

UNIVERZITA KARLOVA  
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ  
KATEDRA FARMACEUTICKÉ CHEMIE A FARMACEUTICKÉ ANALÝZY



PŘÍPRAVA SUBSTITUOVANÝCH AKRIDINŮ

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Kateřina Vořtová

Školitel: prof. PharmDr. Petr Zimčik, Ph.D.

Konzultant: Mgr. Filip Kostelanský

Hradec Králové, 2021

*„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci jsou řádně citovány. Práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu.“*

# Poděkování

Za odborné vedení mojí práce, vynaložené úsilí, trpělivost a ochotu, bych chtěla srdečně poděkovat svému školiteli prof. PharmDr. Petru Zimčíkovi, Ph.D. a konzultantovi Mgr. Filipu Kostelanskému.

Za vytvoření příjemného pracovního prostředí a všechny praktické rady bych ráda poděkovala také celé skupině Azaphthalocyanine group, jmenovitě doc. PharmDr. Miroslavu Miletínovi, Ph.D., Mgr. Michaele Kolářové, PharmDr. Jiřímu Demuthovi, Ph.D., PharmDr. Janu Kollárovi, Ph.D. a Mgr. Lucii Kočiščíkové.

Za změření dat chci poděkovat doc. PharmDr. Jiřímu Kunešovi, CSc. (NMR spektra), Mgr. Ondřeji Horáčkovi (MS spektra) a Ivě Vencovské (IČ spektra).

Za otestování látek pracovníkům firmy Generi Biotech.

Za finanční podporu chci poděkovat projektu 260 547 a Grantové agentuře UK (projekt 994218).

# Obsah

1.	Seznam použitých zkratek .....	1
2.	Cíl práce.....	2
3.	Teoretická část.....	4
3.1.	Akridin a jeho deriváty .....	4
3.1.1.	Akridin a jeho deriváty využívané v terapii .....	4
3.2.	Detekce sekvencí DNA.....	8
3.2.1.	Polymerázová řetězová reakce .....	8
3.2.2.	Sondy používané v qPCR.....	10
3.2.3.	Způsoby ovlivnění stability krátkých ODN sond .....	11
3.2.4.	Akridinem značené sondy .....	20
4.	Experimentální část .....	22
4.1.	Série A .....	23
4.1.1.	Příprava 2,2'-iminodibenzoové kyseliny (1).....	23
4.1.2.	Příprava methylesteru kyseliny 9-oxo-9,10-dihydroakridin-4-karboxylové (2)....	24
4.1.3.	Příprava 9-oxo-9,10-dihydroakridin-4-karboxylové kyseliny (3) .....	25
4.1.4.	Příprava <i>N</i> -(6-azidohexyl)-9-oxo-9,10-dihydroakridin-4-karboxamidu (5).....	26
4.1.5.	Příprava methylesteru kyseliny 9-{[2-(dimethylamino)ethyl]amino}akridin-4-karboxylové (6).....	27
4.1.6.	Příprava 9-{[2-(dimethylamino)ethyl]amino}akridin-4-karboxylové kyseliny (7) .....	28
4.1.7.	Příprava <i>N</i> -(6-azidohexyl)-9-{[2-(dimethylamino)ethyl]amino}akridin-4-karboxamidu (8) .....	29
4.2.	Série B .....	31
4.2.1.	Příprava kyseliny 2-[(2-karboxyfenyl)amino]isofthalové (10).....	31
4.2.2.	Příprava 9-oxo-9,10-dihydroakridin-4,5-dikarboxylové kyseliny (11) .....	32
4.2.3.	Příprava dimethylesteru kyseliny 9-oxo-9,10-dihydroakridin-4,5-dikarboxylové (12) .....	33
4.2.4.	Příprava dimethylesteru kyseliny 9-[(6-azidohexyl)amino]akridin-4,5-dikarboxylové (13) .....	34
4.2.5.	Příprava kyseliny 9-[(6-azidohexyl)amino]akridin-4,5-dikarboxylová (14) .....	35
4.2.6.	Příprava <i>N</i> <sup>4</sup> , <i>N</i> <sup>5</sup> -bis[(2-dimethylamino)ethyl]-9-oxo-9,10-dihydroakridin-4,5-dikarboxamidu (15).....	36
4.2.7.	Příprava 9-[(6-azidohexyl)amino]- <i>N</i> <sup>4</sup> , <i>N</i> <sup>5</sup> -bis[(2-dimethylamino)ethyl]akridin-4,5-dikarboxamidu (16) .....	37

4.2.8.	Příprava $N^4, N^5$ -bis[(2-Boc-ethylamino)ethyl]9-oxo-9,10-dihydroakridin-4,5-dikarboxamidu ( <b>17</b> ).....	38
4.3.	Navázání produktu <b>16</b> na ODN sondu.....	38
4.4.	Obecný postup při testování produktu <b>16</b> s ODN sondou v roztoku.....	40
4.5.	Spektrofotometrické titrace akridinu <b>16</b> s dsODN a ssODN.....	41
5.	Diskuse .....	42
5.1.	Série látek A .....	42
5.2.	Série látek B .....	46
5.3.	Navázání produktu <b>16</b> na ODN sondu.....	49
5.4.	Grafy ODN sond .....	51
5.5.	Spektrofotometrická titrace .....	57
6.	Závěr.....	59
7.	Seznam citované literatury .....	60

# Abstrakt

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra Katedra farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy

Kandidát Kateřina Voštová

Školitel prof. PharmDr. Petr Zimčík, Ph.D.

Konzultant Mgr. Filip Kostelanský

Název diplomové práce Syntéza substituovaných akridinů

Polymerázová řetězová reakce (PCR) v reálném čase je velmi často využívaná metoda v mnoha laboratořích pro diagnostické účely. Tato metoda spojuje PCR s využitím fluorescenčních signálních látek – sond za účelem sledování množství amplikonů během každého cyklu PCR. Existuje několik typů sond používaných pro analýzu deoxyribonukleové kyseliny. Krátké sondy nevytváří dostatečně termálně stabilní duplexy s cílovou sekvencí DNA, aby byly schopny odhalit špatné párování jednotlivé báze. Tato práce obsahuje přehled způsobů řešení ovlivnění termostability krátkých oligodeoxynukleotidových (ODN) sond. V praktické části byly připraveny dva strukturně odlišné deriváty akridinu, které díky schopnosti interkalace mezi báze DNA mohou zvyšovat termostabilitu duplexu sondy s cílovou sekvencí. Zvýšením termostability dochází i ke zvýšení teploty tání duplexu. Z tohoto důvodu tvoří akridinové deriváty perspektivní látky vhodné pro krátké ODN sondy, které se vyznačují nízkou termální stabilitou. Popsané reakce přípravy akridinových derivátů byly optimalizovány. V neposlední řadě byl jeden akridinový derivát otestován před i po navázání na ODN sondu za účelem prokázání vlivu na její termostabilitu.

# Abstract

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department      Department of Pharmaceutical Chemistry and Pharmaceutical  
Analysis

Candidate      Kateřina Voštová

Supervisor      prof. PharmDr. Petr Zimčík, Ph.D.

Consultant      Mgr. Filip Kostelanský

Title of Thesis      Synthesis of substituted acridines

Real-time PCR is a widely used method in many laboratories for diagnostic purposes. This method combines PCR with the use of fluorescent signaling agents, probes, to monitor the number of amplicons during each PCR cycle. There are several types of probes used for DNA analysis. Short probes do not form sufficiently stable duplexes with the target DNA sequence to be able to detect single base mismatching. This work provides an overview of the oligodeoxynucleotides (ODN) probes in use and in what way is their thermostability is affected. In the practical part, two structurally distinct acridine derivatives were prepared because they may increase duplex thermostability due to their ability to intercalate between DNA bases. By increasing the thermostability, the melting temperature of the duplex between probe and the target sequence is also increased. For this reason, acridine derivatives form promising compounds suitable for short ODN probes that are characterized by low thermal stability. The described reactions for the preparation of acridine derivatives have been optimized. Finally, one acridine derivative was tested before and after binding to the ODN probe to demonstrate the effect on thermostability of the duplex.



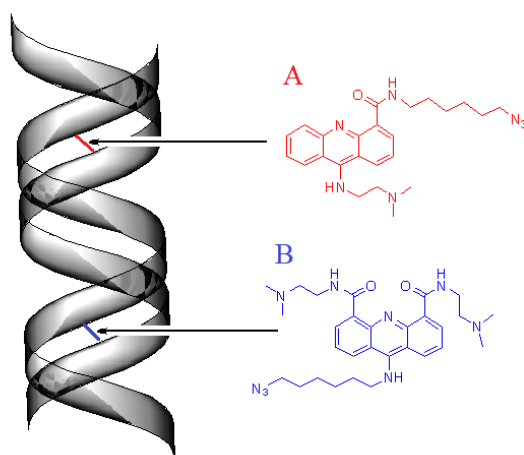


# 1. Seznam použitých zkratek

DAD	Detektor diodového pole
DCM	Dichlormethan
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
dsDNA	Dvouvláknová DNA (z anglického double stranded DNA)
EAC	Ethylacetát
FAM	6-karboxy fluorescein
HEX	Hexan
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (z angl. High-performance liquid chromatography)
LNA	Locked nucleic acid
MeOH	Methanol
MGB	Látka vázající se do malého žlábků DNA (z angl. minor groove binder)
MS	Hmotnostní spektrometrie
NK	Nukleová kyselina
NU	Nežádoucí účinek
ODN	Oligodeoxynukleotid
PCR	Polymerázová řetězová reakce
PNA	Peptidová nukleová kyselina
qPCR	kvantitativní PCR
RNA	Ribonukleová kyselina
R <sub>f</sub>	Retenční faktor
SNP	Mutace v jednom nukleotidu (z anglického single nucleotide polymorphisms)
ssDNA	Jednovláknová DNA (z anglického single stranded DNA)
TEA	Triethylamin
TFA	Trifluoroctová kyselina
THF	Tetrahydrofuran
TLC	Tenkovrstvá chromatografie (z angl. Thin Layer Chromatography)
ZNA	Z angl Zip Nucleic Acids

## 2. Cíl práce

Tato práce je zaměřena na syntézu nových akridinových derivátů. Akridinové deriváty pro tento projekt byly vybrány díky své schopnosti interkalace mezi báze deoxyribonukleové kyseliny (DNA), která je známá již několik desetiletí. Díky tomu se zvyšuje termostabilita i teplota tání duplexu sondy s cílovou sekvencí. Z tohoto poznatku vychází i následná aplikace interkalátorů jako stabilizátorů duplexu krátkých oligodeoxynukleotidových (ODN) sond. Při interkalaci dochází ke zvýšení pevnosti vazby mezi řetězci dvouvláknové DNA pomocí nekovalentních vazeb s interkalátorem. Jsou to převážně  $\pi$ - $\pi$  interakce, vodíkové vazby, iontové vazby, hydrofobní interakce a van der Waalsovy síly.<sup>1</sup>  $\pi$ - $\pi$  interakce se tvoří mezi akridinovým kruhem a bázemi. Iontové vazby vznikají mezi kyselými fosfáty tvořící kostru DNA a bazickým substituentem interkalátoru. Nejvhodnější substituent je takový, který může být protonizován ve fyziologickém pH, např. aminoskupina.<sup>2</sup>

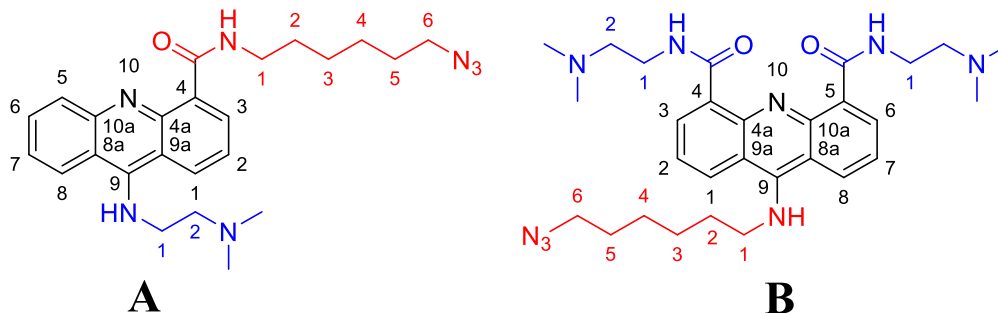


Obrázek 1. Interkalace akridinových derivátů mezi báze DNA.

Cílem práce byla příprava akridinových derivátů, které lze vhodnou metodou připojit na ODN sondu. Zároveň nesmí ztratit schopnost interkalace (Obrázek 1), která zpevňuje vazbu a zvyšuje teplotu tání duplexu sondy s cílovou sekvencí. Konkrétně byly pro tento projekt vybrány takové deriváty akridinu (Obrázek 2), které mají v pozici 9 akridinu navázaný *N,N*-dimethylaminoethylamin a v pozici 4 navázaný *N*-6-(azidohexan)karboxamid (viz série látky A). Azidoskupina je klíčová k azid-alkynové cykloadici potřebné k navázání na ODN sondy pomocí tzv. click

## Cíl práce

chemie. Jako druhá cílová struktura byl vybrán derivát akridinu, který měl v pozici 9 navázaný 6-(azidohexan)amin. Zároveň v pozici 4 a 5 navázaný karboxamid nesoucí bazickou skupinu (viz série látky B).



Obrázek 2. Požadované produkty syntézy A a B.

## 3. Teoretická část

### 3.1. Akridin a jeho deriváty

Akridin je tricyklický kondenzovaný heterocyklus, který vychází ze struktury anthracenu. Jeden z centrálních uhlíků je nahrazený atomem dusíku.<sup>3</sup> Jedná se o slabě bazickou látku. Molekula tvoří planární uspořádání, které je zodpovědné za jeho schopnost interkalace mezi báze DNA.

Akridin byl poprvé izolován v roce 1870 německým chemikem Heinrichem Caro z černouhelného dehtu. Zpočátku byl akridin a jeho deriváty využíván jako surovina k přípravě barviv na kůži a tisk.<sup>4</sup> Avšak zájem o tuto perspektivní molekulu začal s příchodem 20. století narůstat.

Na začátku 20. století byly poprvé aminoakridiny použity jako léčivé přípravky s antimikrobním účinkem. Jednalo se o akriflavin a proflavin. Během první světové války byly využívány jako antiseptika na rány.<sup>5</sup> Antimalarické účinky mepakrinu byly využity v druhé světové válce při nedostatku chlorochinu.

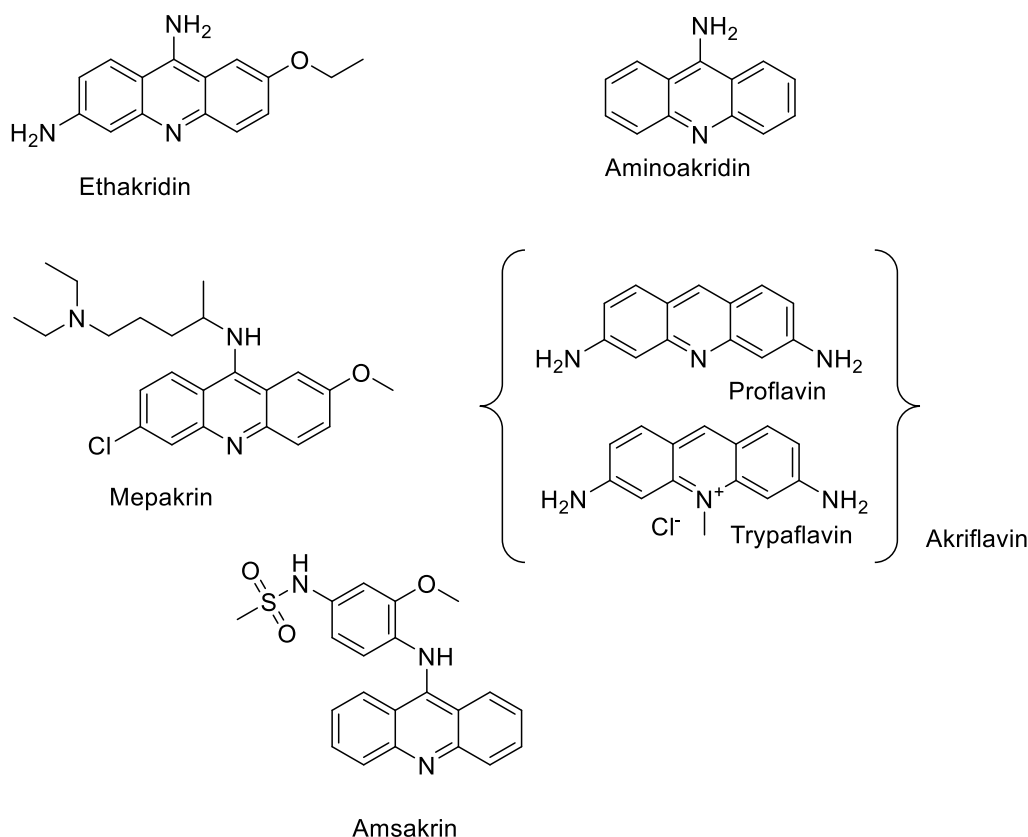
V 70. letech byla zjištěna jejich výrazná protinádorová aktivita, která otevřela novou oblast rozsáhlého výzkumu. Protinádorová aktivita je způsobena schopností interagovat s DNA interkalací mezi báze DNA a interakcí s topoizomerázou II.<sup>6</sup> Výzkum probíhal i v dalších oblastech medicíny, například byly studovány antimikrobiální, antiparazitické a antifungální vlastnosti.<sup>7</sup>

Na začátku 21. se mnohonásobně zvýšil zájem o výzkum v molekulární biologii pro jejich fluorescenční schopnosti, které lze využívat pro diagnostiku nemocí, genetických mutací a dalších účelů. Zároveň probíhá výzkum protinádorových látek, látek působící proti parazitům, malárii nebo působící proti prionům.<sup>8,9</sup>

#### 3.1.1. Akridin a jeho deriváty využívané v terapii

Díky dlouhodobému vývoji léčiv na bázi akridinu a jeho derivátů lze nalézt terapeuticky používané i obsoletní léčivé přípravky. Společným znakem je jejich akridinové jádro, které se liší substituenty (Obrázek 3). Nejčastějšími substituenty jsou

polární substituenty, jako jsou primární a sekundární aminoskupiny. Jejich variabilita v substituentech se odráží v různorodosti klinického použití jednotlivých látek.



Obrázek 3. Akridinové deriváty používané v terapii.

**Ethakridin** (Rivanol®) je slabá báze, která patří do skupiny akridinových barviv. Chemicky se jedná o 6,9-diamino-2-ethoxyakridin, využívaný ve formě soli, laktátu.<sup>10</sup> Jedná se o široce používané léčivo v lokální léčbě zánětlivých nebo ulcerativních stavů kůže, zejména ekzému v důsledku venózní stagnace. Při perorálním užití působí primárně lokálně ve střevě, není absorbován do systémového řečiště.<sup>11</sup> Má adstringentní a antibakteriální efekt. Dnes je v tomto využití obsoletní. V 60. letech 20. století bylo jeho použití zneužíváno k ukončení těhotenství v druhém a třetím trimestru.<sup>12</sup> Díky tomu byl rozvíjen výzkum jeho abortivních účinků. Ze studií vyplynulo, že kontraktilní účinek etakridinu je zprostředkován aktivací žírných buněk v myometriu, které uvolňují mediátory, jako je prostaglandin F2a, prostaglandin E2, prostacyklin a tromboxan A2.<sup>13</sup> Jeho použití k ukončení těhotenství je považováno za bezpečné, avšak výhodnější je kombinace s mifepristonem.<sup>14</sup>

**Aminoakridin**, chemicky 5-aminoakridin, je slabá báze. Byl používán jako antiseptická látka během první světové války. Po perorálním užití je vysoce toxický, proto se používal pouze lokálně. Při přikládání obkladů roztoku aminoakridinu na rány byly zaznamenány jen nepatrné NU a dobrá účinnost.<sup>15</sup> V 50. letech byl popsán vznik rezistence u některých kmenů bakterií, např. *Bacillus lactis aerogenes*. Díky tomu se přestaly používat.<sup>16</sup>

**Mepakrin** (Atrabine<sup>®</sup>) nazývaný chinakrin, je derivát akridinu, který byl poprvé syntetizován v roce 1933 a byl široce používán během druhé světové války jako antimalarikum. Pro tehdejší dobu bylo výhodou prodloužení doby relapsů až na dobu 7 týdnů. Je to dáno eliminačním poločasem molekuly. Chinakrin působí jako interkalátor DNA. Inhibuje aktivitu hexokinázy parazitovaných erytrocytů a zároveň i metabolismus glukózy parazita, tím zastavuje množení plasmodií.<sup>17</sup> Jeho další použití byla od 80. let léčba giardiózy, jejíž výzkum probíhá dodnes.<sup>18</sup> Díky nežádoucím účinkům bylo upuštěno od jeho používání.

**Akriflavin** (Acriflavine<sup>®</sup>) směs 3,6-diamino-10-methylakridiniumchloridu (trypaflavin) a 3,6-diaminoakridinu (proflavin) byla primárně používána jako antiseptikum, fungicidum a měla dobrý účinek proti parazitickým infekcím.<sup>19</sup> Proflavin obsahuje aminoskupiny, které interagují iontovou vazbou s negativně nabitými fosfáty DNA, zatímco se aromatický planární kruh interkaluje mezi báze DNA. Díky výrazné interkalační schopnosti je zkoumán jako protinádorová látka, konkrétně u kolorektálního karcinomu. Dosud má protinádorový účinek potvrzen u různých solidních nádorů, jako je osteosarkom, rakovina prsu, mozku, plic.<sup>20</sup> Zároveň účinně inhibuje rezistenci na léky u epiteliálně-mezenchymálních buněk rakoviny slinivky a jater.<sup>21</sup> Při dlouhodobé podávání akriflavinu pacientům s AIDS jako antivirotika, nebyly odhaleny žádné závažné vedlejší účinky, což naznačuje, že by mohl být použit samostatně nebo v kombinaci s jinými léky k překonání odolnosti rakovinných buněk vůči chemoterapii.<sup>22</sup>

**Amsakrin** (Amsidyl<sup>®</sup>). Jedná se o derivát akridinu obsahující anilinový kruh, díky kterému je zvýšena lipofilita molekuly. Ta ovlivňuje výrazně protinádorovou aktivitu molekuly.<sup>23</sup> Amsakrin interkaluje mezi báze DNA bez specifity k bázím DNA, tím vede k nestabilitě DNA vláken. Inhibicí topoizomerázy II způsobuje přerušení dvouvláknové

DNA, způsobuje zlomy vláken a buněčnou smrt. Kromě toho může amsakrin indukovat transkripci proteinu p53 promotoru tumoru a blokovat ubikvitinaci p53 a proteazomální degradaci, což vede k apoptóze nádorových buněk závislých na p53.<sup>24</sup> Kromě protinádorové aktivity má i antivirové a imunosupresivní účinky. Amsakrin je u nás registrovaný na léčbu akutní myeloidní leukémie.

## 3.2. Detekce sekvencí DNA

### 3.2.1. Polymerázová řetězová reakce

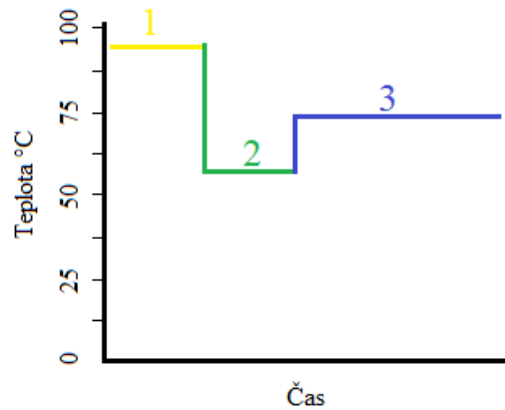
Vývoj PCR (polymerase chain reaction) metody je spjatý s pokrokem molekulární biochemie, konkrétně s objasněním struktury DNA. PCR metoda byla vyvinuta v roce 1984 americkým biochemikem Kary Mullisem, který v roce 1993 získal za tento objev Nobelovu cenu za chemii.<sup>25</sup> V dnešní době slouží jako jedna z nepostradatelných a často využívaných metod v toxikologii, farmakologii a onkologii.<sup>26</sup> Také v oblasti klinické mikrobiologie a k lékařským diagnostickým účelům.<sup>27</sup>

Při PCR dochází k amplifikaci (tzn. zmnožení) určitých sekvencí DNA. Na vytvoření velkého množství kopií sekvencí, v řádu milionů, stačí jen několik hodin. PCR metodu lze popsat ve třech hlavních krocích, které se cyklicky opakují. Prvním krokem je denaturace, kdy dochází k zahřátí vzorku na teplotu 90-97 °C po dobu 20-30 sekund (Obrázek 4). V důsledku zvýšení teploty dochází k rozpadu sekundární struktury DNA, konkrétně k rozrušení vodíkových můstků. Pro přesný výsledek je nezbytná kompletní denaturace templátu, v případě nedokonalé denaturace dochází k rychlé renaturaci DNA a chybnému nasednutí primerů ve druhém kroku PCR. To může zapříčinit falešný výsledek.

Ve druhém kroku dochází k anelační fázi. Při ní dochází k hybridizaci (nasednutí) primeru na obě vlákna denaturované DNA, konkrétně na jejich 3' - konec. Z tohoto místa se syntetizuje komplementární kopie vlákna DNA. K tomu jsou potřeba volné báze v reakčním prostředí. Anelační fáze je možná díky ochlazení systému na teplotu 50-60 °C, teplota se může mírně lišit v závislosti na typu primerů.

Posledním krokem PCR je elongační fáze. Při ní dochází k paralelně probíhající syntéze komplementárního vlákna z templátů ve směru 5'→3' konec. Syntéza je zprostředkována Taq polymerázou při optimální teplotě 72 °C po dobu 2-5 min. Dojde ke vzniku dvou nových vláken z původního templátu. Nově vzniklé úseky DNA vlákna slouží jako templáty pro další PCR cyklus. Díky tomu dochází k exponenciálnímu nárůstu amplifikovaných úseků DNA.<sup>25</sup>

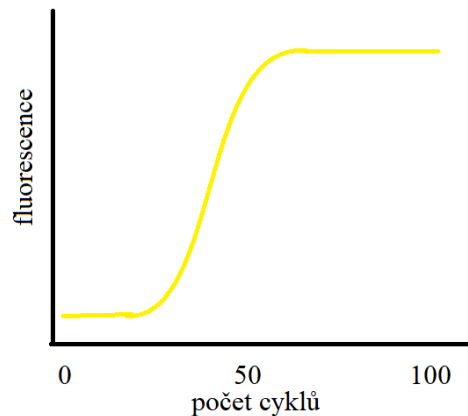




Obrázek 4. Schéma teplotního rozložení při PCR cyklu.

1. krok denaturace, 2. krok anelační fáze, 3. krok elongační fáze.

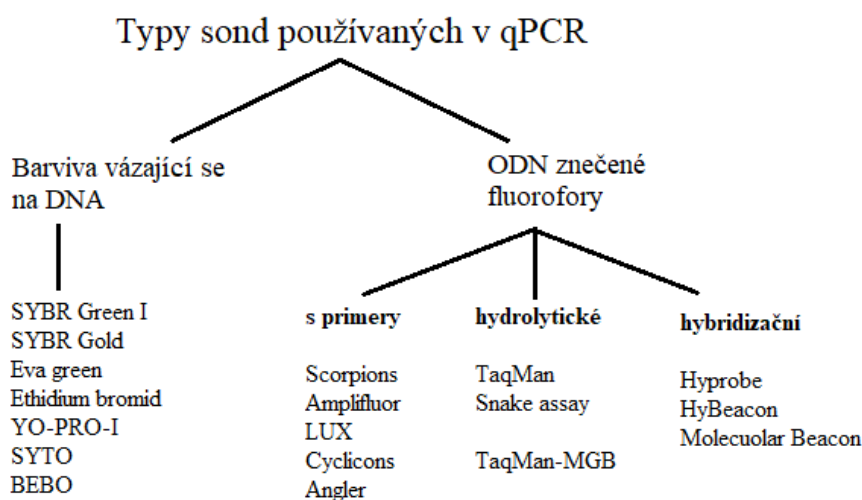
Obrovský zájem o PCR metodu způsobil vývoj více typů PCR metod. Mezi atraktivní metody dnes patří PCR v reálném čase, někdy nazývaná kvantitativní PCR (qPCR z anglického quantitative polymerase chain reaction). Tato metoda spojuje průběh PCR s použitím signálních molekul. Ty jsou schopny kvantitativně zaznamenávat množství ampliconů v reálném čase během každého cyklu PCR.<sup>28</sup> Signální molekuly se označují jako sondy a mají fluorescenční schopnosti. Dle použitého typu sondy se v průběhu qPCR buď zvyšuje nebo snižuje fluorescence v závislosti na množství vzniklých ampliconů (Obrázek 5).



Obrázek 5. Křivka odezvy qPCR. Nárůst fluorescence s množstvím cyklů qPCR.

### 3.2.2. Sondy používané v qPCR

Spojením qPCR a signálních fluorescenčních sond je docíleno získání velmi citlivého, specifického výsledku a zároveň snadno opakovatelné metody s nízkým rizikem kontaminace vzorku. Využívané sondy jsou primárně děleny na dva hlavní typy. Prvním jsou fluorescenční barviva vázající se na DNA a druhým ODN značené fluorofory, které jsou dále děleny do tří podskupin. Jejich přehled je uveden v (Obrázek 6).<sup>29</sup>



Obrázek 6. Přehled typů fluorescenčních sond používaných v qPCR.<sup>29</sup>

#### 3.2.2.1. Oligodeoxynukleotidové sondy značené fluorofory

Dle způsobu generování signálu dělíme tyto sondy na dvě hlavní skupiny. První možností je fluorescenční rezonanční přenos energie (FRET). Jedná se o elektrodynamický jev popisující přenos energie mezi dvěma chromofory citlivými na světlo.<sup>30</sup> Dochází k přenosu energie z donorového fluoroforu (nezářivě) na akceptor, který je stimulován do excitovaného stavu a vyzáří fluorescenci s jinou vlnovou délkou. To vše prostřednictvím dipólově-dipólových interakcí. Jedná se o jev převážně závislý na vzdálenosti mezi párem FRET, který se pohybuje od 1 do 10 nm. Pro úspěšnou existenci FRET páru musí být splněny některé nevyhnutelné podmínky:<sup>31</sup>

- Donor a akceptor musí mít silné elektronické přechody ve viditelné nebo UV oblasti spektra.

- Nutná je těsná blízkost mezi donorem a akceptorovou molekulou.
- Dostatečný spektrální překryv fluorescenčního spektra donoru s absorpčním spektrem akceptoru.
- Relativní orientace mezi přechodovými dipóly donoru a akceptoru by neměla být příliš malá.

Druhým způsobem je statické zhášení (z angl. Static quenching). To je charakterizováno tvorbou nefluorescenčních komplexů mezi zhášečem a fluoroforem v základním stavu.<sup>32</sup> Při statickém zhášení se fluorescenční emise snižuje, aniž by se změnila doba života excitovaného stavu nebo kvantový výtěžek.

### 3.2.3. Způsoby ovlivnění stability krátkých ODN sond

Tyto ODN jsou navrženy tak, aby v reakci byly nejprve hybridizovány primery, až poté ODN sondy. K dodržení této podmínky musí být teplota tání ( $T_m$ ) duplexu sond s cílovou sekvencí větší než duplexu primeru s cílem. To znamená, že sondy by měly být delší než primery. Čím delší však sondy jsou, tím se zvyšuje jejich termostabilita a zároveň i pravděpodobnost, že se zamaskuje mismatch (tzn. nedokonalá hybridizace sondy s templátovou DNA) a neprojeví se na termostabilitě duplexu. Proto jsou delší sondy méně citlivé na rozlišení SNP (single nucleotide polymorphisms). To způsobuje falešné výsledky. Navrhování delších sond proto není správným řešením. Z tohoto důvodu byly vytvořeny látky, které mají potenciál zvýšit termostabilitu krátké ODN sondy s cílovou sekvencí a tím i zvýšit teplotu tání vznikajícího duplexu.<sup>33</sup> Tím dojde k přesnějšímu odhalení mismatche z důvodů nižší termostability duplexu než u dlouhých ODN sond, avšak s dostatečnou termostabilitou duplexu k detekci mismatche. Do praxe jsou zaváděny látky zvyšující termostabilitu duplexů ODN sond s cílem, které jsou popsány dále v textu.<sup>34</sup>

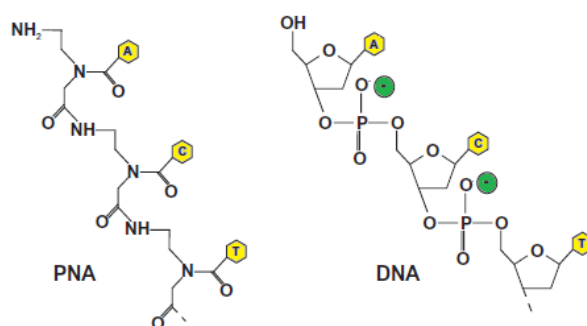
#### 3.2.3.1. Modifikované nukleové kyseliny

Jednou z možností zvýšení termostability duplexu sond s cílem a jeho  $T_m$  je použití analogů nukleových kyselin (NK). Jedná se o NK strukturně podobné přirozeně se

vyskytujícím NK. Tyto analogy jsou vyráběny za účelem zvýšení afinity ke komplementárním vláknům DNA.

### 3.2.3.1.1. PNA

Peptidové nukleové kyseliny (PNA) jsou analogy DNA s kostrou tvořenou jednotkami *N*-(2-aminoethyl)glycinu spojené peptidovými vazbami. Díky tomu, že jsou elektricky neutrální, nedochází k repulzním silám mezi řetězci.<sup>35</sup> Tvoří stabilní duplexní struktury s komplementární DNA a RNA (Obrázek 1Obrázek 7). Selektivita i afinita k DNA je vyšší než u ostatních ODN. Nukleové báze jsou navázány na vnitřních pozicích PNA oligomeru. Mechanismus účinku se odvíjí od konkrétního typu použité ODN sondy. Slouží k detekci SNP.<sup>36</sup>

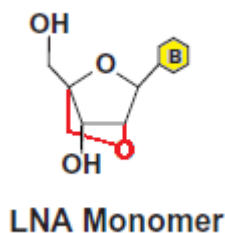


Obrázek 7. Struktura PNA v porovnání s DNA. Obrázek byl převzatý z literatury.<sup>28</sup>

### 3.2.3.1.2. LNA

LNA (z anglického Locked nucleic acid) jsou modifikované RNA nukleotidy, ve kterých jsou atomy 2'-O a 4'-C ribózy spojeny methylenovým můstkem (Obrázek 8). Vzniká tak bicyklický kruh, který uzavírá strukturu molekuly do pevné konformace. Několik studií prokázalo, že oligonukleotidy modifikované LNA vykazují při hybridizaci s cílovými molekulami RNA nebývalou tepelnou stabilitu sondy s cílem.<sup>37</sup> Bylo experimentálně zjištěno zvýšení teploty tání duplexu sondy s cílem (hodnota  $T_m$ ) o +2 - +10 °C na monomer LNA proti komplementární RNA ve srovnání s nemodifikovanými duplexy.<sup>38</sup> LNA jsou komerčně dostupné a kompatibilita se standardními ODN sondami umožňuje použití LNA v celé řadě aplikací. Mechanismus

účinku je dán konkrétním typem použité ODN sondy. Slouží k detekci SNP a detekci parazitárních onemocnění.<sup>39,40</sup>



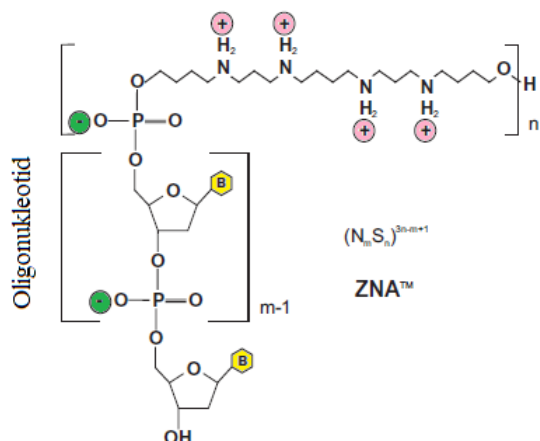
Obrázek 8. Struktura LNA monomeru. Obrázek byl převzatý z literatury.<sup>28</sup>

### 3.2.3.2. Organické polyaminy

Oligonukleotidy nacházejí mimořádně široké uplatnění v molekulární biologii a diagnostice. Chemicky se jedná o polyanionty, které vyvíjejí svou specifickou aktivitu po hybridizaci s komplementární sekvencí nesenou jinou polyaniontovou nukleovou kyselinou. Zvýšení hybridizační energie lze přidáním kationtových skupin k oligonukleotidu, které snižují odpuzivé síly aniontů vláken. Z důvodů předcházení toxického účinku syntetických polyaminů, se využívá spermin, který se přirozeně vyskytuje v eukaryotních buňkách.<sup>41</sup> Spermin se využívá k stabilizaci DNA sond. Díky tomu dochází k zvýšení termostability duplexu sondy s cílem. Spermin se také využívá ke specifikaci závažnosti rakoviny prostaty.<sup>42</sup>

ZNA (Zip nucleic acid) jsou ODN sondy konjugované s opakovanými kationicky nabitými sperminovými jednotkami (Obrázek 9). Tyto jednotky snižují elektrostatické repulzní síly mezi dvěma záporně nabitými fosfáty DNA vlákna, čímž dochází ke zvýšení termostability duplexu sondy a cílové DNA sekvence.<sup>43</sup> Počet připojených kationtových jednotek k oligonukleotidu moduluje cílový náboj molekuly, čímž se zvyšuje odpovídající duplexní  $T_m$  plynulým, lineárním a předvídatelným způsobem. Tato modifikace může zvýšit  $T_m$  8-12 meru oligonukleotidů až na 70 °C.<sup>44</sup> Kromě toho si ZNA zachovávají vysokou selektivitu. ZNA se používají jako PCR sondy i PCR primery.<sup>33</sup>

Oligonukleotidový "ocas" tvořený řetězcem sperminů



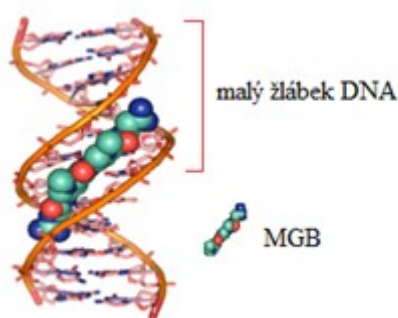
začlenění ZNA do řetězce



Obrázek 9. Struktura ZNA™ (vlevo), Začlenění sperminové jednotky mezi templátové vlákno DNA a nově vzniklé vlákno s ODN sondou po PCR cyklu. Obrázek byl převzatý z literatury.<sup>28</sup>

### 3.2.3.3. Molekuly vázající se do malého žlábků DNA

Terciární prostorové uspořádání DNA řetězce vytváří malý a velký žlábek v závislosti na uspořádání párů bází. Na molekulární úrovni je prostředí každého žlábků jiné. Velký žlábek má velikost 11,6 Å a je přístupný pro velké molekuly, kdežto malý žlábek má velikost 8,2 Å a je přístupný pouze pro malé molekuly (Obrázek 10). Malý žlábek může být potenciální místo pro selektivní cílení léčiv, např. v terapii nádorů.<sup>45</sup> Zároveň některé látky vázající se do malého žlábků (tzn. MGB minor-groove binder) jsou využívány pro stabilizaci krátkých ODN sond. K tomu se využívá například CDPI 3 trimer 1,2-dihydro-(3H)-pyrrolo[3,2-e]indol-7-karboxylátu.<sup>46</sup>

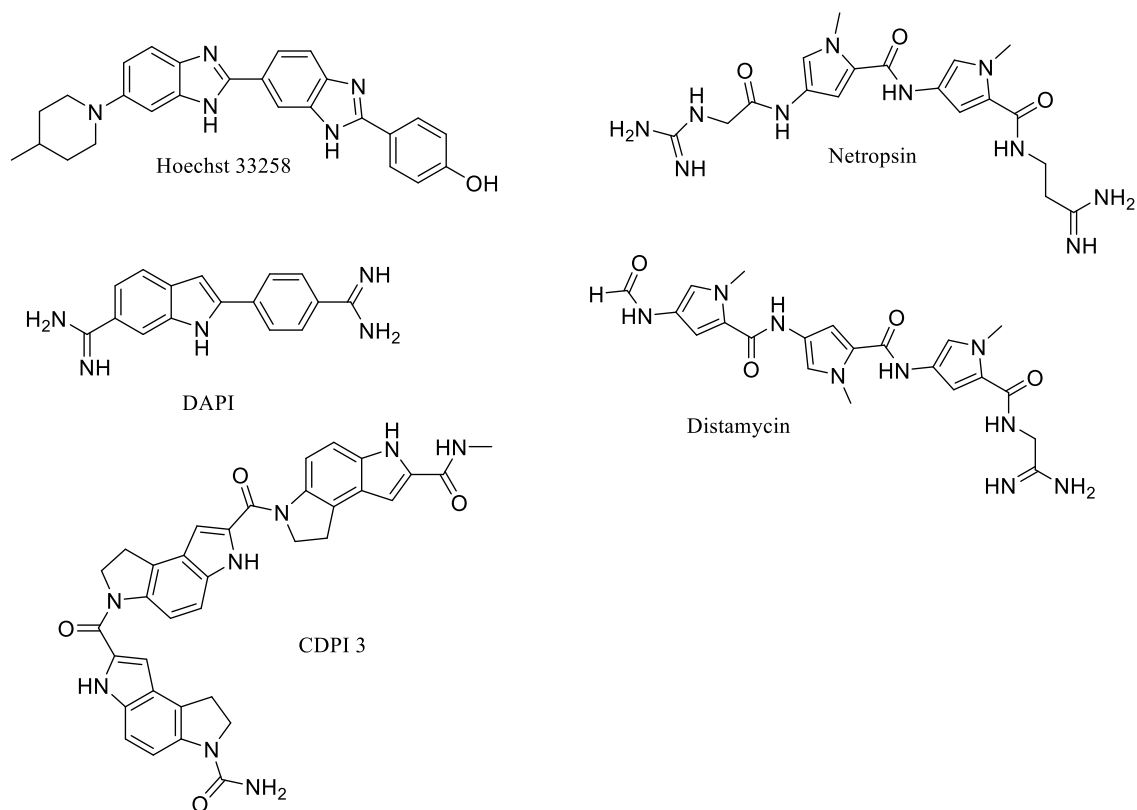


Obrázek 10. Vazba látky do malého žlábků DNA řetězce. Obrázek byl převzatý z literatury.<sup>47</sup>

Látky vázající se do malého žlábků musí splňovat několik podmínek:<sup>48</sup>

- Tvorba nekovalentní interakce s DNA.

- Prostorové uspořádání vhodné k začlenění do malého žlábků (připomínající půlměsíc).
- Schopnost vytvářet van der Waalsovy vazby a tvořit vodíkové vazby s N nebo O heterocyklických bází.
- Výhodou je i bazicita látky (pomocí elektrostatických sil mezi protonovanými skupinami molekul a záporně nabitou kostrou fosfátů se komplex stabilizuje).



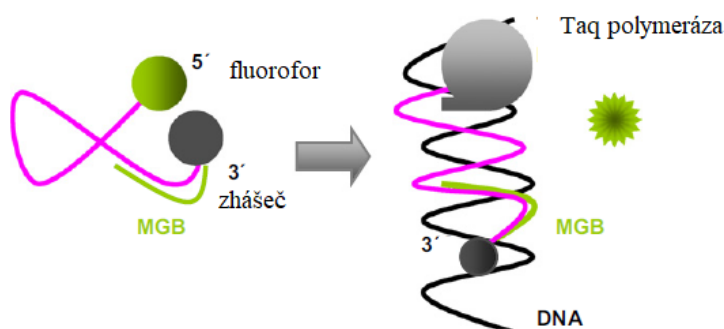
Obrázek 11. Vzorci některých MGB.

Mezi látky vážající se do malého žlábků patří celá řada látek přírodního původu i syntetických látek (Obrázek 11). Mezi přírodní látky patří polyamidy netropsin a distamycin. Syntetickým MGB jsou peptid 1,2-dihydro-(3*H*)-pyrrolo[3.2-*e*]indol-7-karboxylát (CDPI<sub>3</sub>), dihydrocyklopyrroloindol tripeptid (DPI<sub>3</sub>), sloučeniny typu Hoechst a 4',6-diamidino-2-fenylindol (DAPI).

### 3.2.3.3.1. TaqMan MGB

Tato modifikovaná sonda obsahuje kovalentně vázanou MGB molekulu na 3'-konci krátké ODN sondy, kde se nachází i zhášec. Jako MGB se používá CDPI 3. Tento oligopeptid má velmi vysokou afinitu k malému žlábkku dvouvláknové DNA na AT bohaté sekvence.<sup>46,46</sup> Fluorofor je na 5'-konci vlákna sondy. Ve fázi extenze se TaqMan MGB může vázat do malé drážky DNA. MGB pomocí nekovalentních vazeb zvyšuje termostabilitu vazby sondy s cílem. Bez zvýšení počtu bází sondy lze hodnotu  $T_m$  sondy zvýšit přibližně o 10 °C, aby se zlepšila specifita amplifikačních produktů.<sup>34</sup> Při stejné hodnotě  $T_m$  lze navrhnout kratší délku sondy TaqMan MGB než u běžné sondy TaqMan.

V nativním stavu je TaqMan MGB smotaná do náhodného klubka. Díky tomu je fluorofor i zhášec u sebe, nedochází k emisi fluorescence. Když se sonda hybridizuje na komplementární část templátu DNA, dojde k oddálení fluoroforu a zhášeče. Tím dojde k výrazné emisi fluorescence (Obrázek 12). Fluorescence se měří na konci PCR cyklu. Použití této sondy přináší vyšší selektivitu a citlivost. Používá se na detekce SNP, popřípadě se využívá k detekci virových onemocnění.<sup>49</sup>



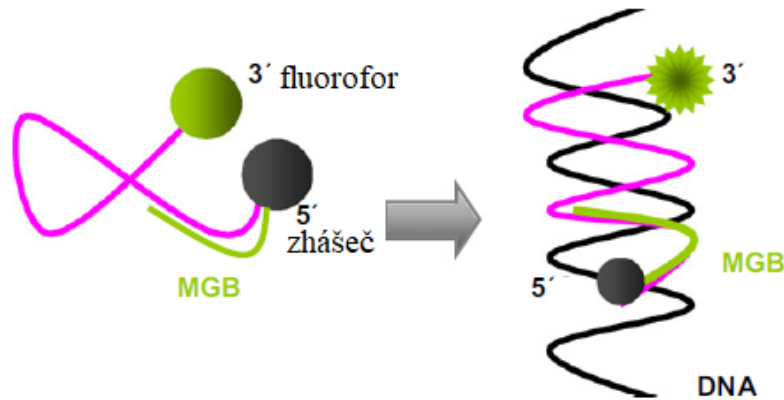
Obrázek 12. TaqMan MGB sonda. Obrázek byl převzatý z literatury.<sup>28</sup>

### 3.2.3.3.2. MGB Eclipse

Struktura MGB Eclipse sondy je velmi podobná TaqMan MGB. Rozdíl je však v orientaci fluoroforu (FAM = 6-karboxy fluorescein), který je na 5'-konci ODN (Obrázek 13). Na opačném 3'-konci se nachází zhášec (Eclipse Dark Quencher) společně s MGB (CDPI 3). Pozice MGB chrání sondu před štěpením Taq polymerázy a tím umožňuje post-PCR analýzu  $T_m$ .<sup>50</sup> Krátká délka a jedinečná struktura sond MGB



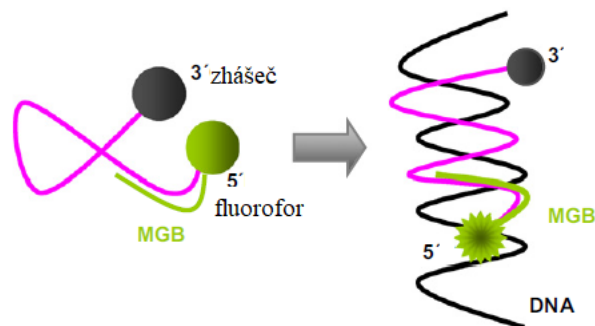
Eclipse poskytuje velmi nízký šum v pozadí měření fluorescence. Hydrofobní vazba MGB k šroubovici DNA zvyšuje  $T_m$  o 15-30 °C, což umožňuje použití kratších sond s vysokou specifikitou.<sup>51</sup> Používá se pro detekci SNP, stanovení virové zátěže a analýze genové exprese.<sup>52</sup>



Obrázek 13. Struktura MGB Eclipse. Obrázek byl převzat z literatury.<sup>28</sup>

### 3.2.3.3.3. MGB Pleiades

Jedná se o další typ fluorogenní ODN sondy s využitím MGB. V tomto případě je sonda tvořena fluoroforem (FAM) a MGB (CDPI 3) vázaným na 5'- konci krátké ODN sondy a nefluorescenčním zhášecem na 3'-konci sondy (Obrázek 14). Hydrofobní interakce mezi MGB a zhášecem vytváří konformaci, kdy je zhášec a fluorofor v blízkosti. Tím se tlumí fluorescence. Zároveň MGB v blízké vzdálenosti od fluoroforu dokáže mírně tlumit jeho fluorescenci. Společným působením tvoří jedinečný způsob zhášení s nízkou hodnotou bazální fluorescence pozadí.<sup>52</sup> Fluorescence je účinně obnovena po hybridizaci sondy k cílové sekvenci. Dojde k oddálení a tím k přerušení zhášení fluorescence zhášecem. Zároveň může dojít k začlenění MGB do malého žlábků, což opět podpoří zesílení fluorescence fluoroforu. Tato metoda je vhodná pro detekci SNP a genotypizaci.



Obrázek 14. Struktura MGB Pleiades. Obrázek byl převzat z literatury.<sup>28</sup>

#### 3.2.3.4. Interkalátory

DNA interkalátory představují důležitou třídu sloučenin s vysokým potenciálem k použití jako léky zaměřené na DNA. Mnoho protirakovinných léků v klinickém použití interaguje s DNA prostřednictvím interkalace.<sup>53</sup> Lerman poprvé postudoval a potvrdil interkalační schopnosti akridinových derivátů s komplexy nativní DNA v 60. letech 20. století.<sup>54</sup> Díky tomu došlo k obrovskému rozvoji interkalátorů. Interkalátory rozdělujeme na tzv. klasické interkalátory, mezi které patří proflavin, ethidium-bromid, aktinomycin či topotekan. Druhou skupinu tvoří tzv. neklasické interkalátory, kterými jsou např. chinakrin, imipramin, amilorid či steroidní hormony.<sup>57</sup>

Při rozvíjení terciární struktury DNA se páry bází oddělují a vytvářejí dutinu. Tvar a velikost dutiny závisí na stupni rozvinutí a sekvenci párů bází. Když dutina dosáhne šířky přibližně 4 Å, je možné mezi páry bází vložit ploché aromatické malé molekuly.<sup>55</sup> Maximálně rozvinuté interkalační místo má šířku přibližně 8 Å a délku 12-14 Å a lze do něj umístit malé molekuly s různými tvary a velikostmi molekul. Nejlépe s 3-4 kondenzovanými kruhy. Díky rozdílné vzdálenosti bází DNA jsou interkalátory méně sekvenčně selektivní než MGB. Vykazují jen malou preferenci pro oblasti GC.<sup>56</sup>

Interkalační proces začíná přenosem interkalační molekuly z vodného prostředí do hydrofobního prostoru mezi dvěma sousedními páry bází DNA. Dochází k vmezení interkalátoru mezi sousední báze DNA. Tam jsou ukotveny pomocí van der Waalovy síly,  $\pi$ - $\pi$  interakce (patrové interakce) a elektrostatické síly.<sup>57</sup> Díky těmto silám leží interkalátor rovnoměrně s páry bází, kolmo ke kostře DNA. Tímto se odlišuje např. od MGB. Substituenty interkalátorů mohou stabilizovat páry bází DNA pomocí hydrofobních a iontových sil. Ty zajišťují tvorbu vodíkových můstků mezi O a N bází.

Zároveň se vyplatí mít v molekule iont s kladným nábojem, který vytváří iontové vazby s negativně nabitými fosfáty, které neutralizuje.

Obecné požadavky na strukturu interkalátorů:

- Planární molekula.
- 3-4 aromatické kondenzované kruhy.
- Malá velikost molekuly.
- Bazická kationtová nebo elektrofilní funkční skupiny či substituenty (např. kvartérní dusík, amino skupiny)

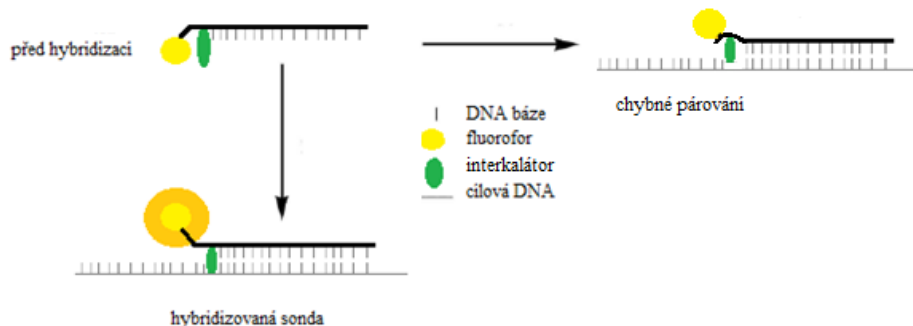
Sondy spojené s interkalátorem mohou dosáhnout specifitějších a přesnějších výsledků.<sup>58</sup> Interkalátory jsou látky, které při hybridizaci nemění svou sekundární strukturu a často způsobují zesílení fluorescence fluoroforů. Tyto vlastnosti jsou využívány například u světelně značených sond, jako jsou PNA značené sondy s asymetrickými cyaninovými barvivy – thiazolovou oranží, nebo anthracenem značené ODN sondy.<sup>59</sup>

#### 3.2.3.4.1. MagiProbes

MagiProbe je jeden typ fluorescenčních ODN sond. Je tvořený fluoroforem (donor) a interkalátorem (akceptor), které jsou v těsné blízkosti, a to z důvodu přímého přenosu energie fluorescence (FRET).<sup>60</sup> Při hybridizaci dochází navázání ODN sondy. Pokud dojde k dokonalé shodě sondy s cílovou sekvencí, interkalátor se vmezeří mezi báze DNA. Tím dojde k zastavení zhášení emise fluorescence fluoroforu (Obrázek 15). V nepřítomnosti cíle zůstane fluorescence fluoroforu zhášena, protože interkalátor není interkalován a nedochází k narušení FRET. Jako fluorofor se používá fluorescein. Jako interkalátor byl vybrán pyren. Pro správný účinek MagiProbe je interkalátor a jeho blízká vzdálenost od fluoroforu esenciální.<sup>60</sup>

MagiProbe funguje jako molekulární senzor, který rozlišuje duplex s dokonalou strukturou od duplexu s neshodným cílem o jedné bázi. Tato sonda může být využívána ke genotypizaci a detekci SNP.<sup>61</sup>

Pyren je polycyklický aromatický uhlovodík, který se skládá ze čtyř benzenových kruhů, čímž vzniká plochý aromatický systém. Díky schopnosti interkalace budí zájem ve využití ODN sond sloužící k detekci mismatch v DNA.<sup>62</sup>



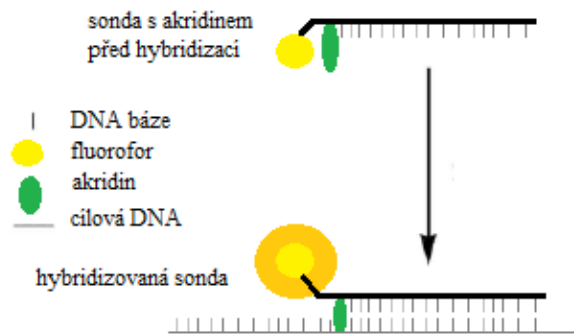
Obrázek 15. MagiProbes struktura.

### 3.2.4. Akridinem značené sondy

Akridin je známý tím, že stabilizuje duplexy pomocí patrových interakcí a elektrostatických sil s bázemi DNA.<sup>63</sup> Z tohoto důvodu byly připraveny tyto dva typy sond, které využívají interkalační schopnosti akridinu za účelem stabilizace sondy s cílovou sekvencí.

#### 3.2.4.1. Lineární sonda s akridinem s funkcí zhášedce

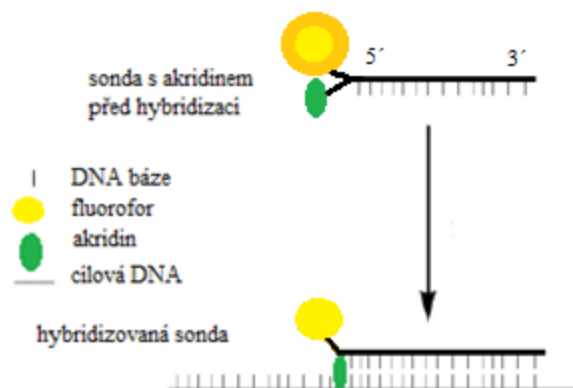
Tato sonda je tvořena 14-merovou ODN sondou s fluoroforem (FAM, donor) na 5'- konci spojeného s interkalátorem (9-amino-6-chlor-2-methoxyakridin, akceptor). Optimální pozice interkalátoru a fluoroforu je v těsné blízkosti. Nehybridizovaná lineární sonda je v podstatě nefluorescenční sonda. Díky přenosu energie mezi fluoroforem a zhášedcem, v tomto případě akridinem, dochází k tlumení fluorescence. Při interkalaci akridinu mezi báze DNA již nemůže fungovat jako dokonalý zhášedec, a tím dojde k zesílení fluorescence (Obrázek 16).<sup>64</sup> Výhody této metody spočívají v její jednoduchosti, sondy jsou bez sekundární struktury, dají se použít komerčně vyráběné ODN sondy. Další značná výhoda je, že akridin jakožto interkalátor zvyšuje pevnost vazby sondy a cílové komplementární sekvence při hybridizaci a zároveň zvyšuje její  $T_m$ . Díky tomu je tento způsob vhodný i pro krátké ODN sondy.



Obrázek 16. Mechanismus účinku dvojitě značené sondy. Při hybridizaci dochází k interkalaci akridinu, tím dochází k zastavení zářeni fluoroforu.

### 3.2.4.2. Lineární sonda s akridinem s funkcí donoru

Jedná se 15-merovou lineární sondu, která má na svém 5'- konci fluorofor (fluorescein, akceptor) a interkalátor (akridin-9-karboxylová kyselina, donor). Fluorescence fluoroforu je vyvolaná excitací interkalátoru pomocí FRET. Při hybridizaci sondy s jejím komplementárním vláknem dochází k zrušení přenosu fluorescenční energie z interkalátoru na fluorofor (Obrázek 16, Obrázek 17). Proto dojde k výraznému poklesu fluorescence. V případě nepřítomnosti cílové sekvence nedochází k snížení fluorescence. Změna intenzity fluorescence odráží tepelný přechod komplexu sondy s cílem. Zvýšení  $T_m$  je výhodné pro krátké sondy a vychází z interkalační schopnosti akridinu.<sup>65</sup> Tento typ sondy může být potenciálně využitý k detekci komplementárních ODN v roztoku a k analýze struktury ODN.<sup>58</sup>



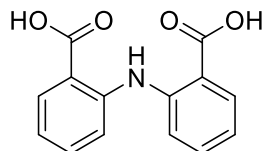
Obrázek 17. Schéma účinku lineární sondy s akridinem.

## 4. Experimentální část

Rozpouštědla a výchozí látky využívané v syntézách byly zakoupeny od firem Merck a Fluorochem, Sigma-Aldrich, Lach-Ner, Penta. Používané ODN sondy byly zakoupeny od firmy Generi Biotech. Pomocí tenkovrstvé chromatografie (thin layer chromatography, TLC) byly monitorovány reakce a čistota výsledných látek. Konkrétně se používaly desky Merck Kieselgel 60 F254 nebo Merck Aluminiumoxid 60 F254 u nichž detekce probíhala při vlnové délce 254 nm nebo 366 nm. K čištění produktů sloupcovou chromatografií byl využíván jako stacionární fáze silica gel Merck Kieselgel 60 (0,040 – 0,063 mm) a Merck aluminium oxid 90 (0,063-0,200 mm). Mobilní fáze se lišily proto jsou uvedeny dál v textu u jednotlivých reakcí.  $^1\text{H}$  NMR a  $^{13}\text{C}$  NMR spektra byla měřena na Katedře organické a bioorganické chemie na přístrojích Varian VNMR S500 (Varian, USA) nebo Jeol JNM-ECZ600R (Jeol, USA), ( $^1\text{H}$ : 500 MHz a 600 MHz;  $^{13}\text{C}$ : 126 MHz a 151 MHz) spektrometrech. Na stejné katedře byla změřena i IČ spektra. K tomu byl využit IČ spektrofotometr Nicolet 6700 v ATR módu. Hmotnostní spektra byla měřena na přístroji ExpressionL CMS v propojení s ASAP® (Advion, Inc., USA). Čištění HPLC (High-performance liquid chromatography) byl použit přístroj LC 20 A Prominence (Shimadzu, Japonsko) s DAD detektorem. UV/Vis spektra byla změřena přístrojem Shimadzu UV2600 spektrofotometr na Katedře farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy. Hmotnostní spektra sond s látkou byla změřena pomocí MALDI Autoflex II (Bruker DALTONICS). Fluorecence a  $T_m$  byly změřeny Thermo Cycler - meltingy - CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System Bio-Rad.

## 4.1. Série A

### 4.1.1. Příprava 2,2'-iminodibenzoové kyseliny (1)

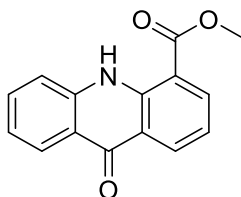


Směs 2-chlorbenzoové kyseliny (7,825 g, 0,05 mol), anthranilové kyseliny (6,95 g, 0,05 mol) a  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (5 g, 0,036 mol) byla rozpuštěna v isoamylalkoholu (70 ml). Do směsi byl přidán katalyzátor  $\text{Cu}^0$ . Směs byla zahřívána pod zpětným chladičem na teplotu  $140\text{ }^\circ\text{C}$  po dobu 8 h. Přebytečný isoamylalkohol byl oddestilován na rotační vakuové odparce. Vzniklý produkt byl rozpuštěn v horké destilované vodě (1 l). Do směsi byla přidávána koncentrovaná  $\text{HCl}$  do kyselé reakce. Vzniklá sraženina byla za horka odsáta za sníženého tlaku. Získaná sraženina byla rozpuštěna v 1M  $\text{NaOH}$  (100 ml) a bylo přidáno aktivní uhlí (3 g). Aktivní uhlí s adsorbovanými rezidui bylo odstraněno pomocí filtrace. Vzniklý filtrát byl okyselen koncentrovanou  $\text{HCl}$  do kyselé reakce. Vznikla žlutá sraženina, která byla odsáta za sníženého tlaku a promyta horkou destilovanou vodou ( $5 \times 20$  ml). Získaný produkt byl rozpuštěn v horkém  $\text{EtOH}$  (500 ml) a rekrystalizován doplněním destilované vody. Byl nechán krystalizovat 10 h. Vzniklé krystaly byly odsáty za sníženého tlaku a vysušeny v exikátoru. Byly získány světle žluté krystaly (6,68 g). Výtěžek 52 %.<sup>66</sup>

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  13,01 (s, 2H); 10,82 (s, 1H); 7,90 (dd,  $J = 7,9, 1,6$  Hz, 2H); 7,49 – 7,40 (m, 4H); 6,94 (ddd,  $J = 8,1, 6,6, 1,6$  Hz, 2H).  $^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  168,56; 143,76; 133,52; 131,97; 120,15; 117,77; 117,74.

## 4.1.2. Příprava methylesteru kyseliny

## 9-oxo-9,10-dihydroakridin-4-karboxylové (2)



Látka **1** (10 g, 0,03887 mol) byla rozpuštěna v  $\text{POCl}_3$  (100 ml, 0,3887 mol) a zahřívána pod zpětným chladičem na teplotu  $140\text{ }^\circ\text{C}$  po dobu 1 h za vzniku hnědočervené směsi. Po ochlazení směsi v ledové lázni byl po kapkách přidáván ledový MeOH (90 ml) po dobu 1-2 h. Přebytný MeOH byl následně ze směsi oddestilován na rotační vakuové odparce. Následně byl do směsi přidán  $\text{POCl}_3$  (2 ml) do rozpuštění krystalů a směs byla míchána 2 h při laboratorní teplotě. Nezareagovaný  $\text{POCl}_3$  byl posléze oddestilován za sníženého tlaku. Reziduum bylo rozpuštěno v destilované vodě (20 ml) a vytřepáno do  $\text{CHCl}_3$  ( $3 \times 20$  ml). Organická vrstva byla spojena a vysušena bezvodým  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Následně byla přefiltrována a oddestilována na rotační vakuové odparce. Reziduum bylo za horka rozpuštěno v MeOH (100 ml) a následně ponecháno ke krystalizaci při  $-18\text{ }^\circ\text{C}$  po dobu 14 h. Vzniklé krystaly byly odsáty za sníženého tlaku a vysušeny v exikátoru. Byly získány žlutohnědé krystaly (8,1 g). Výtěžek 82 %. Tato reakce byla provedena dvakrát, druhý výtěžek byl 60 %.

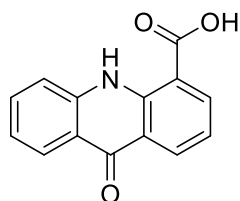
$^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  11,70 (s, 1H); 8,70 (ddt,  $J = 7,9; 1,4; 0,6$  Hz, 1H); 8,43 (ddq,  $J = 8,1; 1,4; 0,6$  Hz, 1H); 8,39 (ddd,  $J = 7,6; 1,7; 0,6$  Hz, 1H); 7,71 – 7,64 (m, 1H); 7,37 (dq,  $J = 8,3; 0,7$  Hz, 1H); 7,29 (ddt,  $J = 8,0; 7,0; 0,8$  Hz, 1H); 7,23 (td,  $J = 7,8; 0,6$  Hz, 1H); 4,00 (d,  $J = 0,7$  Hz, 3H).  $^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  177,74; 168,34; 141,66; 139,98; 136,43; 133,88; 133,87; 127,00; 122,34; 122,29; 121,47; 119,78; 117,48; 113,46; 52,43.

HRMS (m/z):  $[\text{M}+\text{H}]^+$  vypočteno pro  $\text{C}_{15}\text{H}_{11}\text{NO}_3$ , 254,0812; změřeno: 254,0818.

IČ (ATR)  $\nu_{\text{max}}$  = 3267, 3068, 2947, 1687, 1633, 1615, 1596, 1523, 1483, 1464, 1441, 1418, 1356, 1322, 1281, 1202, 1170, 1139, 1113, 1085, 1072, 1027, 1008, 992, 963, 940, 896, 873, 827, 802, 754, 739, 711, 677  $\text{cm}^{-1}$ .



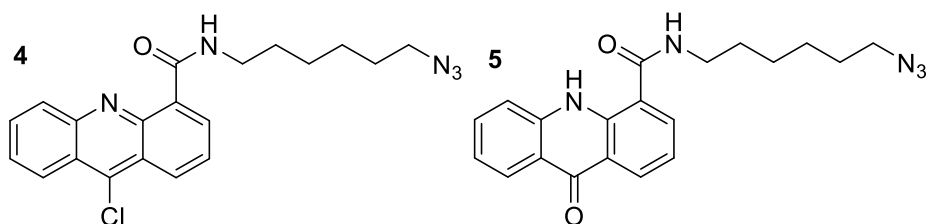
### 4.1.3. Příprava 9-oxo-9,10-dihydroakridin-4-karboxylové kyseliny (**3**)



Látka **2** (4,05 g, 0,016 mol) byla rozpuštěna v THF (4 ml). Ke směsi byl přidán nasycený roztok NaOH (20 ml) ve směsi MeOH/H<sub>2</sub>O 5:1. Směs byla míchána 1 h při laboratorní teplotě. Došlo k změně barvy za vzniku sytě oranžové sraženiny. Přebytké rozpouštědlo bylo oddestilováno na rotační vakuové odparce při teplotě 40 °C. Reziduum bylo rozpuštěno v destilované vodě a okyseleno koncentrovanou HCl do kyselé reakce. Vznikla hustá žlutá sraženina, která byla odsáta za sníženého tlaku a vysušena. Byla získána žlutá pevná látka (2,6 g). Výtěžek 68 %.<sup>67</sup>

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO d<sub>6</sub>) δ 11,92 (s, 1H); 8,50 (dd, J = 7,9; 1,7 Hz, 1H); 8,41 (dd, J = 7,5; 1,7 Hz, 1H); 8,21 (dd, J = 8,1; 1,1 Hz, 1H); 7,78 – 7,71 (m, 2H); 7,37 – 7,26 (m, 2H). <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, DMSO d<sub>6</sub>) δ 176,65; 169,29; 141,35; 140,05; 137,01; 134,21; 132,55; 126,04; 122,43; 121,78; 120,76; 120,33; 118,73; 115,10.

#### 4.1.4. Příprava *N*-(6-azidohexyl)-9-oxo-9,10-dihydroakridin-4-karboxamidu (**5**)



Látka **3** (103,1 mg, 0,43 mmol) byla rozpuštěna v  $\text{POCl}_3$  (1 ml). Směs byla zahřívána pod zpětným chladičem na teplotu  $140\text{ }^\circ\text{C}$  po dobu 1 h. Došlo ke změně barvy směsi na hnědou. Po zreagování byl nezreagovaný  $\text{POCl}_3$  oddestilován za sníženého tlaku. Posléze byl produkt rozpuštěn v ledově chlazeném bezvodém DCM (2 ml). Do vychlazeného roztoku byl po kapkách přidáván vychlazený 6-azidohexan-1-amin (92 mg, 0,64 mmol). Směs byla míchána po dobu 2 h při laboratorní teplotě. Poté byla vytřepána 10%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$   $3 \times 15$  ml. Organická vrstva byla vysušena  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  a přefiltrována. Následně byla odpařena. Produkt byl přečištěn sloupcovou chromatografií na silikagelu (HEX:EAC:MeOH, 7:3:1)  $R_f = 0,44$ . Vznikla tmavě žlutá olejovitá látka (116 mg). Výtěžek látky **5** byl 73 %.

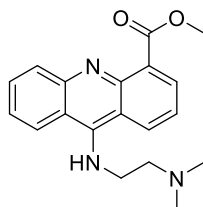
Následné NMR nepotvrdilo totožnost původně zamýšleného *N*-(6-azidohexyl)-9-chlorakridin 4 karboxamidu (**4**), v pozici 9 se nenacházel chlór, ale keton.

Analýzy potvrdily přítomnost *N*-(6-azidohexyl)-9-oxo-9,10-dihydroakridin-4-karboxamid **5**.

TLC (HEX:EAC:MeOH, 7:3:1).  $R_f = 0,44$ .

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  12,38 (s, 1H); 8,45 (dd;  $J = 8,0$ ; 1,4 Hz, 1H); 8,36 (dd,  $J = 8,2$ ; 1,5 Hz, 1H); 8,03 (dd,  $J = 7,5$ ; 1,5 Hz, 1H); 7,64 (ddd,  $J = 8,4$ ; 6,9; 1,6 Hz, 1H); 7,57 (t,  $J = 5,7$  Hz, 1H); 7,38 (d,  $J = 8,3$  Hz, 1H); 7,24 (ddd,  $J = 8,0$ ; 6,9; 1,1 Hz, 1H); 7,01 (t,  $J = 7,8$  Hz, 1H); 3,50 (td,  $J = 7,4$ ; 5,8 Hz, 2H); 3,21 (t,  $J = 6,9$  Hz, 2H); 1,70 (q,  $J = 7,2$  Hz, 2H); 1,56 (p,  $J = 6,9$  Hz; 2H); 1,40 (tt,  $J = 9,6$ ; 6,4; 5,4; 3,4 Hz; 4H).  $^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  178,02; 168,42; 140,85; 140,10; 133,81; 131,78; 131,06; 126,49; 122,17; 121,88; 120,98; 119,49; 117,85; 117,72; 51,16; 39,94; 29,24; 28,58; 26,49; 26,29.

## 4.1.5. Příprava methylesteru kyseliny

9- {[2-(dimethylamino)ethyl]amino} akridin-4-karboxylové  
(6)

Látka **2** (507,8 mg, 2,01 mmol) byla rozpuštěna v  $\text{SOCl}_2$  (4 ml). Směs byla zahřívána pod zpětným chladičem na teplotu  $85\text{ }^\circ\text{C}$  po dobu 1 h. Přebytečný  $\text{SOCl}_2$  byl ze směsi oddestilován za sníženého tlaku. Do reakční směsi byl přidán fenol (1,89 g, 0,02 mol). Směs byla míchána a zahřívána pod zpětným chladičem na teplotu  $110\text{ }^\circ\text{C}$  po dobu 15 min. Následně byla směs ochlazena na teplotu  $55\text{ }^\circ\text{C}$  a do směsi byl přidán *N,N*-dimethylaminoethylamin (0,263 ml, 2,41 mmol). Směs byla míchána při teplotě  $55\text{ }^\circ\text{C}$  po dobu 24 h. Následně byla směs rozpuštěna v  $\text{CHCl}_3$  (20 ml) a vytřepána 2M NaOH (3×20 ml). Organická vrstva byla sesbírána a vysušena bezvodým  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Směs byla přefiltrována a organická rozpouštědla byla oddestilována za sníženého tlaku. Výsledný produkt byl přečištěn sloupcovou chromatografií na silikagelu (EAC:MeOH:TEA, 9:0,5:0,5)  $R_f = 0,36$ . Byla získána žlutooranžová olejovitá látka (279,5 mg). Výtěžek 43 %. Reakce byla průběžně optimalizována – přehled změn v reakčních podmínkách viz Tabulka 1.

Tabulka 1. Vyzkoušené reakční podmínky přípravy látky 6.

Reakční podmínky	Rozpouštědlo	Teplota ( $^\circ\text{C}$ )	Čas (min)	Výtěžek (%)
1.	$\text{POCl}_3$	110	60	21
2.	$\text{SOCl}_2$	100	30	37
3.	$\text{SOCl}_2$	85	60	43

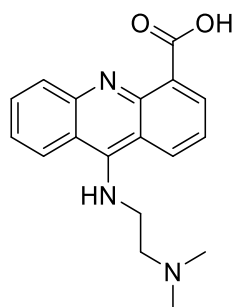
$^1\text{H NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  10,82 (s, 1H); 8,45 (m, 1H); 8,11 (m, 1H); 7,96 (m, 1H); 7,44 – 7,39 (m, 1H); 7,17 (m, 1H); 7,07 – 7,03 (m, 2H); 4,11 – 4,05 (m, 2H); 3,96 (s, 3H); 2,81 (m, 3H); 2,39 – 2,36 (s, 6H).

MS (ESI)  $m/z$ : 324,20  $[\text{M}+\text{H}]^+$

ÍČ: 3316, 2948, 2813, 2762, 1743, 1702, 1689, 1611, 1604, 1579, 1559, 1489, 1451, 1435, 1340, 1277, 1267, 1198, 1167, 1143, 1123, 1098, 1043, 1027, 893, 870, 845, 828, 758, 746, 740, 722, 686, 664, 644, 612  $\text{cm}^{-1}$ .

#### 4.1.6. Příprava

##### 9- {[2-(dimethylamino)ethyl]amino} akridin-4-karboxylové kyseliny (7)



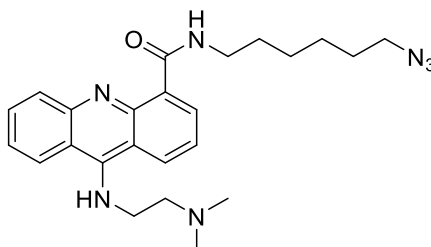
Látka **6** (214 mg, 0,66 mmol) byla rozpuštěna v THF (4 ml). Ke směsi byl přidán nasycený roztok NaOH ve směsi MeOH/H<sub>2</sub>O 5:1 (0,4 ml) do vzniku sytě oranžovo-červeného roztoku. Směs byla míchána 5 min při laboratorní teplotě. Přebytečné THF bylo oddestilováno na rotační vakuové odparce. Vzniklá směs byla přečištěna sloupcovou chromatografií na silikagelu (CHCl<sub>3</sub>:MeOH, 4:1)  $R_f = 0,18$ . Byla získána oranžová olejovitá látka (181,7 mg). Výtěžek 89 %.

<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  8.33 (dd,  $J = 7.2, 1.2$  Hz, 1H), 8.21 (t,  $J = 8.8$  Hz, 2H), 7.73 (ddd,  $J = 8.2, 6.9, 1.2$  Hz, 1H), 7.40 (ddd,  $J = 8.3, 6.9, 1.2$  Hz, 1H), 7.35 (dd,  $J = 8.5, 1.1$  Hz, 1H), 7.26 (dd,  $J = 8.5, 7.1$  Hz, 1H), 4.17 (t,  $J = 6.1$  Hz, 2H), 2.94 (t,  $J = 6.1$  Hz, 2H), 2.47 (s, 6H). <sup>13</sup>C NMR (151 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  171.84, 158.17, 141.29, 139.84, 138.60, 136.14, 128.84, 126.32, 125.04, 124.04, 123.63, 120.28, 114.29, 113.63, 58.30, 47.03, 45.21.

MS (ESI)  $m/z$ : 310,10 [M+H]<sup>+</sup>, 332,06 [M+Na]<sup>+</sup>

ÍČ: 2990, 2831, 2781, 1622, 1585, 1552, 1533, 1479, 1466, 1439, 1383, 1357, 1327, 1279, 1265, 1230, 1166, 1096, 1085, 1056, 1037, 1013, 959, 939, 893, 780, 750, 742, 651, 648, 643, 634, 617  $\text{cm}^{-1}$ .

## 4.1.7. Příprava

*N*-(6-azidohexyl)-9- {[2-(dimethylamino)ethyl]amino}akridin-4-karboxamidu (**8**)

Látka **7** (147 mg, 0,48 mmol) byla rozpuštěna v bezvodém THF, byl přidán HBTU (N,N,N',N'-Tetramethyl-O-(1H-benzotriazol-1-yl)uroniumhexafluorophosphate) (90,1 mg, 0,24 mmol) a TEA (trimethylamin) (70  $\mu$ l). Směs byla ponechána 15 minut v ultrazvukové lázni. Následně byl do reakční směsi přidán 6-azidohexan-1-amin (68 mg, 0,48 mmol) a směs byla míchána při laboratorní teplotě pomocí magnetické míchačky. Směs byla míchána po dobu 24 h. Přebytečná rozpouštědla ve směsi byla oddestilována na rotační vakuové odparce. Reziduum bylo rozpuštěno v diethyletheru (20 ml) a následně vytřepáno destilovanou vodou (3 $\times$ 20 ml). Organická vrstva byla vysušena bezvodým Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a přefiltrována. Následně byla rozpouštědla oddestilována na rotační vakuové odparce. Produkt byl přečištěn sloupcovou chromatografií na silikagelu (EAC:MeOH:TEA, 9:0,5:0,5) R<sub>f</sub> = 0,28. Byla získána žlutá olejovitá látka (67 mg). Výtěžek 32 %.

K čištění látky bylo potřeba najít optimální soustavu, vyzkoušeny byly tyto možnosti (Tabulka 2).

Tabulka 2. vyzkoušené soustavy k čištění látky **8**.

Soustava	Poměr	Specifikace
HEX:THF:TEA	7:3:0,5	Moc rychlá soustava, skvrny se neoddělily.
HEX:THF:TEA:MeOH	7:3:0,5:0,25	Skvrny se neoddělily, ležely na startu.
CHCl <sub>3</sub> :MeOH	8:2	Skvrny se neoddělily, táhly se na TLC.
EAC:MeOH:TEA	9:0,5:0,5	Látky se oddělily, TEA mírně rozkládal látku.

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  12,47 (s, 1H); 8,89 (d, J = 7.4 Hz, 1H); 8,30 (dd, J = 8,7; 1,5 Hz, 1H); 8,19 (dt, J = 8,8; 0,8 Hz, 1H); 7,96 (d, J = 8,6 Hz, 1H); 7,76 – 7,69

## Experimentální část

(m, 1H); 7,48 – 7,37 (m, 2H); 6,88 (s, 1H); 3,95 – 3,89 (m, 2H); 3,68 (q, J = 5,3 Hz, 2H); 3,29 (t, J = 7,0 Hz, 2H); 2,64 (t, J = 5,7 Hz, 2H); 2,41 (s, 6H); 1,84 (p, J = 7,0 Hz, 2H); 1,72 – 1,58 (m, 4H); 1,57 – 1,47 (m, 2H).  $^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  166,50; 153,04; 147,90; 147,44; 134,68; 130,63; 129,09; 128,06; 126,79; 123,12; 123,00; 121,87; 116,57; 115,70; 58,55; 51,42; 46,92; 44,89; 39,58; 29,52; 28,84; 27,03; 26,56.

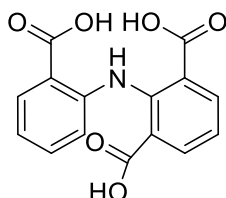
MS (ESI) m/z: 434,14  $[\text{M}+\text{H}]^+$

IČ: 3331, 2929, 2868, 2097, 1652, 1620, 1549, 1516, 1471, 1433, 1377, 1361, 1324, 1285, 1271, 1148, 1044, 965, 919, 857, 792, 762, 731, 677, 655, 632, 626, 613  $\text{cm}^{-1}$ .

## 4.2. Série B

### 4.2.1. Příprava kyseliny 2-[(2-karboxyfenyl)amino]isofthalové

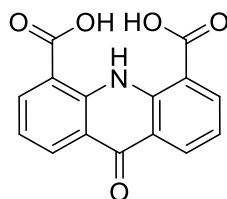
(10)



Směs 2-bromisofthalové kyseliny (512,2 mg, 2,09 mmol), 2-aminobenzoové kyseliny (286,8 mg, 2,09 mmol) a  $K_2CO_3$  (866,7 mg, 6,27 mmol) byla rozpuštěna v isoamylalkoholu (5 ml). Do směsi byl přidán katalyzátor  $Cu^0$  a  $Cu_2O$ . Směs byla zahřívána pod zpětným chladičem na teplotu 140 °C po dobu 1 h. Následně byl z reakce oddestilován isoamylalkohol na rotační vakuové odparce. Reziduum bylo rozpuštěno v 1M NaOH a přefiltrováno. K filtrátu byla přidána HCl. Produkt postupně vykrytalizoval v podobě malých žlutých krystalů. Krystaly byly odsáty za sníženého tlaku. Byly vysušeny a následně přečištěny sloupcovou chromatografií na silikagelu (EAC:HEX:AA 6:3:1)  $R_f = 0,67$ . Byly získány žluté krystaly (412,1 mg). Výtěžek 66 %, tato látka byla připravena opakovaně ve velkém množství s výtěžky 68 % a 65 %.<sup>68</sup>

$^1H$  NMR (500 MHz, DMSO  $d_6$ )  $\delta$  7,92 (dd,  $J = 7,7, 0,6$  Hz, 2H); 7,83 (ddd,  $J = 8,4; 1,6; 0,7$  Hz, 1H); 7,29 – 7,22 (m, 1H); 7,16 (td,  $J = 7,7; 0,6$  Hz, 1H); 6,82 – 6,75 (m, 2H).  $^{13}C$  NMR (126 MHz, DMSO  $d_6$ )  $\delta$  168,98; 168,10; 146,96; 140,75; 134,45; 133,53; 131,70; 125,70; 121,90; 118,79; 115,70; 113,83.

#### 4.2.2. Příprava 9-oxo-9,10-dihydroakridin-4,5-dikarboxylové kyseliny (**11**)



Látka **10** (1,0115 g, 3,358 mmol) byla rozpuštěna v koncentrované kyselině sírové (6 ml). Směs byla zahřívána pod zpětným chladičem na teplotu 105 °C po dobu 1 h. Vychladlá směs byla po kapkách přidávána do vychlazené destilované vody (150 ml) za stálého míchání. Vzniklá sraženina byla odsáta za sníženého tlaku a promyta 5×50 ml destilované H<sub>2</sub>O. Sraženina byla vysušena v exsikátoru. Byla získána světle žlutá prášková látka (0,9001 g). Výtěžek 95 %.

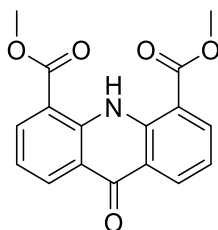
<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO d<sub>6</sub>) δ 13,89 (s, 1H); 8,46 (ddd, J = 21,2; 7,7; 1,8 Hz, 4H); 7,37 (t, J = 7,7 Hz, 2H). <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, DMSO d<sub>6</sub>) δ 176,42; 168,12; 140,75; 137,50; 132,22; 121,85, 121,18; 116,50.

MS (ESI) m/z: 284,07 [M+H]<sup>+</sup>

IČ: 2987, 1709, 1683, 1612, 1580, 1521, 1469, 1421, 1326, 1284, 1218, 1177, 1147, 1102, 1087, 991, 944, 833, 796, 755, 718, 681, 670, 648, 633, 623 cm<sup>-1</sup>



## 4.2.3. Příprava dimethylesteru kyseliny

9-oxo-9,10-dihydroakridin-4,5-dikarboxylové (**12**)

Látka **11** (1,69 g, 5,97 mmol) byla rozpuštěna v  $\text{POCl}_3$  (15 ml). Směs byla zahřívána pod zpětným chladičem na teplotu  $125\text{ }^\circ\text{C}$  po dobu 1 h. Po ochlazení se po kapkách přidal bezvodý MeOH (15 ml) ve stejném množství jako  $\text{POCl}_3$ . Postupně se vysrážely malé žluté krystaly. Následně byl do směsi přidán nadbytek MeOH (20 ml) a směs byla zahřívána na teplotu  $55\text{ }^\circ\text{C}$  po dobu 1 h. Do směsi byl postupně přidáván  $\text{POCl}_3$  (3 ml) do rozpuštění krystalů. Roztok byl míchán při teplotě  $50\text{ }^\circ\text{C}$  dalších 24 h. Vzniklá suspenze byla odsáta za sníženého tlaku. Následně byla rozpuštěna v  $\text{CHCl}_3$  (20 ml) a vytřepána 5%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  ( $5 \times 20$  ml). Organická vrstva byla vysušena bezvodým  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Směs byla přefiltrována a oddestilována na rotační vakuové odparce. Produkt byl přečištěn sloupcovou chromatografií na silikagelu ( $\text{CHCl}_3$ )  $R_f = 0,31$ . Byla získána žlutá pevná látka (1,857 g). Výtěžek 80 %

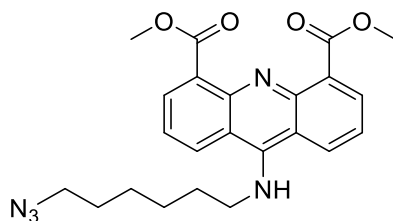
Reakce byla opakována s výtěžky 79,3 %, 75,2 % a 79,9 %.

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  13,65 (s, 1H); 8,62 (ddd,  $J = 7,9; 1,8; 0,7$  Hz, 2H); 8,41 (dd,  $J = 7,6; 1,7$  Hz, 2H); 7,24 (t,  $J = 7,7$  Hz, 2H); 4,03 (s, 6H).  $^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  177,10; 166,96; 140,80; 137,09; 133,19; 122,22; 120,61; 115,10; 52,55.

MS (ESI)  $m/z$ : 312,20  $[\text{M}+\text{H}]^+$

IČ: 3162, 1717, 1707, 1647, 1610, 1592, 1519, 1465, 1451, 1433, 1398, 1344, 1315, 1292, 1275, 1266, 1189, 1170, 1142, 1134, 1095, 1076, 998, 950, 907, 886, 842, 828, 807, 759, 753, 697, 683, 669, 662, 654, 649, 640, 633, 629, 625, 616, 612, 604  $\text{cm}^{-1}$ .

## 4.2.4. Příprava dimethylesteru kyseliny

9-[(6-azidohexyl)amino]akridin-4,5-dikarboxylové (**13**)

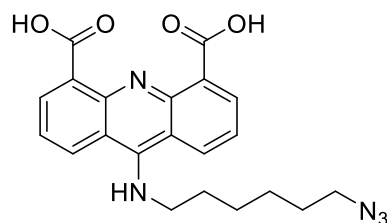
Látka **12** (220,5 mg, 0,708 mmol) byla rozpuštěna v  $\text{POCl}_3$  (2 ml). Směs byla zahřívána pod zpětným chladičem na teplotu  $140\text{ }^\circ\text{C}$  po dobu 1,5 h. Přebytečný  $\text{POCl}_3$  byl oddestilován za sníženého tlaku. Do baňky byl přidán fenol (708 mg, 7,52 mmol). Směs byla zahřívána pod zpětným chladičem na teplotu  $110\text{ }^\circ\text{C}$  po dobu 15 minut. Směs byla ochlazena na teplotu  $55\text{ }^\circ\text{C}$ . Následně k ní byl přidán 6-azidohexan-1-amin (302 mg, 2,214 mmol). Směs byla míchána při teplotě  $55\text{ }^\circ\text{C}$  po dobu 16 h. Poté byla směs rozpuštěna v EAC (30 ml) a vytřepána 1M NaOH ( $4 \times 25$  ml). Organická vrstva byla vysušena bezvodým  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Směs byla přefiltrována a rozpouštědla byla oddestilována na rotační vakuové odparce. Produkt byl přečištěn sloupcovou chromatografií na silikagelu (1. EAC:AA, 9:1)  $R_f = 0,06$ . (2. EAC:MeOH, 4:1). Byla získána žlutá olejovitá látka (154 mg). Výtěžek 50 %.

$^1\text{H}$  NMR (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  13,11 (s, 1H); 8,45 (s, 1H); 8,24 – 8,17 (m, 2H), 7,99 (d,  $J = 7,9$  Hz, 1H); 7,14 (t,  $J = 7,8$  Hz, 1H); 7,06 (t,  $J = 7,8$  Hz, 1H); 4,02 (d,  $J = 8,3$  Hz, 6H); 3,82 (t,  $J = 6,9$  Hz, 2H); 3,24 (t,  $J = 7,0$  Hz, 2H); 1,82 (p,  $J = 7,0$  Hz, 2H); 1,62 (p,  $J = 7,1$  Hz, 2H); 1,54 – 1,39 (m, 4H).  $^{13}\text{C}$  NMR (151 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  167,68; 167,49; 152,68; 142,62; 139,55; 134,52; 133,91; 133,54; 131,92; 121,13; 118,43; 117,87; 114,33; 113,56; 53,29; 52,57; 52,46; 51,54; 32,74; 28,93; 27,17; 26,71.

MS (ESI)  $m/z$ : 436,13  $[\text{M}+\text{H}]^+$

IČ: 3604, 3265, 2930, 2861, 2102, 1706, 1604, 1582, 1510, 1472, 1446, 1436, 1402, 1371, 1306, 1277, 1267, 1256, 1192, 1145, 1107, 1083, 1055, 1037, 1009, 989, 974, 937, 903, 888, 825, 768, 755, 720, 687, 658, 636, 631, 622, 602  $\text{cm}^{-1}$ .

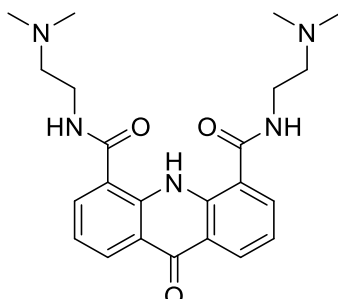
## 4.2.5. Příprava kyseliny

9-[(6-azidoheptyl)amino]akridin-4,5-dikarboxylová (**14**)

Látka **13** (47 mg, 0,11 mmol) byla rozpuštěna v THF (3 ml) a ke směsi byl přidán nasycený roztok NaOH ve směsi MeOH/H<sub>2</sub>O 5:1 (0,5 ml) do změny zbarvení roztoku. Přebytný THF byl oddestilován na rotační vakuové odparce. Vzniklá směs byla rozpuštěna v destilované vodě a okyselena koncentrovanou HCl do kyselé reakce. Vzniklý roztok byl vytřepán s EAC (4×10 ml). Organická vrstva byla spojena, vysušena bezvodým Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Směs byla přefiltrována a oddestilována na rotační vakuové odparce. TLC (EAC:AA, 95:5) R<sub>f</sub> = 0,89.

Vzniklý produkt byl extrémně nestabilní, z tohoto důvodu nebyly změřeny žádné údaje k potvrzení čistoty a totožnosti.

## 4.2.6. Příprava

*N*<sup>4</sup>,*N*<sup>5</sup>-bis[(2-dimethylamino)ethyl]-9-oxo-9,10-dihydroakridin-4,5-dikarboxamidů (**15**)

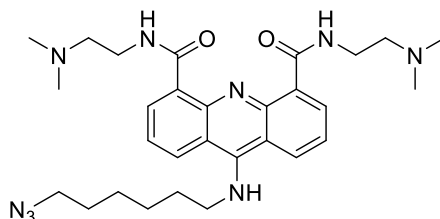
Látka **11** (680,2 mg, 2,185 mmol) byla rozpuštěna v *N,N*-dimethylaminoethylaminu (21 ml). Směs byla zahřívána pod zpětným chladičem po dobu 24 h. Přebytečný *N,N*-dimethylaminoethylamin byl oddestilován na rotační vakuové odparce. Produkt byl přečištěn sloupcovou chromatografií na silikagelu (1. CHCl<sub>3</sub>:MeOH:TEA, 10:1:1) R<sub>f</sub> = 0,16, (2. MeOH:TEA 3:2) R<sub>f</sub> = 0,92. Byla získána žlutá olejovitá látka (523,6 mg). Výtěžek 57 %.

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO d<sub>6</sub>) δ 13,61 (s, 1H); 8,79 (s, 2H); 8,42 (d, J = 1,5 Hz, 2H); 8,16 (d, J = 7,4 Hz, 2H); 7,36 (t, J = 7,7 Hz, 2H); 3,46 (q, J = 6,2 Hz, 4H); 2,54 (t, J = 2,0 Hz, 4H); 2,25 (s, 12H). <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, DMSO d<sub>6</sub>) δ 176,53; 167,08; 139,54; 133,52; 129,65; 121,52; 121,11; 120,75; 58,01; 45,29; 37,45.

MS (ESI) m/z: 424,27 [M+H]<sup>+</sup>

IČ: 3305, 3099, 2947, 2820, 2763, 1640, 1609, 1579, 1548, 1520, 1463, 1430, 1393, 1327, 1302, 1290, 1238, 1187, 1160, 1085, 1064, 1046, 1023, 981, 937, 839, 820, 754, 729, 691, 635, 628 cm<sup>-1</sup>.

## 4.2.7. Příprava

9-[(6-azidohexyl)amino]-*N*<sup>4</sup>,*N*<sup>5</sup>-bis[(2-dimethylamino)ethyl]akridin-4,5-dikarboxamidu (**16**)

Látka **15** (82 mg, 0,194 mmol) byla rozpuštěna v  $\text{SOCl}_2$  (1,5 ml) a zahřívána na teplotu  $85\text{ }^\circ\text{C}$  pod zpětným chladičem po dobu 30 minut. Přebytečný  $\text{SOCl}_2$  byl oddestilován za sníženého tlaku. K reziduu byl přidán fenol (182 mg, 1,94 mmol) a směs byla zahřívána pod zpětným chladičem na teplotu  $110\text{ }^\circ\text{C}$  po dobu 15 minut. Následně byla ochlazená na teplotu  $55\text{ }^\circ\text{C}$  a do směsi byl přidán 6-azidohexan-1-amin (41,2 mg, 0,290 mmol). Směs byla míchána při teplotě  $55\text{ }^\circ\text{C}$  po dobu 24 h. Následně byla směs rozpuštěna v EAC (20 ml) a vytřepána 1M NaOH (5×50 ml). Organická vrstva byla vysušena bezvodým  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Následně byla přefiltrována a organická rozpouštědla byla oddestilována na rotační vakuové odparce. Produkt byl přečištěn sloupcovou chromatografií na silikagelu (1. EAC:MeOH:TEA, 7:3:0,1)  $R_f = 0,4$ . Následně sloupcovou chromatografií na oxidu hlinitém (2. HEX:DCM:MeOH, 10:5:0,5)  $R_f = 0,24$ . Byla získána žlutá olejovitá látka (46,7 mg). Výtěžek 44 %. Podmínky reakce byly optimalizovány změnou reakčních podmínek (Tabulka 3).

Tabulka 3. Reakční podmínky syntézy látky 16.

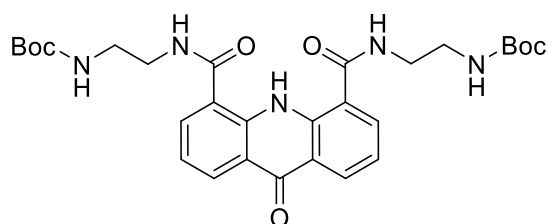
Reakce	Rozpouštědlo (ml)	Teplota $^\circ\text{C}$	6-azidohexan-1-amin ( $\mu\text{l}$ )	Výtěžek (%)
1.	$\text{POCl}_3 - 2$	110	72	11
2.	$\text{SOCl}_2 - 1,5$	90	40	27
3.	$\text{SOCl}_2 - 2$	85	66	44

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz, aceton  $d_6$ )  $\delta$  8.49 (dd,  $J = 8.7, 1.5$  Hz, 2H), 8.32 (qd,  $J = 6.2, 1.4$  Hz, 2H), 7.42 (dd,  $J = 8.7, 7.0$  Hz, 2H), 6.92 (t,  $J = 5.7$  Hz, 1H), 3.98 – 3.91 (m, 2H), 3.69 (td,  $J = 6.9, 5.5$  Hz, 4H), 3.29 (t,  $J = 6.9$  Hz, 2H), 2.61 (t,  $J = 7.0$  Hz, 4H), 2.26 (s, 12H), 1.89 (p,  $J = 7.2$  Hz, 2H), 1.57 (p,  $J = 7.1$  Hz, 2H), 1.53 – 1.35 (m, 4H).  $^{13}\text{C}$  NMR

(126 MHz, acetone  $d_6$ )  $\delta$  167.76, 154.42, 147.00, 133.18, 132.90, 127.23, 122.48, 116.72, 59.48, 51.80, 51.41, 45.81, 38.60, 31.56, 27.03.

MS (ESI)  $m/z$ : 548,19[M+H]<sup>+</sup>

#### 4.2.8. Příprava $N^4, N^5$ -bis[(2-Boc-ethylamino)ethyl]9-oxo-9,10-dihydroakridin-4,5-dikarboxamidu (**17**)



Látka **12** (100,3 mg, 0,32 mmol) byla rozpuštěna v *N*-Boc-1,2-diaminoethanu (2 ml). Směs byla zahřívána pod zpětným chladičem na teplotu 105 °C po dobu 24 h. Následně byla směs vychlazena a rozpuštěna v  $CHCl_3$  (30 ml). Směs byla přečištěna sloupcovou chromatografií na silikagelu (1.  $CHCl_3$ :MeOH:TEA, 9:1:8)  $R_f = 0,34$ , (2.  $CHCl_3$ :MeOH:TEA, 99:1:5)  $R_f = 0,22$ . Byla získána oranžová olejovitá látka.

Dle NMR byl přítomný *N*-Boc-1,2-diaminoethan ve vysoké koncentraci.

### 4.3. Navázání produktu **16** na ODN sondu

Tabulka 4. Používané ODN sondy modifikované fosfátem na 3'-konci, 6-karboxyfluoresceinem (6-FAM) na 5'-konci.

Kódové označení	Modifikované oligonukleotidy	Modifikace	MW
16-18/13	5'-TGA TCA TGA GAG [DBCOdT]CG CCG-3'	5'-6-FAM, 3'-phos	6626,7
16-18/7	5'-TGA TCA [DBCOdT]GA GAG TCG CCG-3'	5'-6-FAM, 3'-phos	6626,7
16-13/7	5'-TGA TCA [DBCOdT]GA GAG T-3'	5'-6-FAM, 3'-phos	5100,8
16-13/13	5'-TGA TCA TGA GAG [DBCOdT]-3'	5'-6-FAM, 3'-phos	5100,8

Akridin **16** (42 mg, 0,099 mmol) byl rozpuštěn v 1 ml MeOH a k roztoku bylo přidáno 100  $\mu$ l TFA. Nadbytečný MeOH a TFA byly oddestilovány na rotační vakuové

odparce. Reziduum bylo rozpuštěno v MeOH (1,68 ml), aby bylo dosaženo koncentrace 25 mg/ml. 200  $\mu$ l roztoku bylo přidáno ke komerčně dodaným ODN sondám na CPG (controlles pore glass) pevné fázi (3 mg) (Tabulka 4), kdy ODN sonda je připojena na CPG na 3'-konci. Suspenze byla třepána za laboratorní teploty na automatické třepače po dobu 24 h. Pevná fáze byla promyta  $5 \times 0,5$  ml MeOH. Do směsi byl přidán 50 mM  $K_2CO_3$  v MeOH (0,5 ml) a směs byla třepána za laboratorní teploty na automatické třepače po dobu 8 h.

Následně byla směs centrifugována po dobu 30 s při 13 000 otáčkách za minutu. Metanolký supernatant byl doplněn ultračistou vodou do objemu 1 ml a byl přenesen na kolonky gelové chromatografie (CentriPure N10). Na kolonkách byla oddělena frakce vysokomolekulárních látek (sondy) a tím bylo docíleno odstranění nízkomolekulárních nečistot (FAM, akridin,  $K_2CO_3$ ). Frakce byla vysušena pomocí rotační vakuové odparky. Vzniklé reziduum bylo rozpuštěno  $3 \times 20$   $\mu$ l  $H_2O$  a přeneseno do vialky. Směs byla následně přečištěna semipreparativní HPLC metodou.

Čištění sond HPLC metodou probíhalo při podmínkách uvedených v (Tabulka 5). K detekci byl využit detektor diodového pole (DAD), který měřil absorbanci při 260, 445, 495 nm. Byla jímána frakce, jejíž absorpční spektrum odpovídalo sondě s navázaným FAM a produktem **16**.

Tabulka 5. Parametry HPLC systému.

Kolona	Phenomenex Luna 5 $\mu$ Phenyl-Hexyl 150 $\times$ 3.00 mm, velikost částic 5 $\mu$ m
Teplota	40 °C
Průtoková rychlost	1 ml/min
Mobilní fáze	50 mM TEAA:ACN (Triethylammonium acetát:acetonitril) v poměru 18:82, která byla izokraticky upravena na poměr 20:80 při eluci požadované sondy s produktem <b>16</b>

Získané sondy s produktem **16** byly odeslány na testování do firmy Generi Biotech. Tam byly změřeny potřebné hodnoty  $M_w$ ,  $T_m$ , a fluorescence, které byly následně graficky zpracovány.

#### 4.4. Obecný postup při testování produktu **16** s ODN sondou v roztoku

Jako modelový duplex byla zvolena reálná, 18 bází dlouhá, sekvence genu HFE. Sense ODN vlákno bylo značeno FAM na 5'-konci. Antisense ODN vlákno bylo značeno BHQ1 na 3'-konci, zároveň byly použity sekvence AA a CC mismatche (Tabulka 6). 15  $\mu$ l duplexu v TrueStart pufru bylo přeneseno do 96 jamkové destičky. Byl připraven 10 mM zásobní roztok testovaného akridinu **16** v DMSO. Následně byl z tohoto roztoku připraven naředěný zásobní roztok v čištěné vodě, o koncentraci 0,8 mM. Z druhého zásobního roztoku o koncentraci 0,8 mM bylo následně připraveno 7 pracovních roztoků v pufru tak, aby po přidání 5  $\mu$ l těchto roztoků k 15  $\mu$ l roztoku duplexu bylo dosaženo výsledných testovaných koncentrací látky (Tabulka 7). Směs (20  $\mu$ l) byla zahřívána 1 min při 95 °C. Poté byla směs ochlazena na 40 °C a při této teplotě byla držena 3 minuty. Následně byla směs postupně zahřívána po krocích 0,2 °C až dosáhla teploty 80 °C. Fluorescence byla změřena vždy 5 sekund po dosažení zvýšení teploty o 0,2 °C. Výsledné hodnoty fluorescence byly vyneseny do grafu proti teplotě a byly získány meltingové křivky. Z hodnot záporné derivace změny fluorescence byly získány teploty tání duplexu.

Tabulka 6. Používané ODN.

ODN	ODN sekvence	značení
Sense	FAM-5'-TGA TCA TGA GAG TCG CCG-3'	FAM
Antisense	5'-CGG CGA CTC TCA TGA TCA-3'-BHQ1	BHQ1
Mismatch AA	5'-CGG CGA CAC TCA TGA TCA-3'-BHQ1	BHQ1
Mismatch CC	5'-CGG CGA CTC TCA TCA TCA-3'-BHQ1	BHQ1

Tabulka 7. Koncentrace připravených roztoků a koncentrace testované směsi.

Roztok	1	2	3	4	5	6	7
c ( $\mu$ M) pracovních roztoků	0,08	0,64	6,24	25	50	100	400
Výsledná c ( $\mu$ M) směsi (20 $\mu$ l)	0,02	0,16	1,56	6,25	12,5	25	100



## 4.5. Spektrofotometrické titrace akridinu **16** s dsODN a ssODN

Akridin **16** byl rozpuštěna v MeOH za vzniku 4 mM roztoku. Do kyvety bylo odebráno 5  $\mu$ l tohoto roztoku, bylo přidáno 995  $\mu$ l pufru (reaction buffer for DNase I  $MgCl_2$ ) za vzniku 20  $\mu$ M roztoku akridinu **16**. Následně byly přidáván roztok ODN (Tabulka 8). Po přidání předepsaného množství 1 mM roztoku dsODN nebo 2 mM roztoku ssODN (Tabulka 9), byl roztok promíchán a následně byla změřena absorbance roztoku v rozmezí 350-500 nm. Hodnoty změřené absorbance byly vyneseny do grafu a porovnány viz diskuse.

Tabulka 8. ODN se kterými se prováděla spektrofotometrická titrace.

dsODN	ssODN
5'-TGA TCA TGA GAG TCG CCG-3' 5'-CGG CGA CTC TCA TGA TCA-3'	5'-TGA TCA TGA GAG TCG CCG-3'
5'-TCC AGG GGT CCC GCC AGC-3' 5'-GCT GGC GGG ACC CCT GGA-3'	5'-TCC AGG GGT CCC AGC-3'
5'-TAT ATT TAT AGT TCT TTA-3' 5'-TAA AGA ACT ATA AAT ATA-3'	5'-TAT ATT TAT AGT TCT TTA-3'

Tabulka 9. Množství přidávané ODN k přípravě roztoků pro dsDNA a ssDNA.

Přidávané množství 2 mM ssDNA (ml)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	1,5	2,0	2	2	3	3	4
Přidávané množství 1 mM dsDNA (ml)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	1	1,0	2,5	2,5	5.0	5.0

## 5. Diskuse

Syntéza akridinových derivátů spočívá ve vícekrokové syntéze, při které nejprve vzniká samotné akridinové jádro a následně jsou na něj navázány požadované substituenty. Časté problémy, které byly řešeny v průběhu celé této práce, byla stabilita molekuly, vznik nechtěných reziduí a obtížné čištění látek. Konkrétní pojednání o řešení těchto problémů je zmíněno u každé látky zvlášť.

### 5.1. Série látek A

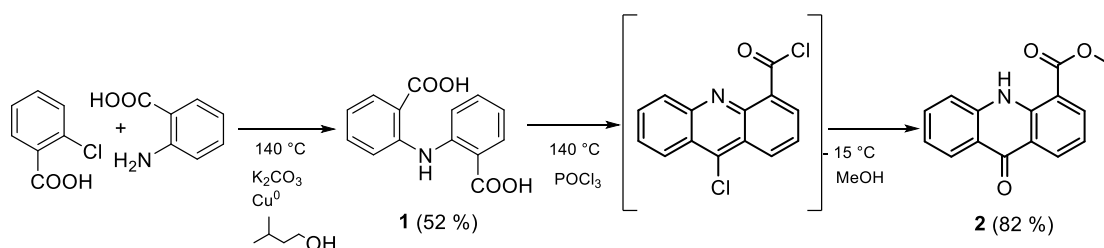


Schéma 1. Schéma 1. Syntéza prekurzorů akridinu 1 a 2.

Prekurzor akridinového jádra, látka **1** byla připravena Ullmannovou kondenzací pomocí mědi katalyzované nukleofilní aromatické substituce 2-chlorbenzoové kyseliny anthranilovou kyselinou (Schéma 1). Následně byl prekurzor **1** kondenzován pomocí  $\text{POCl}_3$  do akridinového kruhu. Tento velmi reaktivní meziprodukt byl převeden na metylester pomocí nadbytku  $\text{MeOH}$  za vzniku námi požadovaného prekurzoru **2**. Tato syntéza vycházela z publikovaného postupu s výtěžkem 60 %, poté v opakované reakci až 82 %. První výtěžek byl nižší z důvodu kratšího času reakce o 3 h.<sup>69</sup>

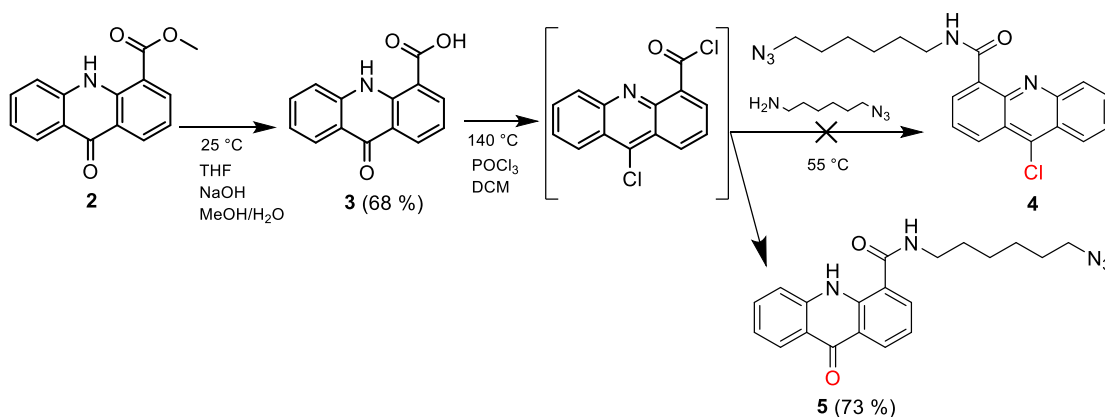
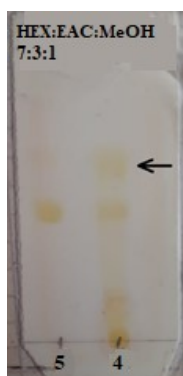


Schéma 2. Syntéza prekurzorů 3, 4 a 5.

Látka **2** již obsahovala akridinové jádro a díky dostatečné lipofilitě a stabilitě ji bylo možno dobře vyčistit a charakterizovat. Pro další kroky ovšem musela být dále uvolněna volná karboxylová funkční skupina. Ta byla připravena bazickou hydrolyzou methylesteru za vzniku prekurzoru **3** s výtěžkem 68 % (Schéma 2). Další reakcí byl připraven silně reaktivní meziprodukt 9-chlorakridin-4-karbonyl chlorid, ze kterého byl připraven pomocí 6-azidohexan-1-aminu amid **4**. Prekurzor se při následném čištění sloupcovou chromatografií na silikagelu rozložil. Kontrolní TLC odhalilo vznikající rozkladný produkt (Obrázek 18)  $R_f(5) = 0,44$ .<sup>67</sup> Následná NMR analýza nepotvrdila totožnost prekurzoru **4**. Vznikl stabilnější prekurzor **5**.



Obrázek 18. TLC záznam látky 4 a 5 v soustavě HEX:EAC:MeOH, 7:3:1.

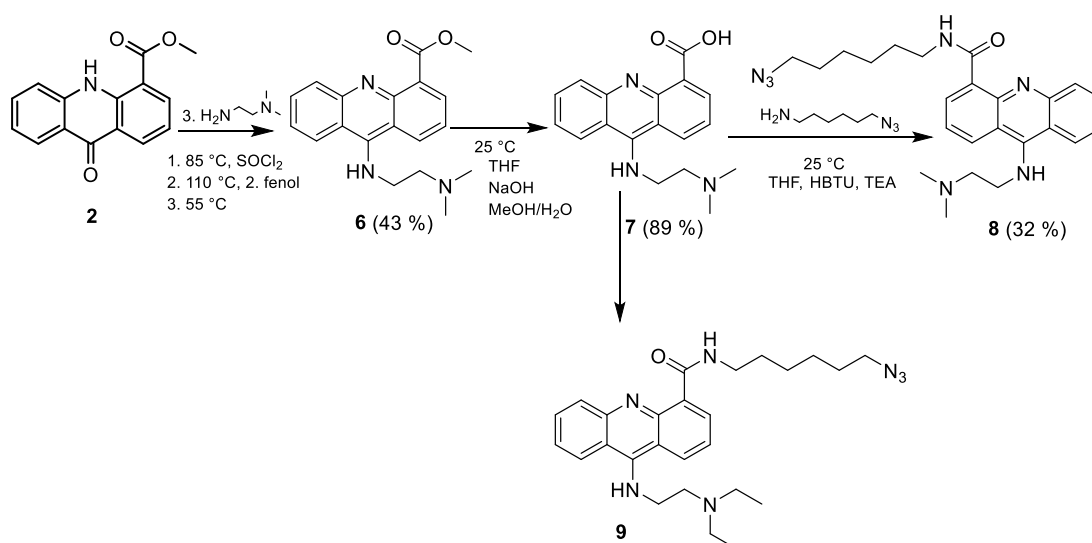


Schéma 3. Syntéza akridinu **6**, **7** a produktu **8**.

Pro přípravu produktu **8** byl zvolen alternativní syntetický postup (Schéma 3). Při syntéze nejprve došlo k nukleofilní aromatické substituci akridinového jádra *N,N*-dimethylaminoethylaminem po převedení látky **2** *in situ* na reaktivní 9-chlor a následně na 9-fenoxy derivát. Příprava akridinu **6** byla několikrát opakována. Při první reakci byl získán výtěžek 21 %, proto byly upraveny reakční podmínky. Místo POCl<sub>3</sub> byl použit méně reaktivní SOCl<sub>2</sub> čímž byl získán o 22 % vyšší výtěžek.

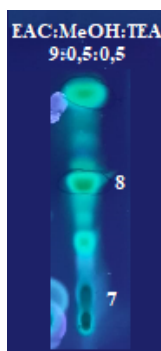
Prekurzor **7** byl následně připraven bazickou hydrolyzou methylesteru karboxylové kyseliny. Tato reakce proběhla téměř okamžitě po přidání nasyceného roztoku NaOH. Analýzu reakce méně komplikovalo chromatografické chování látek **6** a **7**. Na kontrolním TLC byla přítomna pouze jedna skvrna (Obrázek 19) se shodným R<sub>f</sub> jako u výchozí látky. Zásadní rozdíl mezi látkami byl v intenzitě fluorescence při UV detekci. Reakce proběhla téměř s 90 % výtěžkem. Delší čas reakce více než 30 min měl za následek rozklad produktu a snížení výtěžku reakce, což bylo zjištěno při opakování reakce, kdy klesl výtěžek o 72 %.

## Diskuse



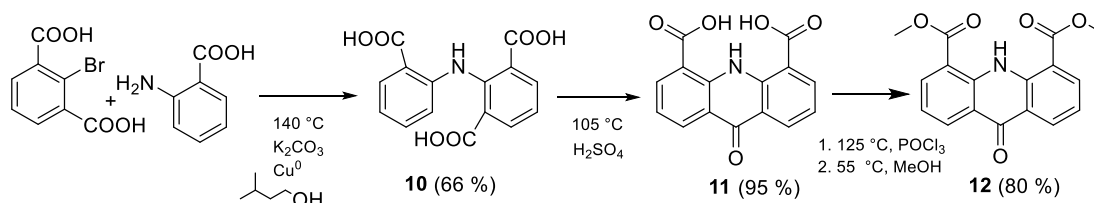
Obrázek 19. TLC deska látky 7 po vyčištění na silikagelu s porovnáním výchozí látky 6 v soustavě EAC:MeOH:TEA, 9:0,5:0,5.  $R_f$  obou látek je téměř totožný, ale intenzita záření pod UV lampou je odlišná.

Amid **8** byl následně připraven s využitím aktivátoru HBTU. Dle kontrolního TLC vznikla směs produktu s rezidui (Obrázek 20). Na TLC je vidět výrazné reziduum v čele, které vznikalo téměř ve stejném množství jako produkt **8**. Pro vyčištění produktu bylo vyzkoušeno několik soustav, které nebyly účinné. Nakonec byl problém s čištěním vyřešen soustavou EAC:MeOH:TEA, 9:0,5:0,5. Pro zvýšení výtěžku by bylo potřeba optimalizovat reakční podmínky. To nebylo provedeno z důvodu velmi nízké účinnosti v následných testech na zvyšování  $T_m$  duplexů DNA u strukturně podobné látky **9**, která byla připravena v naší skupině paralelně s látkou **8**. Látka **9** byla substituována *N,N*-diethylaminoethylaminem v poloze 9 akridinového jádra. Z tohoto důvodu jsme se rozhodli od této série látek upustit. Rozhodli jsme se připravit novou sérii látek, které nesou dva karboxamidy v poloze 4 a 5 (sérii B).



Obrázek 20. TLC záznam látky 8 před čištěním sloupcovou chromatografií na silikagelu.

## 5.2. Série látek B

Schéma 4. Syntéza prekurzorů **10**, **11**, **12**..

Prekurzor **10** (Schéma 4) byl připraven analogickým postupem jako prekurzor **1**, tentokrát kondenzací anthranilové kyseliny s kyselinou 2-bromisofthalovou. Reakce byla připravována opakovaně s výtěžkem, který se pohyboval mezi 60-70 %. Následovala kondenzace v prostředí koncentrované kyseliny sírové s výtěžkem 95 %. Tato reakce probíhala dle publikovaného postupu, upravena byla jen teplota z 50 °C na teplotu 105 °C a doba reakce ze 3 h na 1 h. Byl získán vyšší výtěžek, než byl uveden v publikovaném postupu.<sup>70</sup> Reakce byla monitorována pomocí TLC po dobu 3 hodin. Bylo zjištěno, že po jedné hodině již nedochází ke změně na TLC desce (Obrázek 21).

Obrázek 21. TLC záznam látky **11** v čase spuštění reakce, v době 1 h a v době 3 h. Soustava EAC:HEX:AA, 6:3:1.

Z prekurzoru **11** byl připraven nejprve reaktivní meziproduct chlorid kyseliny 9-chloroakridin-4,5-dikarboxylové, z něhož následnou esterifikací vznikl prekurzor **12** ve velmi dobrém výtěžku 80 %.

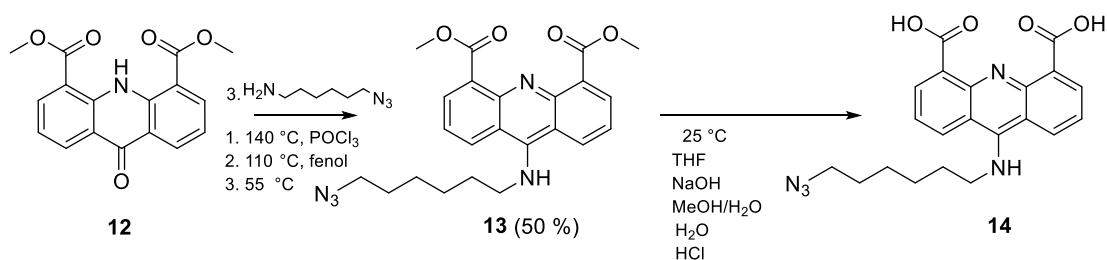
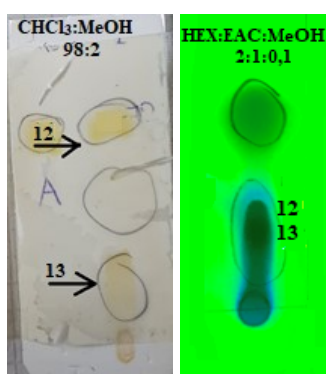


Schéma 5. Syntéza prekurzorů akridinu 13 a 14.

Prekurzor **13** (Schéma 5) byl připraven nukleofilní aromatickou substitucí akridinového jádra podobně jako výše po *in situ* převedení na 9-chlor a následně 9-fenoxy derivát. TLC po čištění sloupcovou chromatografií na silikagelu odhalilo několik skvrn, které se nedařilo oddělit soustavou CHCl<sub>3</sub>:MeOH, 98:2. Vyzkoušena byla i soustava HEX:EAC:MeOH, 2:1:0,1 při které byla odstraněna jiná nečistota, avšak nedařilo se oddělit látky **12** a **13** (Obrázek 22). Prekurzor **13** se podařil vyčistit využitím mobilní soustavy EAC:AA, 9:1 ( $R_f = 0,06$ ), kdy došlo k protonizaci sekundárního aminu v pozici 9, tím došlo k zadržení látky na silikagelu. Po eluci nečistot byla změněna mobilní soustava na EAC:MeOH:TEA, 4:1:0,5  $R_f = 0,87$ , došlo k neutralizaci a uvolnění čisté látky ze silikagelu. Prekurzor **13** se rychle rozkládal, proto byl ihned zpracován do další reakce, kterou byla bazická hydrolyza esteru. Na kontrolní TLC desce prekurzoru **14** po čištění kyselinou bylo přítomno několik skvrn reziduí. Během 10 minut se prekurzor **14** rozložil. Tento prekurzor se nepodařilo vyčistit bez rozkladu, a proto byla změněna strategie syntézy.

Obrázek 22. Vlevo -TLC, soustava CHCl<sub>3</sub>:MeOH, 98:2 po čištění na sloupci. Vpravo – TLC, soustava HEX:EAC:MeOH (2:1:0,1).

## Diskuse

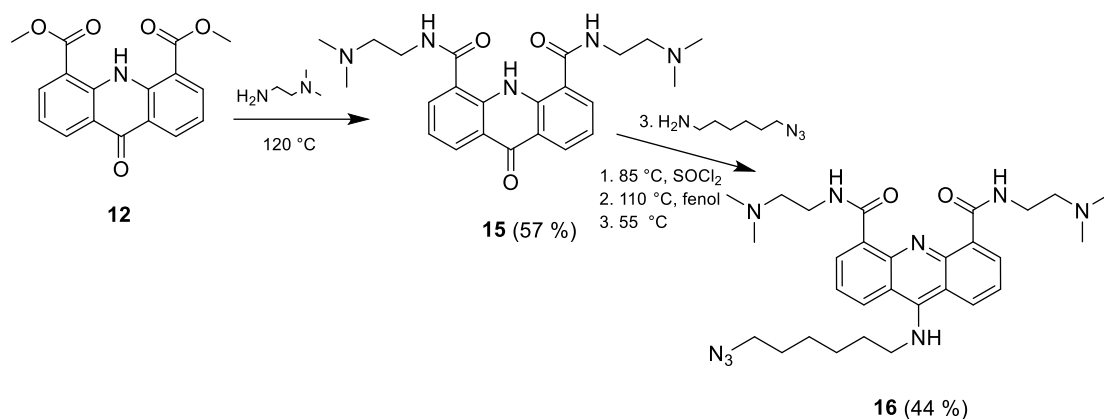


Schéma 6. Syntéza prekurzorů **15** a produktu **16**.

V nové strategii byl nejprve připraven diamid **15** (Schéma 6) amidolýzou esterových vazeb v látce **12**. Tato reakce byla připravována několikrát. Při první reakci byl získán velmi nízký výtěžek 18 %, proto byly upraveny reakční podmínky. Nízký výtěžek byl způsoben nedostatečným rozpuštěním prekurzoru **12** v *N,N*-dimethylaminoethylaminu. Při dostatečném rozpuštění byl získán výtěžek 57 %. Produkt **16** byl následně připraven nukleofilní aromatickou substitucí akridinového jádra. Při použití  $\text{POCl}_3$  jako chloračního činidla byl získán pouze nízký výtěžek 11 %, nahrazením  $\text{POCl}_3$  za  $\text{SOCl}_2$  byl získán vyšší výtěžek o 33 %. Pro čištění byla použita soustava EAC:MeOH:TEA, 7:3:0,1, kdy došlo k oddělení výchozí látky a nečistot od produktu. Vzniklo malé množství rozkladných produktů, které byly odstraněny přečištěním soustavou HEX:DCM:MeOH, 10:5:0,5 sloupcovou chromatografií na oxidu hlinitém.

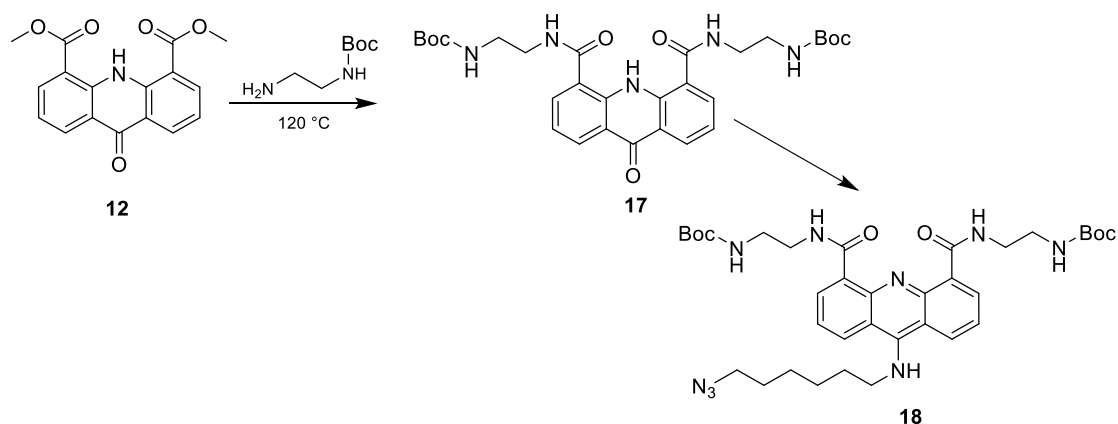


Schéma 7. Syntéza prekurzorů **17**.



Následně jsme chtěli uplatnit stejný postup syntézy produktu **16** pro přípravu produktu **18** (Schéma 7), kde jsme následně plánovali odchránění aminoskupin a další zkoumání látky s volnou primární aminoskupinou. Dle TLC desky byl vytvořen prekurzor **17**, avšak nepodařilo se ho vyčistit od jedné z výchozích látek. Z časových důvodů nebylo pokračováno optimalizací podmínek syntézy látky **18**.

### 5.3. Navázání produktu **16** na ODN sondu

Tabulka 10. Použité ODN sondy akridinem **16**.

Kódové označení	ODN sondy	hodnota Mw sond s akridinem <b>16</b>
D 16-18/13	5'-TGA TCA TGA GAG [DBCOdT]CG CCG-3'	7174,4
D 16-18/7	5'-TGA TCA [DBCOdT]GA GAG TCG CCG-3'	7174,4
K 16-13/7	5'-TGA TCA [DBCOdT]GA GAG T-3'	5648,5
K 16-13/13	5'-TGA TCA TGA GAG [DBCOdT]-3'	5648,5

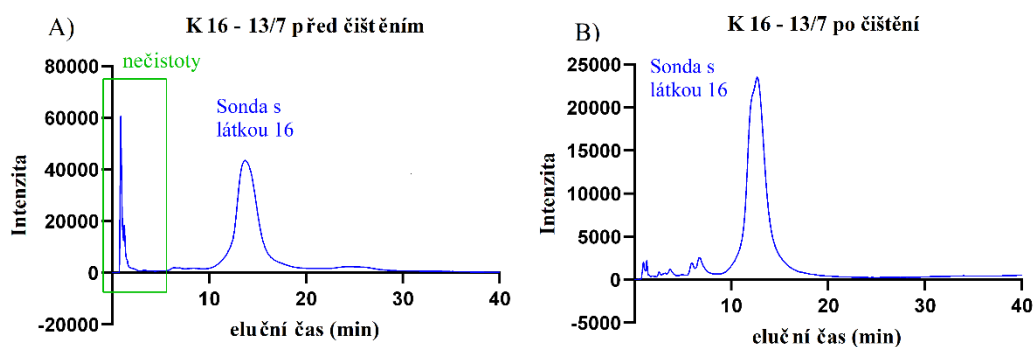
Připravený akridin **16** jsme se dále rozhodli navázat na ODN sondy (Tabulka 10). Akridin obsahoval azidovou skupinu, která je vhodná k reakci s alkyny v tzv. click reakci. Z tohoto důvodu byly výše uvedené ODN sondy připraveny tak, aby obsahovaly DBCO (dibenzocycloooktyn-amin) navázaný na jednu z vybraných T bází. Silné pnutí v osmičlenném cyklu s trojnou vazbou umožňuje snadnou reakci s azidy. ODN sondy po přípravě v DNA syntetizátoru ještě stále na pevné fázi byly proto třepány s akridinem **16** rozpuštěným v MeOH bez dalších přísad reagentů. Po důkladném promytí pevné fáze a odštěpení ODN sondy z pevné fáze byly jednotlivé ODN sondy přečištěny na gelovou sloupcovou chromatografií. Zde byla oddělena frakce vysokomolekulárních látek (sondy) od nízkomolekulárních nečistot (FAM, akridin, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>). Navázaná sonda byla nakonec čištěna semipreparativní HPLC metodou.

Semipreparativní HPLC sond s produktem **16** bylo provedeno za podmínek uvedených v (Tabulka 5). Tyto podmínky byly vybrány na základě zkušeností paralelně probíhajícího výzkumu. Jelikož se při těchto podmínkách snadno oddělila sonda s produktem **16** od zbylých reziduí, byla látka takto čištěna. Mobilní fáze byla při eluci

## Diskuse

požadované sondy s produktem **16** izokraticky upravena za účelem snížení množství odjímaných frakcí z 50 mM TEAA:ACN v poměru 18:82 na poměr 20:80. Následně byla provedena analýza sondy s produktem **16** po čištění při stejných podmínkách.

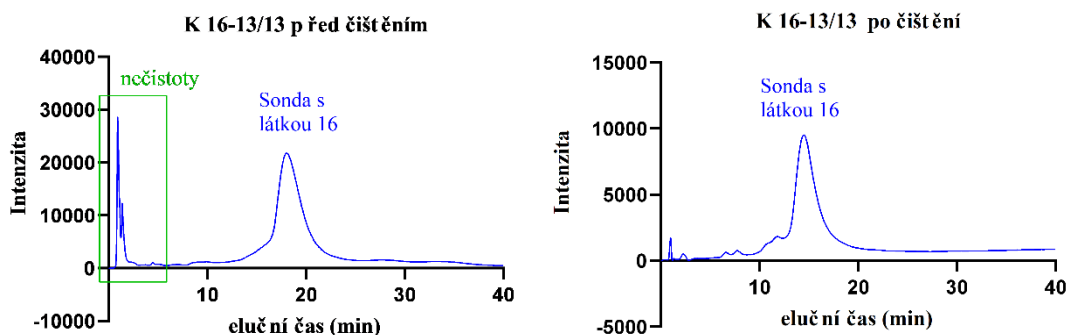
Níže jsou přiloženy chromatogramy jednotlivých ODN sond s produktem **16** před čištěním a po čištění HPLC metodou (Graf 1, Graf 2, Graf 3, Graf 4).



Graf 1. Chromatogram sondy K 16–13/7. Při použití mobilní fáze 50 mM TEAA:ACN v poměru 18:82, která byla izokraticky upravena na poměr 20:80 při eluci požadované sondy s akridinem **16**.

A) Chromatogram analýzy sondy před čištěním HPLC metodou. Nečistoty jsou označeny v zeleném rámečku.

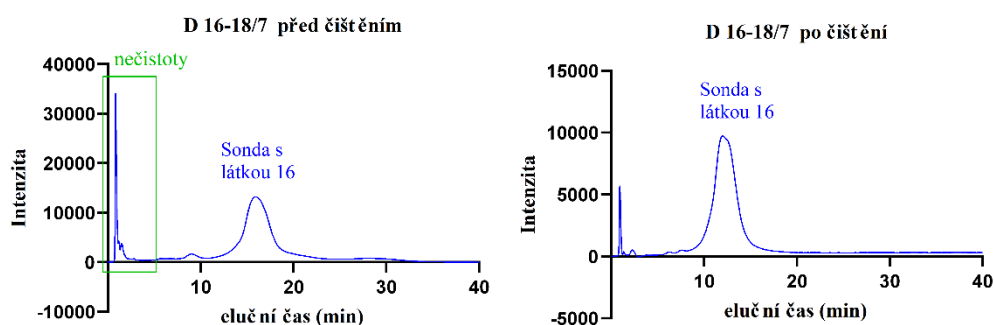
B) Chromatogram analýzy sondy po čištění.



Graf 2. Chromatogram sondy K 16–13/13. Při použití mobilní fáze 50 mM TEAA:ACN v poměru 18:82, která byla izokraticky upravena na poměr 20:80 při eluci požadované sondy s akridinem **16**.

A) Chromatogram analýzy sondy před čištěním HPLC metodou. Nečistoty jsou označeny v zeleném rámečku.

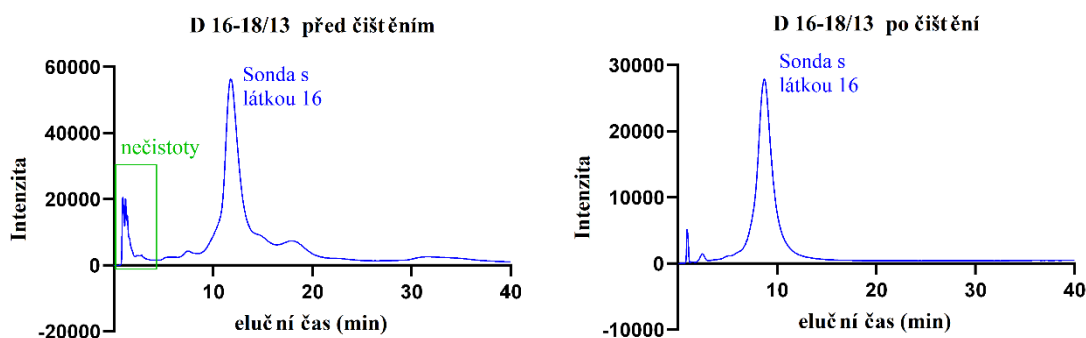
B) Chromatogram analýzy sondy po čištění.



Graf 3. Chromatogram sondy K 16–18/7. Při použití mobilní fáze 50 mM TEAA:ACN v poměru 18:82, která byla izokraticky upravena na poměr 20:80 při eluci požadované sondy s akridinem 16.

A) Chromatogram analýzy sondy před čištěním HPLC metodou. Nečistoty jsou označeny v zeleném rámečku.

B) Chromatogram analýzy sondy po čištění.



Graf 4. Chromatogram sondy K 16–18/13. Při použití mobilní fáze 50 mM TEAA:ACN v poměru 18:82, která byla izokraticky upravena na poměr 20:80 při eluci požadované sondy s akridinem 16.

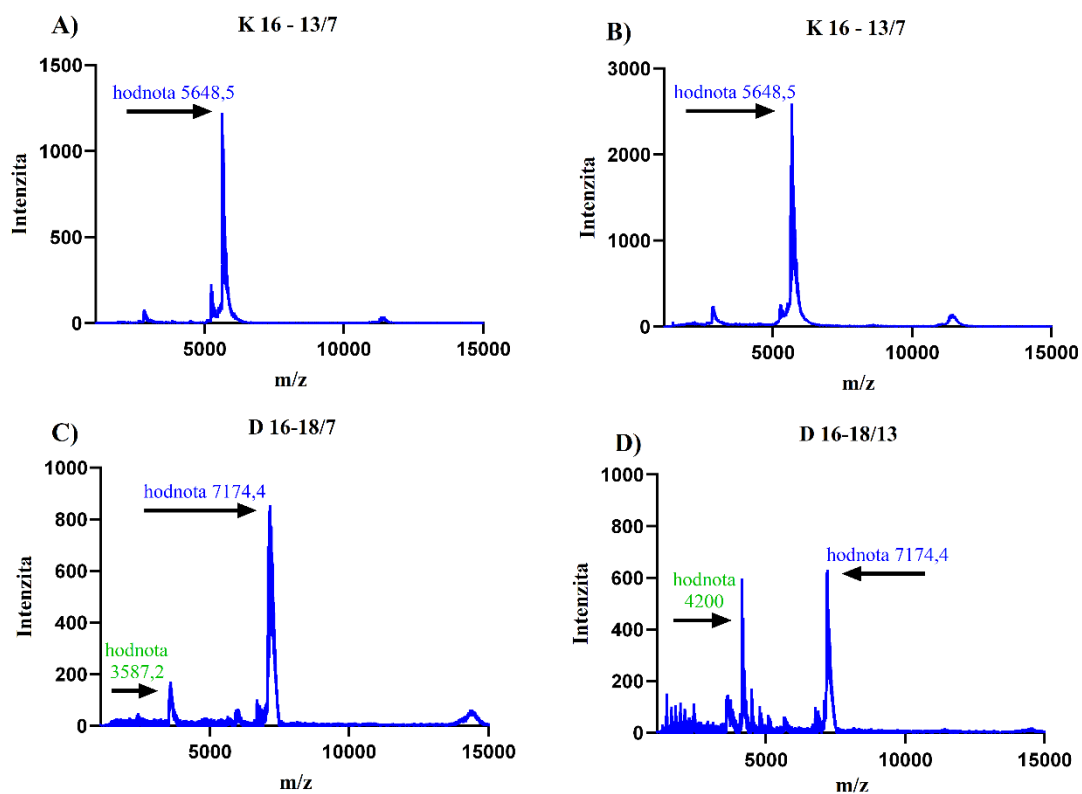
A) Chromatogram analýzy sondy před čištěním HPLC metodou. Nečistoty jsou označeny v zeleném rámečku.

B) Chromatogram analýzy sondy po čištění.

Pomocí semipreparativní HPLC se podařilo oddělit nečistoty na začátku analýzy. Byly to neznačené sekvence, krátké sekvence, sekvence s FAM bez DBCO, sekvence s DBCO ale bez FAM, sekvence s FAM a DBCO bez produktu 16.

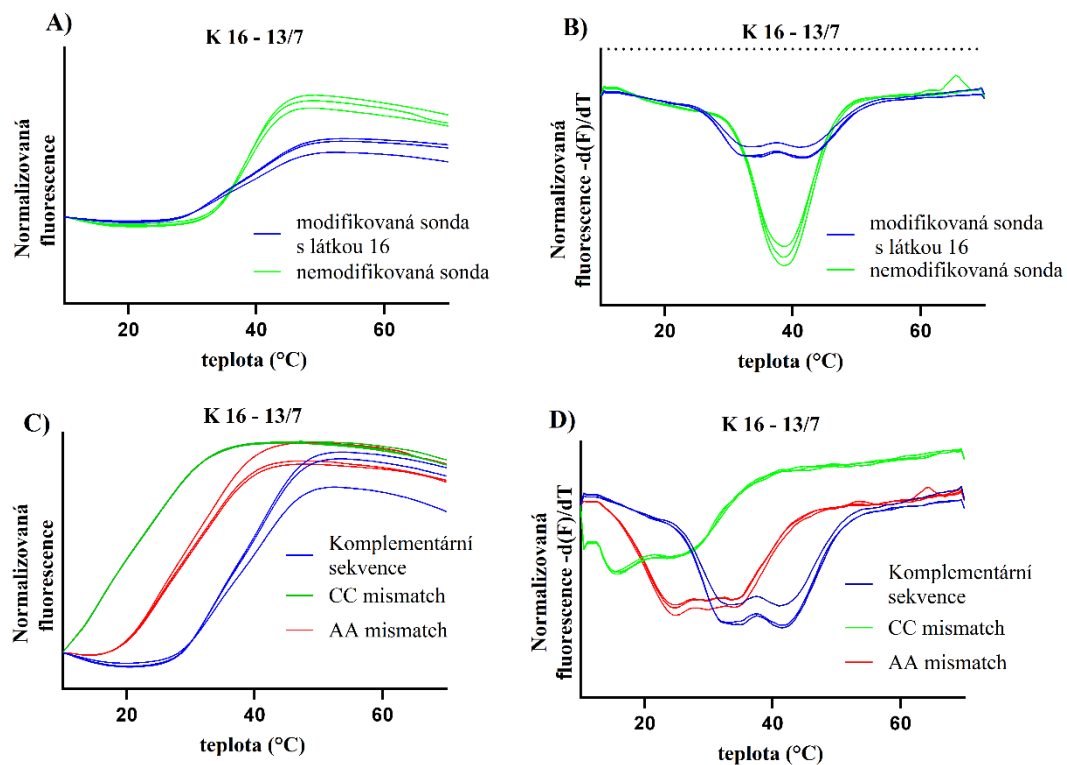
## 5.4. Grafy ODN sond

Vyčištěné ODN sondy byly odeslány k změření teploty tání duplexu modifikované sondy s cílovou sekvencí a molekulové hmotnosti (Graf 5) krátkých a dlouhých ODN sond do firmy Generi Biotech. Získané naměřené hodnoty byly zpracovány do grafické podoby (Graf 6, Graf 7, Graf 8, Graf 9). Pro lepší čitelnost grafů byly normalizovány hodnoty fluorescence i fluorescence  $-d(F)/dT$ .



Graf 5. Změřené hodnoty molekulové hmotnosti pomocí přístroje Maldi. A + B Změřená hodnota odpovídá vypočítané Mw 5648,5 sondy s produktem 16. C + D změřená hodnota odpovídá vypočítané Mw 7174,4.

Z grafu lze vyčíst, že hodnoty změřené i vypočítané hodnoty Mw jednotlivých sond s produktem 16 odpovídá. U sondy D 16-18/13 se objevuje pík s hodnotou Mw 4200, jedná se pravděpodobně o Mw některé z popisovaných nečistot.



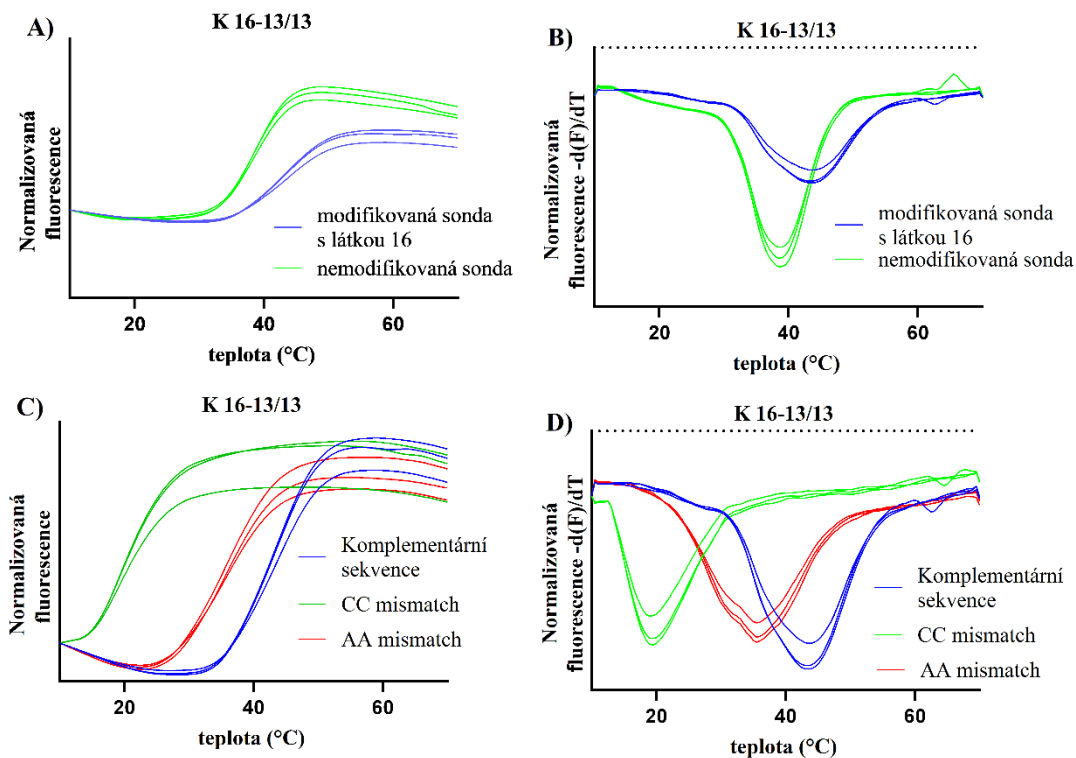
Graf 6. Záznam měření sondy K16-13/7.

A) Porovnání meltingových křivek duplexu modifikované sondy K 16–13/7 (modrá) a nemodifikované sondy (zelená) s komplementární cílovou sekvencí.

B) Porovnání meltingových piků duplexů modifikované sondy K 16–13/7 (modrá) a nemodifikované sondy (zelená) s komplementárním cílovou sekvencí.

C) Porovnání meltingových křivek duplexů modifikované sondy K 16–13/7 s komplementárním (modrá) AA mismatch (červená) a CC mismatch (zelená) cílovou sekvencí.

D) Porovnání meltingových piků duplexů modifikované sondy K 16–13/7 s komplementárním (modrá) AA mismatch (červená) a CC mismatch (zelená) cílovou sekvencí.



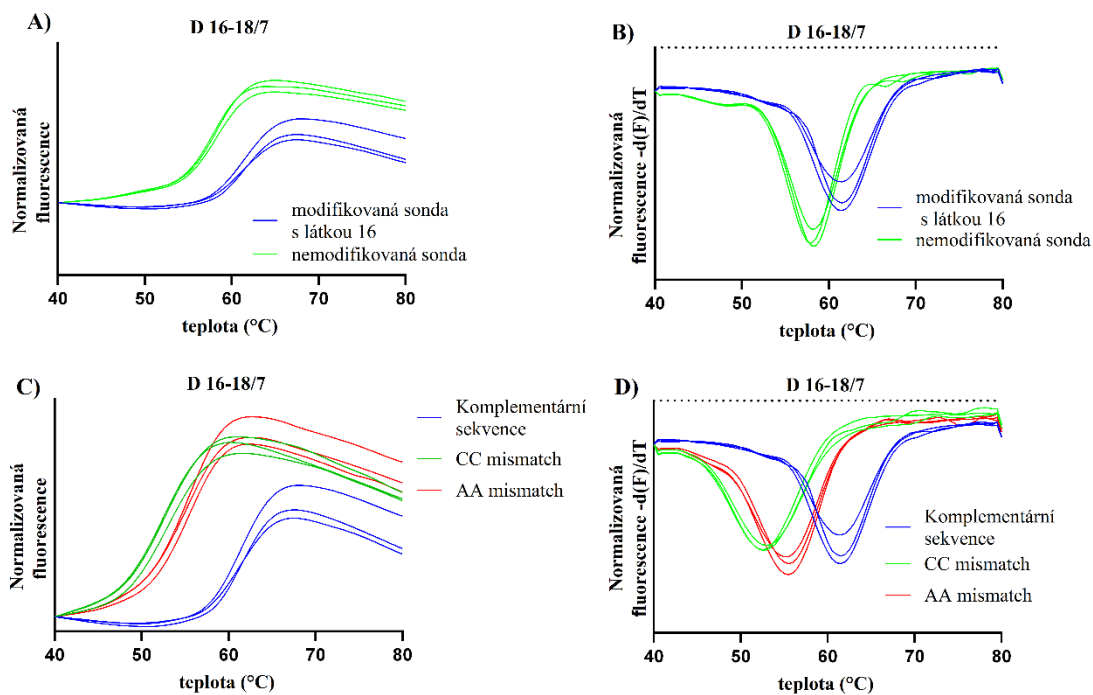
Graf 7. Záznam měření sondy K16-13/13.

A) Porovnání meltingových křivek duplexu modifikované sondy K 16–13/13 (modrá) a nemodifikované sondy (zelená) s komplementární cílovou sekvencí.

B) Porovnání meltingových piků duplexů modifikované sondy K 16–13/13 (modrá) a nemodifikované sondy (zelená) s komplementární cílovou sekvencí.

C) Porovnání meltingových křivek duplexů modifikované sondy K 16–13/13 s komplementární (modrá) AA mismatch (červená) a CC mismatch (zelená) cílovou sekvencí.

D) Porovnání meltingových piků duplexů modifikované sondy K 16–13/13 s komplementární (modrá) AA mismatch (červená) a CC mismatch (zelená) cílovou sekvencí.



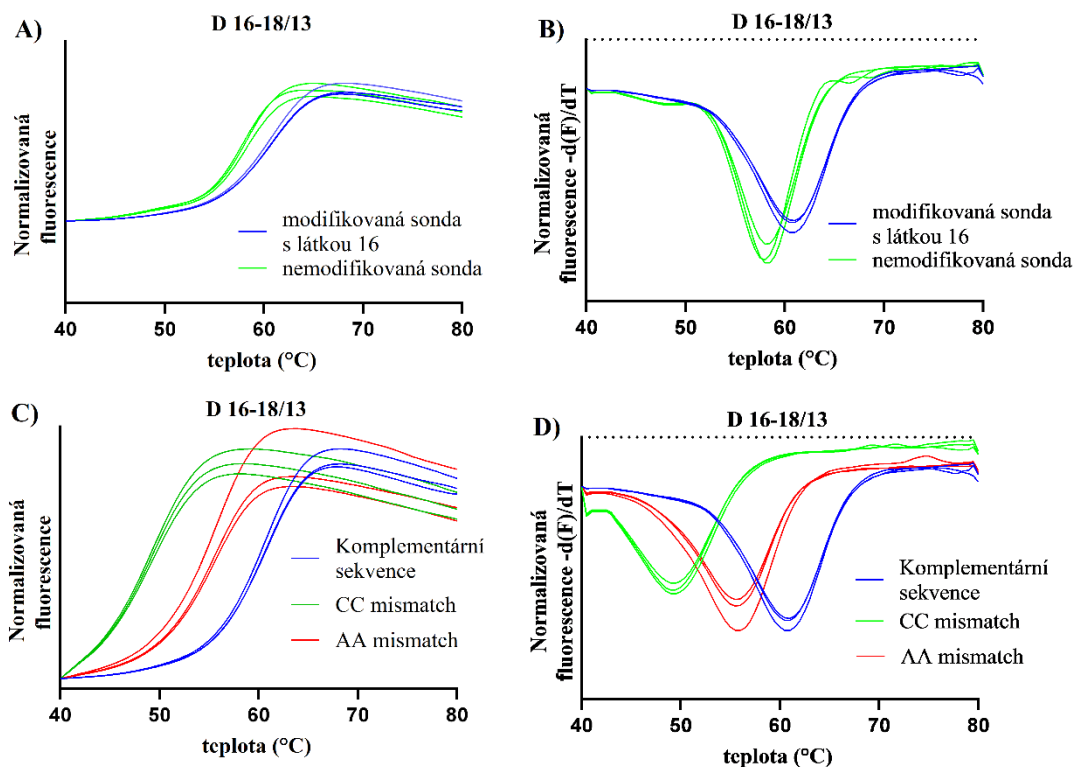
Graf 8. Záznam měření sondy D16-18/7.

A) Porovnání meltingových křivek duplexu modifikované sondy D 16–18/7 (modrá) a nemodifikované sondy (zelená) s komplementární cílovou sekvencí.

B) Porovnání meltingových piků duplexů modifikované sondy D 16–18/7 (modrá) a nemodifikované sondy (zelená) s komplementární cílovou sekvencí.

C) Porovnání meltingových křivek duplexů modifikované sondy D 16–18/7 s komplementární (modrá) AA mismatch (červená) a CC mismatch (zelená) cílovou sekvencí.

D) Porovnání meltingových piků duplexů modifikované sondy D 16–18/7 s komplementární (modrá) AA mismatch (červená) a CC mismatch (zelená) cílovou sekvencí.



Graf 9. Záznam měření sondy D 16-18/13.

A) Porovnání meltingových křivek duplexu modifikované sondy D 16–18/13 (modrá) a nemodifikované sondy (zelená) s komplementární cílovou sekvencí.

B) Porovnání meltingových piků duplexů modifikované sondy D 16–18/13 (modrá) a nemodifikované sondy (zelená) s komplementární cílovou sekvencí.

C) Porovnání meltingových křivek duplexů modifikované sondy D 16–18/13 s komplementární (modrá) AA mismatch (červená) a CC mismatch (zelená) cílovou sekvencí.

D) Porovnání meltingových piků duplexů modifikované sondy D 16–18/13 s komplementární (modrá) AA mismatch (červená) a CC mismatch (zelená) cílovou sekvencí.

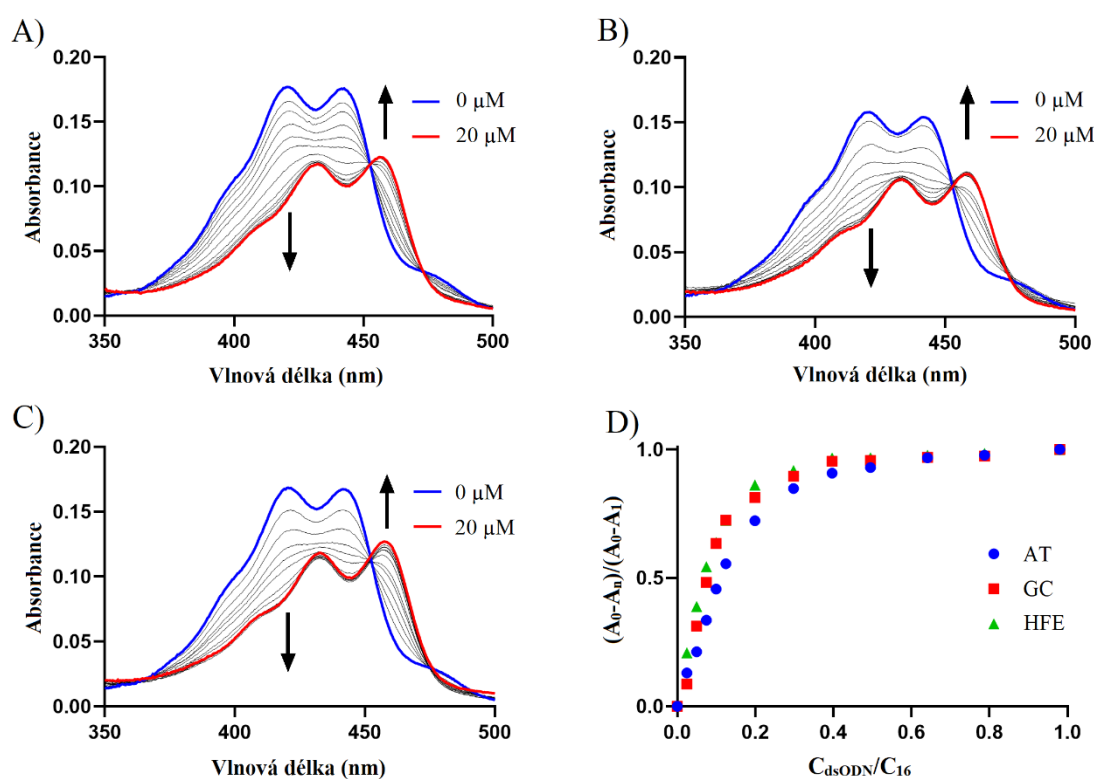
Porovnání výsledků grafů různých sond (Graf 6, Graf 7, Graf 8, Graf 9) přineslo tyto výsledky. Porovnání meltingových křivek u všech použitých modifikovaných sond s produktem 16 a nemodifikovaných sond ukazuje mírné zvýšení  $T_m$  u modifikovaných sond (grafy A). Posun  $T_m$  je více patrný u (grafu B), kde je vidět ostrý posun meltingového píku. U (Graf 7, Graf 8, Graf 9) má tento meltingový pík požadovaný tvar. (Graf 6) má však tento pík atypický. To vypovídá o přítomnosti rušivých nečistot či tvorbě sekundární struktury modifikované sondy. U grafů C jsou patrné rozdíly  $T_m$  mezi duplexem modifikované sondy s komplementární sekvencí a duplexem modifikované sondy s AA a CC mismatchem. Pro zachování schopnosti diskriminačního mismatche je nutná nižší  $T_m$  duplexu než u komplementárního vlákna. Toho bylo docíleno u všech použitých sond. U (grafů D) je zobrazen ostrý přechod



meltingových píků s požadovaným tvarem. U (Graf 6), je tvar atypický. To je způsobeno ze stejného důvodu jako u (Graf 6, B).

## 5.5. Spektrofotometrická titrace

UV viditelná spektrofotometrie je nejběžnějším a nejvhodnějším způsobem studia interakcí mezi malými látkami a nukleovými kyselinami. Molekuly obsahující aromatické skupiny mohou interagovat se strukturou dvojité šroubovice DNA, proto lze interakci mezi nimi zkoumat podle změn absorpčních spekter před reakcí a po ní.<sup>71</sup>



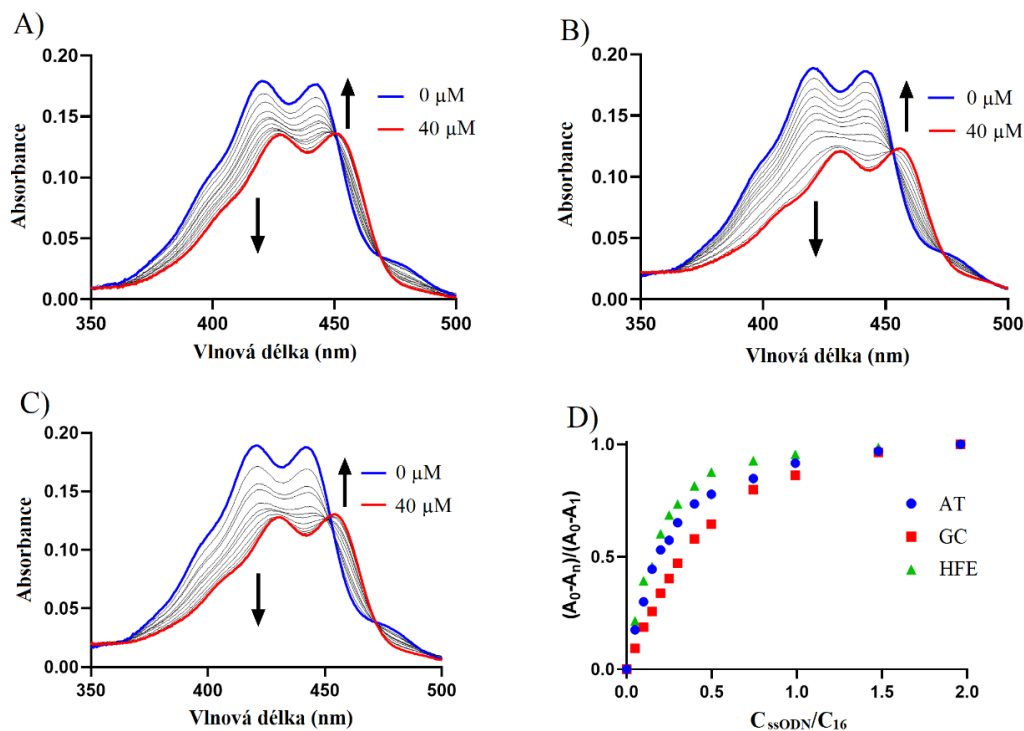
Graf 10. Záznam spektrofotometrické titrace produktu 16 s dsODN.

A) Závislost vlnové délky na absorbanci u dsODN bohatých na AT báze.

B) Závislost vlnové délky na absorbanci u dsODN bohatých na GC báze.

C) Závislost vlnové délky na absorbanci u dsODN se stejným množstvím AT a GC báze.

D) Změna absorbance při 417 nm na koncentraci. Zeleně dsODN, modře AT a červeně GC.



Graf 11. Záznam spektrofotometrické titrace produktu 16 s ssODN.

A) Závislost vlnové délky na absorbanci u ssODN bohatých na AT báze.

B) Závislost vlnové délky na absorbanci u ssODN bohatých na GC báze.

C) Závislost vlnové délky na absorbanci u ssODN se stejným množstvím AT a GC báze.

D) Změna absorbance při 417 nm na koncentraci. Zeleně ssODN, modře AT a červeně GC.

S produktem **16** byla provedena spektrofotometrická titrace. Nejprve byl do roztoku produktu **16** postupně přidáván roztok dsODN poté byl stejný postup zopakován se ssDNA různě bohatých na určité báze. Na (Graf 10)A-C je viditelný posun absorpčního maxima k červené části spektra (tzn. dochází k bathmochromnímu a hypochromnímu posunu spektra). Z grafu je patrný výrazný posun u duplexu bohatého na GC báze graf C, který je o mnoho výraznější než u duplexu bohatého na AT báze, což vypovídá o interkalaci, mezi GC bohaté úseky bází DNA, produkt **16** má k nim vyšší afinitu. Změna absorbance v závislosti na koncentraci je nejvíce patrná u přirozeně se vyskytující dsODN (HFE) a GC bohatých úseků dsODN a nejméně u AT obohacených dsODN.

Při testování ssODN (Graf 11) nebyl patrný stejný fenomén afinity produktu **16** na GC báze jako byl pozorován u dsDNA. Změna absorbance v závislosti na koncentraci je nejvíce patrná u přirozeně se vyskytující ssODN (HFE) a AT bohatých úseků ssODN a nejméně u GC obohacených ssODN.

## 6. Závěr

Tato diplomová práce si kladla za cíl přípravu akridinových derivátů sloužících jako stabilizátory duplexů sond s cílovou sekvencí. Deriváty akridinu mají schopnost interkalovat se do dvoušroubovice DNA, a tak zvýšit pevnost vazby mezi řetězci DNA. Zvýšení pevnosti vazby mezi řetězci DNA se promítne do zvýšené teploty tání duplexu, z čehož vychází i následná aplikace derivátů akridinu jako termálních stabilizátorů duplexu DNA sondy s cílem.<sup>71</sup> V této práci byly připraveny deriváty akridinu, které byly substituovány 6-(azidohexan)aminem a *N,N*-dimethylaminoethylamin. Azid byl potřebný k vytvoření kovalentní vazby s ODN sondou pomocí click chemie přes DBCO. Amidický vodík vytváří vodíkové můstky přes molekulu vody na fosfátovou skupinu mezi příslušným guanosinem a sousedním nukleosidem, čímž upevňuje látku ve dvoušroubovici. Bazická aminoskupina pak umožňuje interakci s fosfátovými skupinami. Byla připravena série derivátů akridinu **A**, které mají v pozici 9 akridinu navázaný *N,N*-dimethylaminoethylamin a v pozici 4 navázaný 6-(azidohexan)amin jako amid karboxylové kyseliny. Díky negativním výsledkům paralelně vytvořeného derivátu **9**, který je strukturně podobný látce **8**, nebyla látka ve finále již ani otestována. U látky **9** nebyl pozorován vliv na termostabilitu duplexu sondy s cílovou sekvencí, pravděpodobně kvůli nevytvoření zpevňujících vodíkových můstků. Z toho důvodu byla připravena série látek **B**, která měla v pozici 9 navázaný 6-(azidohexan)amin. Zároveň v pozici 4 a 5 měla navázaný *N,N*-dimethylaminoethylamin, jako diamid. U této látky se projevil očekávaný účinek. Při spektrofotometrické titraci byla u dsODN prokázána vyšší afinita produktu **16** k úsekům bohatým na GC báze, kam interkalovala. U ssODN nebyl tento fenomén zvýšené afinity pozorován. Zvýšení termostability duplexu modifikované ODN sondy s produktem **16** a cílem, bylo pozorováno u všech použitých sond. Byla pozorována zvýšená teplota tání duplexu s cílovou sekvencí v rozmezí 5-8 °C. U modifikované sondy K 16-13/7 byl pozorován atypický tvar meltingových píků. To je pravděpodobně způsobeno přítomností nečistot či tvorbou dimerů. U modifikovaných sond produktem **16** byla prokázána rozlišovací schopnost nutná k hodnocení SNP. U všech sond došlo k zvýšení  $T_m$  duplexu sondy s cílovou sekvencí.  $T_m$  mismatche byla vždy výrazně nižší než u komplementární sekvence.

## 7. Seznam citované literatury

---

- <sup>1</sup> Martinez, R.; Chacon-Garcia, L.; The Search of DNA-Intercalators as Antitumoral Drugs: What it Worked and What did not Work, *Curr. Med. Chem.*, **2005**, *12*, 127–151.
- <sup>2</sup> Danesi, R.; et al.; Pharmacokinetic-pharmacodynamic relationships of the anthracycline anticancer drugs, *Clin. Pharmacokinet.*, **2002**, *41* (6), 431-444.
- <sup>3</sup> Chen, L.; et al.; Study on the interaction between human serum albumin and a novel bioactive acridine derivative using optical spectroscopy, *Luminescence*, **2010**, *26*, 172–177.
- <sup>4</sup> Xie, Y.; et al.; Photoassisted degradation of dyes in the presence of Fe<sup>3+</sup> and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> under visible irradiation, *J. Photochem. Photobiol. A.*, **2000**, *136*, 235–240.
- <sup>5</sup> Fonte, M.; et al.; Acridine-Based Antimalarials—From the Very First Synthetic Antimalarial to Recent Developments, *Molecules*, **2021**, *26*, 600.
- <sup>6</sup> Denny, A.W.; Acridine Derivatives as Chemotherapeutic Agents, *Curr. Med. Chem.*, **2002**, *9* (18), 1655-1665.
- <sup>7</sup> Lima Serafim, V.; et al.; New thiophene-acridine compounds: Synthesis, antileishmanial activity, DNA binding, chemometric, and molecular docking studies, *Chem. Biol. Drug Des.*, **2018**, *91*, 1141–1155.
- <sup>8</sup> Silva, M. de M.; et al. Correlation between DNA/HSA-interactions and antimalarial activity of acridine derivatives: Proposing a possible mechanism of action, *J. Photochem. Photobiol., B.*, **2018**, *189*, 165–175.
- <sup>9</sup> Csuk, R.; et al.; Synthesis of monomeric and dimeric acridine compounds as potential therapeutics in Alzheimer and Prion disease, *Chem. Life Sci.*, **2009**, *342*, 699-709.
- <sup>10</sup> Topozada, M.; Ismail, A. Intrauterine administration of drugs for termination of pregnancy in the second trimester, *Baillière's Clinical Obstetrics and Gynaecology*, **1990**, *4* (2), 327–349.
- <sup>11</sup> Clementi, M.; Weber-Schöndorfer, C.; Gastro-intestinal medications, hypolipidemic agents and spasmolytics. In: Christof Schaefer, Paul Peters, Richard K. Miller (Ed.) *In Drugs During Pregnancy and Lactation*; s. 93–113. 3<sup>rd</sup> Ed. Elsevier 2015. ISBN 978-0-12-0408078-2
- <sup>12</sup> Koelzer, S. C.; et al.; Self-induced illegal abortion with Rivanol<sup>®</sup>: A medicolegal-toxicological case report, *Forensic Sci. Int.*, **2016**, *268*, 18–22.

---

<sup>13</sup> Zhuang, Y.; et al.; Mifepristone may shorten the induction-to-abortion time for termination of second-trimester pregnancies by ethacridine lactate, *Contraception*, **2012**, *85*, 211-214.

<sup>14</sup> Mei, Q.; et al.; Effectiveness of mifepristone in combination with ethacridine lactate for second trimester pregnancy termination, *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.*, **2014**, *178*, 12-15.

<sup>15</sup> Tyson, R. R.; et al.; Use of aminoacridine in infected wounds, *The American Journal of Surgery*, **1954**, *88*, 606–608.

<sup>16</sup> Russell, A. D.; Bacterial adaptation and resistance to antiseptics, disinfectants and preservatives is not a new phenomenon, *Journal of Hospital Infection*, **2004**, *57*, 97–104.

<sup>17</sup> Aviado, D. M.; Chemotherapy of *Plasmodium berghei*, *Exp. Parasitol.*, **1969**, *25*, 399–482.

<sup>18</sup> Delaye, C.; et al.; Access and use of quinacrine (mepacrine) in the treatment of resistant giardiasis, *Infectious Diseases Now*, **2021**.

<sup>19</sup> Hallal, R.; et al.; Acriflavine targets oncogenic STAT5 signaling in myeloid leukemia cells, *J. Cell. Mol. Med.*, **2020**, *24*, 10052–10062.

Fan, J.; et al.; Acriflavine suppresses the growth of human osteosarcoma cells through apoptosis and autophagy, *Tumor Biol.*, **2014**, *35*, 9571–9576.

<sup>21</sup> Dekervel, J.; et al.; Acriflavine Inhibits Acquired Drug Resistance by Blocking the Epithelial-to-Mesenchymal Transition and the Unfolded Protein Response, *Clin. Transl. Oncol.*, **2017**, *10*, 59–69.

<sup>22</sup> Mathé, G.; et al.; AIDS therapy with two, three or four agent combinations, applied in short sequences, differing from each other by drug rotation. I. First of two parts: a phase I trial equivalent, concerning five virostatics: AZT, ddI, ddC, acriflavine and an ellipticine analogue, *Biomed. Pharmacother.*, **1996**, *50*, 220–227.

<sup>23</sup> Cain, B. F.; et al.; Structure-activity relationships for thiolytic cleavage rates of antitumor drugs in the 4'-(9'acridinylamino)methanesulfonanilide series, *Molec. Pharmac.*, **1976**, *12*, 1027.

<sup>24</sup> Cassileth, P. A.; et al.; Amsacrine: A review, *Leuk. Res.*, **1986**, *10*, 1257-1265.

<sup>25</sup> Joshi, M.; et al.; Polymerase chain reaction: methods, principles and application, *Int. J. Biomed. Res.* **2010**, *2 (1)*, 81-97.

- <sup>26</sup> Hrstka R.; et al.; Vývoj metod založených na PCR a jejich aplikace v onkologickém výzkumu a praxi, *Klinická onkologie*, **2014**, 27 (1), 68-74.
- <sup>27</sup> Galluzzi, L.; et al.; Real-time PCR applications for diagnosis of leishmaniasis, *Parasites Vectors*, **2018**, 11, 273.
- <sup>28</sup> Navarro, E.; et al.; Real-time PCR detection chemistry, *Clin. Chim. Acta*, **2015**, 439, 231-250.
- <sup>29</sup> Ranasinghe, R. T.; et al.; Fluorescence based strategies for genetic analysis, *Chem. Commun.*, **2005**, 5487.
- <sup>30</sup> Förster, Th.; Transfer Mechanisms of Electronic Excitation Energy, *Radiat. Res., Suppl.*, **1960**, 2, 326.
- <sup>31</sup> Zhang, X.; et al.; Förster resonance energy transfer (FRET)-based biosensors for biological applications, *Biosens. Bioelectron.*, **2019**, 138, 111314.
- <sup>32</sup> Jain, A.; et al.; Fluorescence Lifetime Spectroscopy and Imaging of Visible Fluorescent Proteins. In: Vendonck P. (Ed.) *Advances in Biomedical Engineering*; s. 147-176. Ed. Elsevier 2009. ISBN 978-0-444-53075-2
- <sup>33</sup> Paris, C.; et al.; Zip nucleic acids are potent hydrolysis probes for quantitative PCR, *Nucleic Acids Res.*, **2010**, 38, 95.
- <sup>34</sup> Kutuyavin, I. V.; 3'-Minor groove binder-DNA probes increase sequence specificity at PCR extension temperatures, *Nucleic Acids Res.*, **2000**, 28, 655-661.
- <sup>35</sup> Egholm, M.; et al.; Peptide nucleic acids (PNA). Oligonucleotide analogs with an achiral peptide backbone, *J. Am. Chem. Soc.*, **1992**, 114, 1895-1897.
- <sup>36</sup> Roloff, A.; et al.; The role of reactivity in DNA templated native chemical PNA ligation during PCR, *Bioorg. Med. Chem.*, **2013**, 21, 3458-3464.
- <sup>37</sup> Singh, S. K.; et al.; LNA (locked nucleic acids): synthesis and high-affinity nucleic acid recognition, *Chem. Commun.*, **1998**, 455-456.
- <sup>38</sup> Kauppinen, S.; et al.; Locked nucleic acid (LNA): High affinity targeting of RNA for diagnostics and therapeutics, *Drug Discovery Today: Technol.*, **2005**, 2, 287-290.
- <sup>39</sup> Simeonov, A.; Single nucleotide polymorphism genotyping using short, fluorescently labeled locked nucleic acid (LNA) probes and fluorescence polarization detection, *Nucleic Acids Res.*, **2002**, 30, 91-991.

- <sup>40</sup> Weidmann, M.; et al.; Improved LNA probe-based assay for the detection of African and South American yellow fever virus strains, *J. Clin. Virol.*, **2010**, *48*, 187–192.
- <sup>41</sup> Pons, B.; et al.; Online Synthesis of Diblock Cationic Oligonucleotides for Enhanced Hybridization to their Complementary Sequence, *ChemBioChem*, **2006**, *7*, 1173–1176.
- <sup>42</sup> Giskeødegård, G. F.; et al.; Spermine and Citrate as Metabolic Biomarkers for Assessing Prostate Cancer Aggressiveness, *PLoS ONE*, **2013**, *8*, 62375.
- <sup>43</sup> Erdem, A.; et al.; Zip nucleic acid based single-use biosensor for electrochemical detection of Factor V Leiden mutation, *Sens. Actuators, B*, **2019**, *288*, 634–640.
- <sup>44</sup> Noir, R.; et al.; Oligonucleotide–Oligospermine Conjugates (Zip Nucleic Acids): A Convenient Means of Finely Tuning Hybridization Temperatures, *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, *130*, 13500–13505.
- <sup>45</sup> Neidle, S.; DNA minor-groove recognition by small molecules (up to 2000), *Nat. Prod. Rep.*, **2001**, *18*, 291–309.
- <sup>46</sup> Afonina, I.; Efficient priming of PCR with short oligonucleotides conjugated to a minor groove binder, *Nucleic Acids Res.*, **1997**, *25*, 2657–2660.
- <sup>47</sup> Alniss, H. Y.; Thermodynamics of DNA Minor Groove Binders, *J. Med. Chem.*, **2018**, *62*, 385–402.
- <sup>48</sup> Khan, G. S.; et al.; Chemistry of DNA minor groove binding agents, *J. Photochem. Photobiol., B*, **2012**, *115*, 105–118.
- <sup>49</sup> Gray, E. R.; et al.; Minor groove binder modification of widely used TaqMan hydrolysis probe for detection of dengue virus reduces risk of false-negative real-time PCR results for serotype 4, *J. Virol. Methods*, **2019**, *268*, 17–23.
- <sup>50</sup> Afonina, I. A.; et al.; Minor Groove Binder-Conjugated DNA Probes for Quantitative DNA Detection by Hybridization-Triggered Fluorescence, *BioTechniques*, **2002**, *32*, 940–949.
- <sup>51</sup> Belousov, Y. S.; et al.; Single nucleotide polymorphism genotyping by two colour melting curve analysis using the MGB Eclipse™ Probe System in challenging sequence environment, *Hum. Genomics*, **2004**, *1* (3), 209–217.
- <sup>52</sup> Lukhtanov, E. A.; et al.; Novel DNA probes with low background and high hybridization-triggered fluorescence, *Nucleic Acids Res.*, **2007**, *35*, 30.

- 
- <sup>53</sup> Mukherjee, A.; et al.; On the Molecular Mechanism of Drug Intercalation into DNA: A Simulation Study of the Intercalation Pathway, Free Energy, and DNA Structural Changes, *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, *130*, 9747–9755.
- <sup>54</sup> Lerman, L. S.; Structural considerations in the interaction of DNA and acridines, *J. Mol. Biol.*, **1961**, *3*, 1-124.
- <sup>55</sup> Hendry, L. B.; et al.; Small molecule intercalation with double stranded DNA: Implications for normal gene regulation and for predicting the biological efficacy and genotoxicity of drugs and other chemicals, *Mutat. Res., Fundam. Mol. Mech. Mutagen.*, **2007**, *623*, 53–71.
- <sup>56</sup> Sirajuddin, M.; et al.; Drug–DNA interactions and their study by UV-Visible, fluorescence spectroscopies and cyclic voltametry, *J. Photochem. Photobiol., B*, **2013**, *124*, 1–19.
- <sup>57</sup> Dougherty, G.; et al.; Physico-chemical probes of intercalation, *Int. J. Biochem.*, **1984**, *16*, 1179–1192.
- <sup>58</sup> Shinozuka, K.; et al.; A novel multifunctionally labelled DNA probe bearing an intercalator and a fluorophore, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1994**, *1*, 1377-1378.
- <sup>59</sup> Jarikote, D. V.; et al.; New cyanine dyes as base surrogates in PNA: Forced intercalation probes (FIT-probes) for homogeneous SNP detection, *Bioorg. Med. Chem.*, **2008**, *16*, 114-125.
- <sup>60</sup> Yamane, A.; Magiprobe: A novel fluorescence quenching-based oligonucleotide probe carrying a fluorophore and an intercalator(II), *Nucleic Acids Symp. Ser.*, **2001**, *1*, 181-182.
- <sup>61</sup> Yamane, A.; MagiProbe: a novel fluorescence quenching-based oligonucleotide probe carrying a fluorophore and an intercalator, *Nucleic Acids Res.*, **2002**, *30*, 97–997.
- <sup>62</sup> Jiang, Z.; et al.; Study on Intercalations between Double-Stranded DNA and Pyrene by Single-Molecule Force Spectroscopy: Toward the Detection of Mismatch in DNA, *Langmuir*, **2010**, *26*, 13773–13777.
- <sup>63</sup> Berman, H. M.; et al.; The Interaction of Intercalating Drugs with Nucleic Acids, *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.*, **1981**, *10*, 87–114.
- <sup>64</sup> Ranasinghe, R. T.; et al.; Linear fluorescent oligonucleotide probes with an acridine quencher generate a signal upon hybridisation, *Chem. Commun.*, **2001**, *1*, 1480–1481.
- <sup>65</sup> Cardullo, R. A.; et al.; Detection of nucleic acid hybridization by nonradiative fluorescence resonance energy transfer, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **1988**, *85*, 8790-8794.



<sup>66</sup> Babu, Y. R.; et al.; Design and Synthesis of Quinazolinone Tagged Acridones as Cytotoxic Agents and Their Effects on EGFR Tyrosine Kinase, *Arch. Pharm.*, **2014**, *347*, 624–634.

<sup>67</sup> Rewcastle, G. W.; et al.; The Synthesis of Substituted 9-Oxoacridan-4-carboxylic Acids; Part 3. The Reaction of Methyl Anthranilates with Diphenyliodonium-2-carboxylates, *Synthesis*, **1985**, *2*, 220–222.

<sup>68</sup> Móczár, I.; et al.; Synthesis and fluorescence studies of novel bis(azacrown ether) type chemosensors containing an acridinone unit, *Tetrahedron*, **2010**, *66*, 2953–2960.

<sup>69</sup> Goodell, J. R.; et al.; Synthesis and evaluation of acridine-and acridone-based anti-herpes agents with topoisomerase activity, *Bioorg. Med. Chem.*, **2006**, *14*, 5467–5480.

<sup>70</sup> Cuenca, F.; et al.; Design, synthesis and evaluation of 4,5-di-substituted acridone ligands with high G-quadruplex affinity and selectivity, together with low toxicity to normal cells, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2009**, *19*, 5109–5113.

<sup>71</sup> Hajian, R.; et al.; Spectrophotometric Studies on the Thermodynamics of the ds-DNA Interaction with Irinotecan for a Better Understanding of Anticancer Drug-DNA Interactions, *J. Spectrosc.*, **2013**, *1*, 8.