MeCN$ ): 3 min. (60 : 40), 3 - 20 min. (0 : 100), 35 min. (0 : 100);

Hmotnostné spektrum: 1207 (M + H)<sup>+</sup>.

#### Príklad 30

Syntéza produktu (6) v roztoku vo veľkom meradle

Produkt (6) sa syntetizuje v roztoku redukčnou alkyláciou sperminu v prítomnosti  $NaCNBH_3$  a kyseliny glyoxylovej. Do banky s obsahom 2 litre sa predloží 18,2 g sperminu, 500 ml metanolu a 2 g kyanoborohydridu sodného. Získaný roztok sa intenzívne mieša magnetickým miešadlom. Do banky sa pomocou izobarického lievika pridá počas 100 minút roztok 8,45 g kyseliny glyoxylovej v 300 ml metanolu. Zmes sa mieša cez noc. Amíny sa chránia skupinou Boc nasledovným spôsobom. K zmesi sa prileje 14 ml TEA a potom roztok 100 g di-*tert*-butylidikarbonátu v 200 ml tetrahydrofuránu. Zmes sa mieša cez noc. Reakčná zmes sa zahustí za vákuua a produkt sa vypláchne etylacetátom (250 ml), premyje sa roztokom hydrogensíranu draselného (6 x 100 ml) a roztokom chloridu sodného (3 x 100 ml), vysuší sa nad síranom horečnatým a odparí sa za vákuua. Produkt sa prečistí na stĺpci silikagélu, pričom sa ako elučná sústava použije zmes chloroformu a metanolu v objemovom pomere 9 : 1. Frakcie obsahujúce produkt sa identifikujú chromatografiou na tenkej vrstve, spoja sa a odparia sa za vákuua, čím sa získa 10 g produktu (6). Celkový výťažok syntézy je 17 %.

Výsledky analýz uskutočnených analytickou vysokotlakovou kvapalinovou chromatografiou, hmotnostnou spektrometriou a nukleárnou magnetickorezonančnou spektroskopiou sú identické s výsledkami analýz pre produkt získaný metódou v tuhej fáze.

#### Príklad 31

Vplyv nábojového pomeru (amíny/fosfáty) na účinnosť transfekcie (7) RPR 120534A, (6) RPR 120535A a (9) RPR 120531A

Vzorky  $1 \times 10^5$  buniek (NIH 3T3, 3LL alebo kráľičia SMS) v exponenciálnej fáze rastu na  $2 \text{ cm}^2$  sa ošetrí roztokmi lipofektant/pCMV-LUC, ktoré sa vyznačujú rôznymi nábojovými pomermi počas dvoch hodín pri teplote  $37^\circ\text{C}$  a v atmosfére obsahujúcej 5 % oxidu uhličitého. Každá vzorka prijme 2  $\mu\text{g}$  nukleovej kyseliny. Expresia reportérového génu sa stanoví po pridaní 8 % fetálneho teľacieho séra a po 40 hodinovej inkubácii v sušiarňi s atmosférou oxidu uhličitého.

Aktivita luciferázy sa stanoví emisiou svetla (RLU = relatívna svetelná jednotka) v prítomnosti luciferínu, koenzýmu A a ATP počas 10 s a vzťahuje sa na 2000 ošetrovaných buniek. Získané výsledky sú graficky vyjadrené na pripojených obr. 1, obr. 2 a obr. 3.

Z týchto obrázkov jednoznačne vyplýva, že prítomnosť glycinu v ramene „spacer“ medzi lipidovou a polyamínovou časťou umožňuje dosiahnutie lepšej transfekčnej účinnosti pre nižšie pomery nmol kationového lipidu/ $\mu\text{g}$  DNA.

#### Príklad 32

Vplyv nábojového pomeru (amíny/fosfáty) na transfekčnú účinnosť (20) RPR 120527A, (19) RPR 120528A, (17) RPR 120526A a (16) RPR 120525A

Vzorky  $1 \times 10^5$  buniek NIH 3T3 v exponenciálnej fáze rastu na  $2 \text{ cm}^2$  sa ošetrí roztokmi lipofektant/pCMV-LUC, ktoré sa vyznačujú rôznymi nábojovými pomermi počas dvoch hodín pri teplote  $37^\circ\text{C}$  a v atmosfére s obsahom 5 % oxidu uhličitého. Každá vzorka prijme 1  $\mu\text{g}$  nukleovej kyseliny. Stanovenie expresie reportérového génu sa uskutoční po pridaní fetálneho teľacieho séra (finálne 8 %) a po 40 hodinovej inkubácii v sušiarňi s atmosférou oxidu uhličitého.

Aktivita luciferázy sa stanoví v supernatante získanom po lyze buniek svetelnou emisiou (RLU = relatívna svetelná jednotka) počas 10 s a vzťahuje sa na mg proteínu. Získané výsledky sú zhrnuté a vyjadrené graficky na obr. 4. Aj z tohto príkladu jednoznačne vyplýva výhoda prítomnosti glycinového zvyšku v ramene „spacer“.

#### Príklad 33

Vplyv dĺžky spaceru na účinnosť transfekcie (6) RPR 120535, (41) RPR 122786 a (42) RPR 128506

Vzorky  $1 \times 10^5$  buniek (NIH 3T3 alebo HeLa) v exponenciálnej fáze rastu na  $2 \text{ cm}^2$  sa ošetrí roztokmi lipofektant/pCMV-LUC, ktoré sa vyznačujú rôznymi koncentraciami kationového lipidu počas dvoch hodín pri teplote  $37^\circ\text{C}$  vo vlhkej atmosfére obsahujúcej 5 % oxidu uhličitého a v neprítomnosti sérového proteínu. K rastovému prostrediu buniek sa potom pridá fetálne teľacie sérum (finálne 8 %) a stanoví sa expresia transgénu a to až po dodatočnej 40 hodinovej inkubácii v sušiarňi s atmosférou oxidu uhličitého.

Štruktúrne charakteristiky spacerov sa uvádzajú v nasledovnej tabuľke:

N° RPR	Spacer
122786	-
120535	Gly
128506	$NH_2(CH_2)_5CO$

V nasledovnej tabuľke sú zhrnuté získané výsledky, ktoré sú vyjadrené ako maximálne účinnosti dosiahnuté pre každý zo študovaných produktov.

	Kationový lipid	Bunky HeLa	Bunky NIH 3T3
Pokus 1	RPR 120535 (6)	$1,2 \times 10^6 \pm 9,7 \times 10^4(4)$	$8,7 \times 10^7 \pm 4,5 \times 10^6(4)$
	RPR 122786 (41)	$2,3 \times 10^6 \pm 1,6 \times 10^5(8)$	$4,6 \times 10^7 \pm 5,0 \times 10^6(8)$
Pokus 2	RPR 120535 (6)	$2,4 \times 10^6 \pm 3,2 \times 10^5(6)$	$7,2 \times 10^7 \pm 8,3 \times 10^6(6)$
	RPR 128506 (42)	$1,8 \times 10^6 \pm 1,3 \times 10^5(6)$	$5,0 \times 10^7 \pm 1,5 \times 10^6(6)$

Transfekčné účinnosti sú udané v RLU/10s/2 x  $10^3$ . V zátvorkách sú uvedené pomery nmol lipidu/ $\mu\text{g}$  DNA.

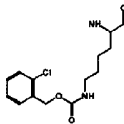
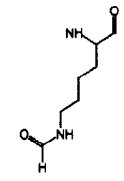
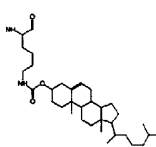
Pri pokusoch 1 a 2 sa použili rôzne plazmidy v dávke 1  $\mu\text{g}$ , resp. 0,5  $\mu\text{g}$  DNA/1 x  $10^5$  buniek.

#### Príklad 34

Vplyv štruktúry spaceru na transfekčnú účinnosť (6) RPR 120535

S použitím rovnakých experimentálnych podmienok, ako sa opisujú v predchádzajúcom príklade, ale pri zavedení suplementárneho bunkového radu (bunky 3LL), sa porovnali transfekčné účinnosti získané s kationovým lipidom (6) RPR 120535 modifikovaným substitúciou na „spaceri“ s použitím skupiny typu Arg, skupiny typu Lys alebo skupiny typu Glu.

V nasledovnej tabuľke sa uvádzajú štruktúry jednotlivých spacerov:

N° RPR	Spacer
120531	Arg
121650	Arg(Z) <sub>2</sub>
127888	Lys
122759	
122760	
128142	
120535	Gly
123027	GluOBz
126097	Glu

Účinnosti transfekcie sa udávajú v RLU/10 s/2 x 10<sup>3</sup> ošetrovaných buniek.

V pokusoch 1 a 2 sa použili rôzne plazmidy v dávke 0,5 µg resp. 1 µg DNA/1 x 10<sup>5</sup> buniek. Z analýzy výsledkov vyplýva, že v závislosti od uvažovaných buniek má prítomnosť aminokyselinového reťazca, ktorý je výhodne substituovaný, za následok zlepšenie transfekčnej účinnosti.

	Lipid	Bunky HeLa	Bunky NIH3T3	Bunky 3LL
Pokus 1	RPR120535	1,0.10 <sup>6</sup> ± 1,9.10 <sup>6</sup>	6,5.10 <sup>7</sup> ± 4,8.10 <sup>7</sup>	
	RPR120531	3,7.10 <sup>6</sup> ± 1,0.10 <sup>6</sup>	1,4.10 <sup>7</sup> ± 2,0.10 <sup>7</sup>	
	RPR121650	2,6.10 <sup>6</sup> ± 1,8.10 <sup>6</sup>	9,1.10 <sup>7</sup> ± 2,7.10 <sup>7</sup>	
Pokus 2	RPR120535	2,2.10 <sup>6</sup> ± 3,3.10 <sup>6</sup>		1,7.10 <sup>6</sup> ± 1,0.10 <sup>6</sup>
	RPR127888	3,1.10 <sup>6</sup> ± 2,9.10 <sup>6</sup>		1,4.10 <sup>6</sup> ± 1,7.10 <sup>6</sup>
	RPR122760	1,4.10 <sup>6</sup> ± 2,2.10 <sup>6</sup>		
	RPR122759	7,7.10 <sup>6</sup> ± 1,1.10 <sup>6</sup>		3,7.10 <sup>6</sup> ± 5,4.10 <sup>6</sup>
	RPR128142	6,3.10 <sup>6</sup> ± 6,3.10 <sup>6</sup>		9,1.10 <sup>6</sup> ± 9,3.10 <sup>6</sup>
	RPR126097	3,6.10 <sup>6</sup> ± 3,6.10 <sup>6</sup>		3,0.10 <sup>6</sup> ± 2,3.10 <sup>6</sup>
	RPR123027	1,0.10 <sup>6</sup> ± 4,1.10 <sup>6</sup>		6,9.10 <sup>6</sup> ± 1,1.10 <sup>6</sup>

#### Príklad 34

Vplyv prítomnosti DOPE v zmesi lipofektant/DNA (9) RPR 120531A

S použitím rovnakého postupu, ako sa použil v príklade 31, sa ku kationovému lipidu (9) RPR 120531A pridá DOPE (dioleoylfosfatidyletanolamín) na dosiahnutie rôznych molárnych pomerov pred pridaním DNA k transfekčnej zmesi. Účinnosť luciferázy sa stanoví v supernatante po lýze buniek a vzťahuje sa na mg proteínu (obr. 5). Prítomnosť DOPE v zmesiach lipofektantu umožňuje zlepšiť transfekčnú účinnosť v prípade, že je koncentrácia (9) RPR 120531A nízka.

#### Príklad 35

Vplyv séra na transfekčnú účinnosť (6) RPR 120535A, (9) RPR 120531A a (10) RPR 121650A

Vzorky 1 x 10<sup>5</sup> buniek (NIH 3T3 alebo HeLa) v exponenciálnej fáze rastu na 2 cm sa ošetrí roztokmi lipofektant (pCMV-LUC (3 nmol lipofektantu/ µg DNA) v neprítomnosti séra počas dvoch hodín alebo v prítomnosti séra v kultivačnom prostredí. V rámci tohto príkladu každá vzorka prijme 2 µg DNA. Expresia luciferázy sa stanoví v supernatante po lýze buniek, vyjadří sa v RLU/10s a vzťahuje sa na mg proteínu. Z analýzy výsledkov vyplýva, že prítomnosť séra nemá výrazný vplyv na účinnosť transfekcie.

#### Príklad 36

Vplyv koncentrácie nukleovej kyseliny v zmesi DNA/lipofektant (20) RPR 120527A, (19) RPR 120528A, (17) RPR 120526 a (16) RPR 120525A

S použitím rovnakých podmienok, ako sa opisujú v príklade 31, sa transfekujú vzorky buniek NIH 3T3 pri optimalizácii pomerov nmol lipofektantu/µg DNA (pozri príklad 32) (pomer = 6 pre (20) RPR 120527A a (19) RPR 120528A, pomer = 3 pre (17) RPR 120526A a (16) RPR 120525A. Množstvá DNA dodané každej vzorke sa menia od 0,5 do 2 µg. Získané výsledky sú zhrnuté a vyjadrené graficky na obr. 6.

Transfekcia 1 x 10<sup>5</sup> buniek v exponenciálnej fáze rastu s 1 µg plazmidovej DNA sa zdá byť dobrou voľbou. Zväčšenie množstva použitej DNA má v skutočnosti za následok zvýšenie koncentrácie kationového lipidu v styku s bunkami a teda v niektorých prípadoch problémy s toxicitou. Pri nižšej koncentrácii DNA sa už nedosahuje úmernosť s transfekčnou účinnosťou.

#### Príklad 37

Transfekčné testy *in vivo* s lipopolyamínmi podľa vynálezu

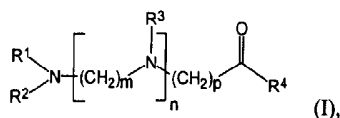
Uskutoční sa injekcia roztoku obsahujúceho lipopolyamín podľa vynálezu, pripraveného opísaným spôsobom, do nádoru 7 dní po implantácii, pričom sa myš anestetizuje zmesou Ketamínu a Xylazínu. Dva dni po injekcii sa odoberie nádorové tkanivo, ktoré sa odváži, rozreže a potom rozomelie v 200 µl pufru určeného na lýzu (Promega Cell Lysis Buffer E153 A). Po odstredení (20 000 g počas 10 minút) sa odoberie 10 µl vzorka, ktorá slúži na vyhodnotenie aktivity luciferázy zmeraním celkovej svetelnej emisie získanej po zmiešaní s 50 µl reakčného činidla (Promega Luciferase Assay Substrate) v luminometri Lumat LB 9501 (Berthold) pri integrácii počas 10 s. Rezultujúca účinnosť sa vyjadřila v RLU (Relative Lights Units) a vyhodnotila sa v celom supernatante nádorového lýzátu alebo sa vyjadřila v RLU/mg injikovanej DNA.

Získané výsledky sú zhrnuté v nasledovnej tabuľke.

označenie	Plazmid		Peptid		označenie	mmol/mg	Výsledok		n
	µg/	(DNA)	označenie	pept/DNA			označenie	primer	
pXL2622	10	0,5	6CTTKKAKKFP	1,5	(9)	3	679 258	414 286	9
pXL2622	10	0,5	"	"	(6)	"	395 433	219 333	10
pXL2622	10	0,5	"	"	(16)	"	67 994	82 527	8
pXL2622	10	0,5	"	"	(19)	"	59 269	54 375	9

## PATENTOVÉ NÁROKY

## 1. Lipopolyamín všeobecného vzorca (I)



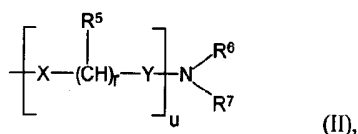
v ktorom

$\text{R}^1$ ,  $\text{R}^2$  a  $\text{R}^3$  nezávisle od seba znamenajú atóm vodíka alebo skupinu  $-(\text{CH}_2)_q\text{-NRR}'$ , v ktorej  $q$  môže znamenať 1, 2, 3, 4, 5 a 6, pričom môže mať v jednotlivých skupinách  $\text{R}^1$ ,  $\text{R}^2$  a  $\text{R}^3$  rovnaký alebo odlišný význam, a

$\text{R}$  a  $\text{R}'$  nezávisle od seba znamenajú atóm vodíka alebo skupinu  $-(\text{CH}_2)_{2q}\text{-NH}_2$ , v ktorej  $q'$  môže znamenať 1, 2, 3, 4, 5 a 6, pričom môže mať v jednotlivých skupinách  $\text{R}$  a  $\text{R}'$  rovnaký alebo odlišný význam,

$m$ ,  $n$  a  $p$  nezávisle od seba znamenajú celé číslo od 0 do 6, pričom, ak je  $n$  vyššie než 1,  $m$  môže mať rôzne hodnoty a  $\text{R}^3$  môže mať rôzne významy v rámci všeobecného vzorca (I), a

$\text{R}^4$  znamená skupinu všeobecného vzorca (II)



v ktorom

$\text{R}^6$  a  $\text{R}^7$  nezávisle od seba znamenajú atóm vodíka alebo nasýtenú alebo nenasýtenú alifatickú skupinu obsahujúcu 10 až 22 uhlíkových atómov, pričom aspoň jeden zo symbolov  $\text{R}^6$  alebo  $\text{R}^7$  je odlišný od atómu vodíka,

$u$  znamená celé číslo od 0 do 10, pričom ak  $u$  znamená celé číslo vyššie než 1, symboly  $\text{R}^5$ ,  $\text{X}$ ,  $\text{Y}$  a  $r$  môžu mať v jednotlivých štruktúrnych jednotkách  $(\text{X}-(\text{CHR}^5)_r-\text{Y})$  odlišné významy,

$\text{X}$  znamená atóm kyslíka, atóm síry alebo monoalkylovanú alebo nemonoalkylovanú aminovú skupinu,

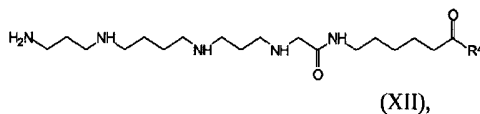
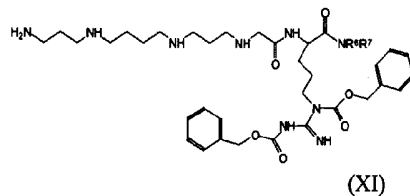
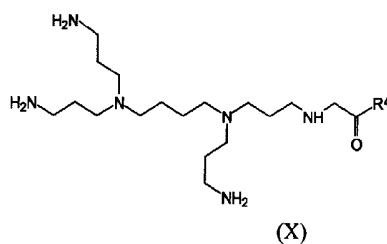
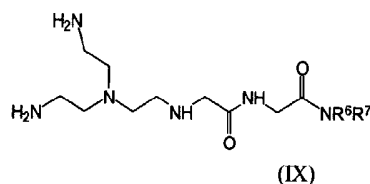
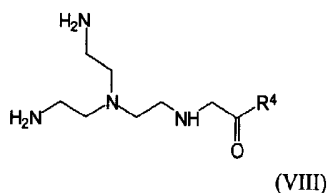
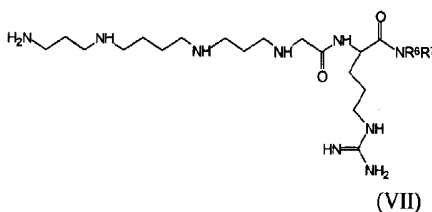
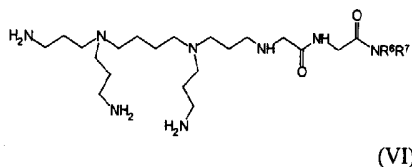
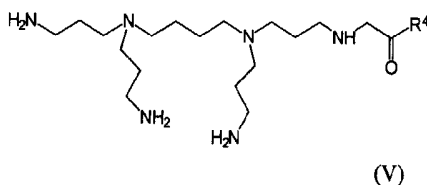
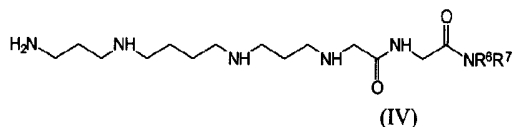
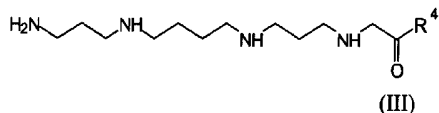
$\text{Y}$  znamená karbonylovú skupinu alebo metylénovú skupinu,

$\text{R}^5$  znamená atóm vodíka alebo bočný reťazec prírodnej aminokyseliny, ktorý je prípadne substituovaný, a

$r$  znamená celé číslo od 1 do 10, pričom, ak  $r$  sa rovná 1,  $\text{R}^5$  znamená bočný reťazec prírodnej aminokyseliny, ktorý je prípadne substituovaný, a ak  $r$  je väčšie než 1,  $\text{R}^5$  znamená atóm vodíka,

vo forme D, L alebo LD a jeho soli.

2. Lipopolyamín podľa nároku 1, ktorý má jeden z nasledovných všeobecných vzorcov



v ktorých symboly  $\text{R}^4$ ,  $\text{R}^6$  a  $\text{R}^7$  majú významy uvedené v nároku 1.

3. Lipopolyamín podľa nároku 2 všeobecných vzorcov (III) až (XII), v ktorých  $R^4$  znamená skupinu  $NR^6R^7$  a  $R^6$  a  $R^7$  znamenajú identickú skupinu zvolenú z množiny zahŕňajúcej skupinu  $(CH_2)_{11}CH_3$ , skupinu  $(CH_2)_{13}CH_3$  a skupinu  $(CH_2)_{12}CH_3$ .

4. Lipopolyamín podľa niektorého z predchádzajúcich nárokov, **v y z n a ě u j ú c i s a t ý m**, že je združený s extra- alebo intracelulárnym zameriavacím prvkom.

5. Lipopolyamín podľa nároku 4, **v y z n a ě u j ú c i s a t ý m**, že zameriavací prvok je zabudovaný na úrovni bočného aminokyselinového reťazca reprezentovaného substituentom  $R^5$ .

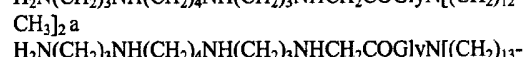
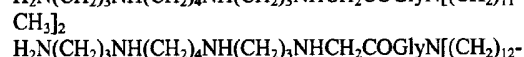
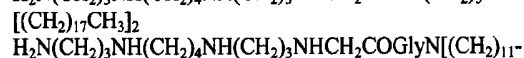
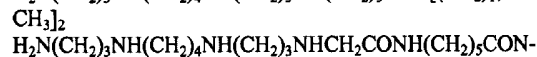
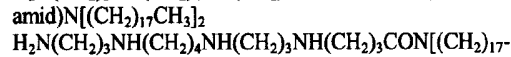
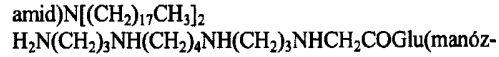
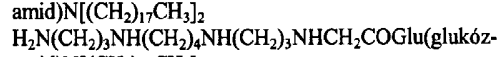
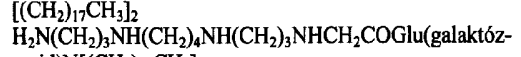
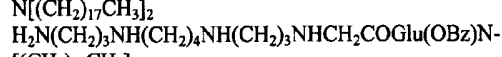
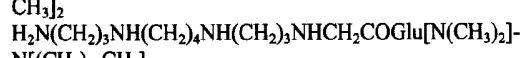
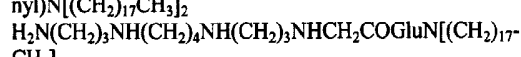
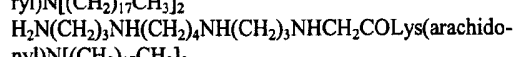
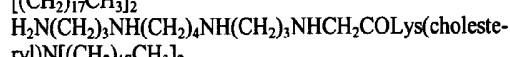
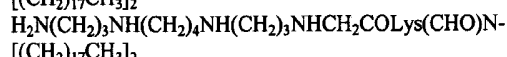
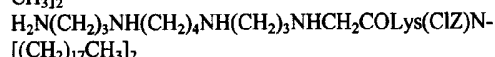
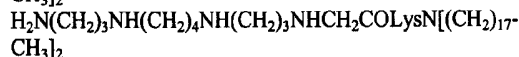
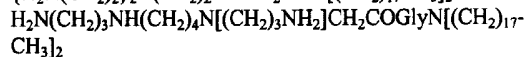
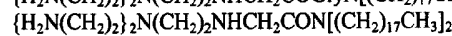
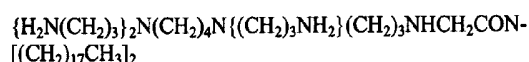
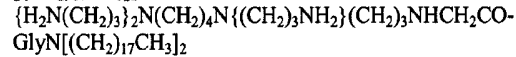
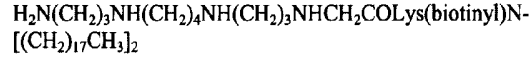
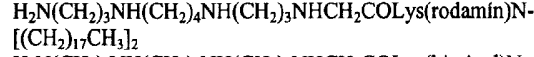
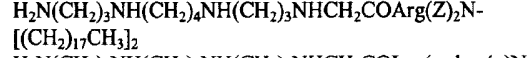
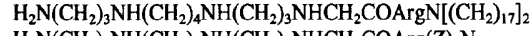
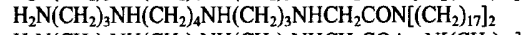
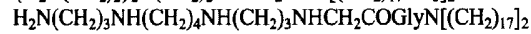
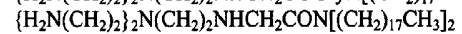
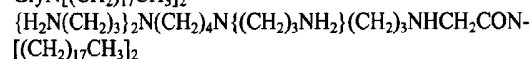
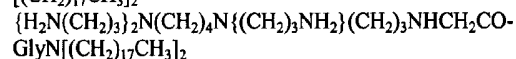
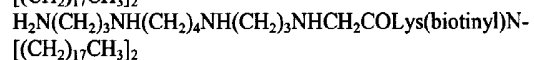
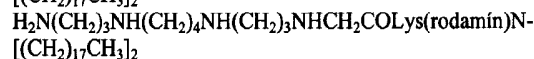
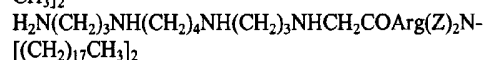
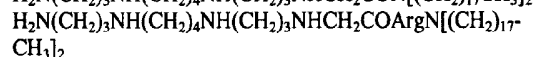
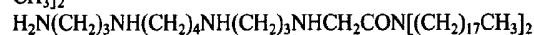
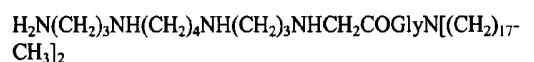
6. Lipopolyamín podľa nároku 4 alebo 5, **v y z n a ě u j ú c i s a t ý m**, že ide o bunkový receptorový ligand prítomný na povrchu cieľového bunkového typu.

7. Lipopolyamín podľa niektorého z predchádzajúcich nárokov 4 až 6, **v y z n a ě u j ú c i s a t ý m**, že zameriavací prvok je zvolený z množiny zahŕňajúcej cukry, peptidy, ako protilátky alebo fragmenty protilátok, bunkové receptorové ligandy alebo ich fragmenty, receptory alebo fragmenty receptorov, ako ligandy receptorov rastových faktorov, receptorov cytokínov, receptorov bunkových lektínov alebo receptorov adhézných proteínov typu integrínov a receptora transferínu, lipidy HDL alebo LDL a/alebo oligonukleotidy.

8. Lipopolyamín podľa niektorého z nárokov 4 alebo 5, **v y z n a ě u j ú c i s a t ý m**, že uvedený zameriavací prvok je reprezentovaný signálnou sekvenciou jadrovej lokalizácie.

9. Lipopolyamín podľa niektorého z predchádzajúcich nárokov, **v y z n a ě u j ú c i s a t ý m**, že je v ňom na úrovni bočného aminokyselinového reťazca reprezentovaného substituentom  $R^5$  zabudovaný marker typu biotínu, rodamínu, folátu alebo lineárna alebo cyklická peptidová sekvencia obsahujúca epitop Arg-Gly-Asp.

10. Lipopolyamín podľa niektorého z predchádzajúcich nárokov, **v y z n a ě u j ú c i s a t ý m**, že je zvolený z množiny zahŕňajúcej



11. Farmaceutická kompozícia, **v y z n a ě u j ú c a s a t ý m**, že obsahuje aspoň jeden lipopolyamín podľa niektorého z nárokov 1 až 10 a aspoň jednu nukleovú kyselinu.

12. Farmaceutická kompozícia podľa nároku 11, **v y z n a ě u j ú c a s a t ý m**, že nukleovou kyselinou je deoxyribonukleová kyselina.

13. Farmaceutická kompozícia podľa nároku 11, **v y z n a ě u j ú c a s a t ý m**, že nukleovou kyselinou je ribonukleová kyselina.

14. Farmaceutická kompozícia podľa nároku 11, 12 alebo 13, **v y z n a ě u j ú c a s a t ý m**, že nukleová kyselina je chemicky modifikovaná.

15. Farmaceutická kompozícia podľa niektorého z nárokov 11 až 14, **v y z n a ě u j ú c a s a t ý m**, že nukleovou kyselinou je antimediátorová nukleová kyselina.

16. Farmaceutická kompozícia podľa niektorého z nárokov 11 až 14, **v y z n a ě u j ú c a s a t ý m**, že nukleová kyselina obsahuje terapeutický gén.

17. Farmaceutická kompozícia obsahujúca nukleovú kyselinu, lipopolyamín podľa niektorého z nárokov 1 až 6 a prísadu schopnú pridružiť sa ku komplexu lipopolyamín-nukleová kyselina a alebo/ zlepšiť jeho transfekčnú účinnosť.

18. Farmaceutická kompozícia podľa nároku 17, **v y z n a ě u j ú c a s a t ý m**, že prísadou je jeden alebo niekoľko neutrálnych lipidov.

19. Farmaceutická kompozícia podľa nároku 18, **v y z n a ě u j ú c a s a t ý m**, že neutrálny lipid alebo

neutrálne lipidy sú zvolené z množiny zahŕňajúcej syntetické alebo prírodné lipidy, zwitteriónové lipidy a lipidy zba-vené iónového náboja vo fyziologických podmienkach.

20. Farmaceutická kompozícia podľa nároku 19, **v y z n a č u j ú c a s a t ý m**, že jedným alebo niekoľkými neutrálnymi lipidmi sú lipidy s dvoma masnými reťazcami.

21. Farmaceutická kompozícia podľa nároku 19 alebo 20, **v y z n a č u j ú c a s a t ý m**, že neutrálny lipid alebo neutrálne lipidy sa zvolia z množiny zahŕňajúcej dioleoyl-fosfatidyletanolamín (DOPE), oleoyl-palmitoyl-fosfatidyletanolamín (POPE), distearoyl-, dipalmitoyl- a dimirytoylfosfatidyletanol-amin, ako aj ich 1- až 3-krát N-metylované deriváty, fosfatidylglyceroly, diacylglyceroly, glykozyl-diacylglyceroly, cerebrozidy (ako najmä galaktocerebrozidy), sfingolipidy (ako najmä sfingomyelíny) a a-zialogangliosidy (ako najmä azialo GM1 a GM2).

22. Farmaceutická kompozícia podľa niektorého z nárokov 11 až 21, **v y z n a č u j ú c a s a t ý m**, že prísadou je alebo že prísada obsahuje zlúčeninu, ktorá pôsobí na úrovni kondenzácie uvedenej nukleovej kyseliny.

23. Farmaceutická kompozícia podľa nároku 22, **v y z n a č u j ú c a s a t ý m**, že uvedená zlúčenina je celkom alebo čiastočne odvodená od histónu, nukleolínu a alebo/ protamínu.

24. Farmaceutická kompozícia podľa nároku 22, **v y z n a č u j ú c a s a t ý m**, že uvedená zlúčenina je čiastočne alebo úplne tvorená peptidovými motívmi (KTPKKAKKP) a alebo/ (ATPAKKA), ktoré sa kontinuálne alebo nekontinuálne opakujú, pričom počet týchto motívov sa môže pohybovať medzi 2 a 10.

25. Farmaceutická kompozícia podľa niektorého z nárokov 11 až 24, **v y z n a č u j ú c a s a t ý m**, že obsahuje 0,01 až 20 ekvivalentov prísady na jeden ekvivalent nukleovej kyseliny, výhodne 0,5 až 5 ekvivalentov prísady na jeden ekvivalent nukleovej kyseliny, vyjadrené hmotnostne.

26. Farmaceutická kompozícia podľa niektorého z nárokov 11 až 25, **v y z n a č u j ú c a s a t ý m**, že obsahuje farmaceutický nosič na injikovateľnú formuláciu.

27. Farmaceutická kompozícia podľa niektorého z nárokov 11 až 25, **v y z n a č u j ú c a s a t ý m**, že obsahuje farmaceuticky prijateľný nosič na aplikáciu na pokožku a alebo/ sliznicu.

28. Použitie lipopolyamínu podľa niektorého z nárokov 1 až 10 na transfekciu buniek *in vivo* alebo *in vitro*.

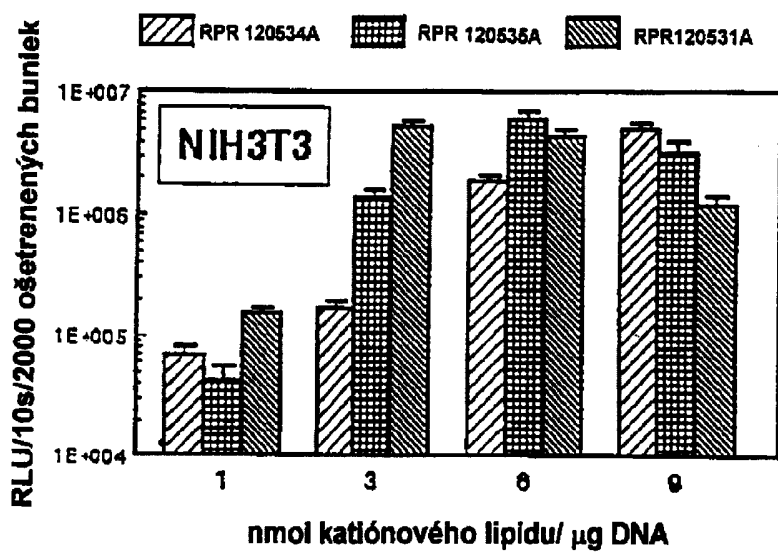
29. Spôsob prípravy lipopolyamínu podľa niektorého z nárokov 1 až 10, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že sa uskutoční kopolácia aspoň jednej lipidovej frakcie s aspoň jednou asymetrickou polyamínovou frakciou, pričom sa uvedená polyamínová frakcia získa vopred bimolekulárnou reakciou medzi alkylačným činidlom, ktoré sa kovalentne viaže na tuhý nosič, a symetrickým polyamínom.

30. Spôsob podľa nároku 29, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že kopolácia lipidovej frakcie s asymetrickou polyamínovou frakciou sa uskutočňuje na úrovni tuhého nosiča, ku ktorému sa viaže asymetrická polyamínová frakcia, a následne sa izoluje takto získaný lipopolyamín.

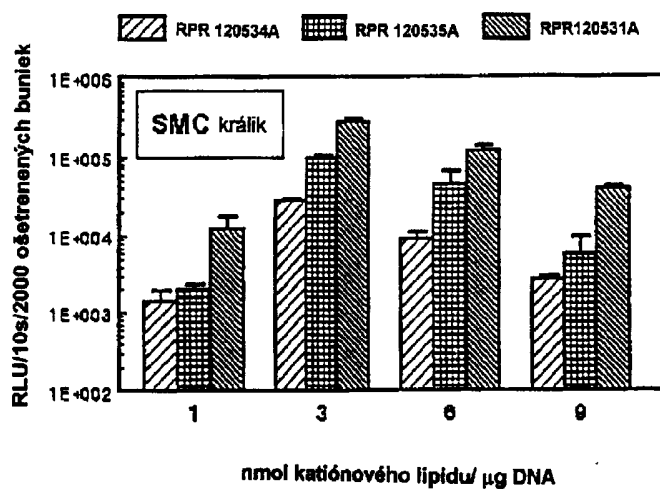
31. Spôsob podľa nároku 30, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že sa okrem toho uskutoční zavedenie markerov, cukrov alebo fluorescenčných sond na lipopolyamín, viazaný alebo neviazaný na tuhý nosič.

## 6 výkresov

1/6

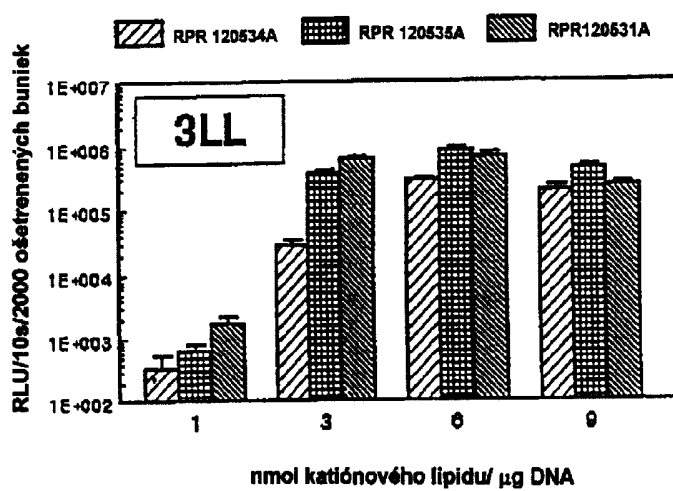
*Obr. 1*

2/6



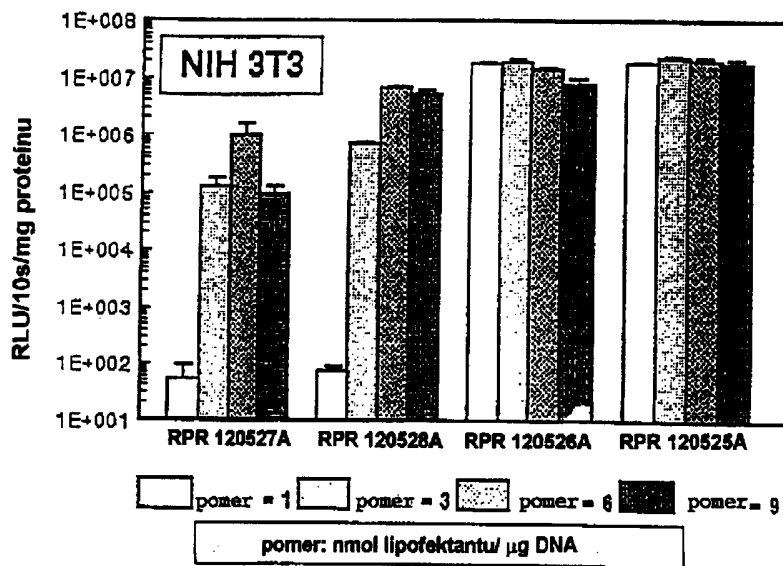
obr. 2



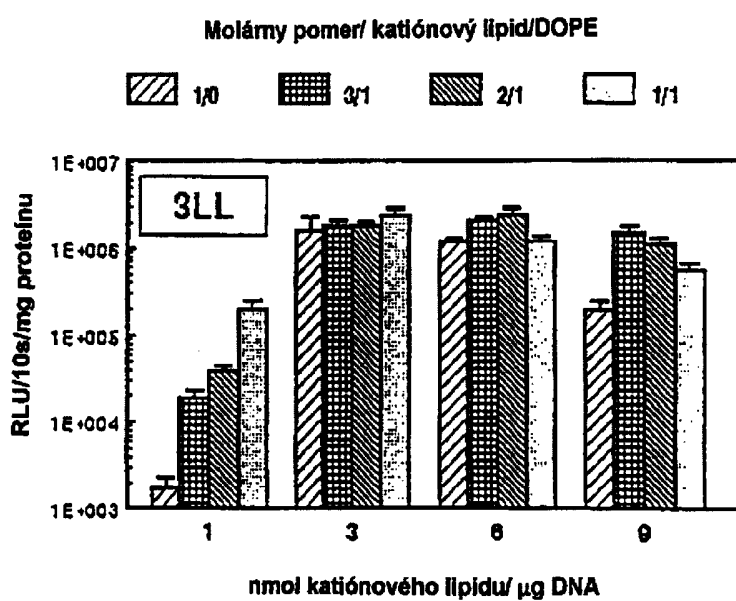


*Dbr. 3*

4/6

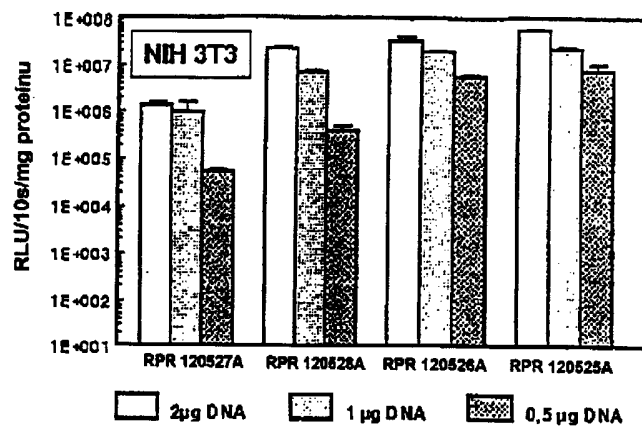


Pbr. 4



*obr. 5*

6/6



Bc. 6

Koniec dokumentu