

UNIVERZITA KARLOVA

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy



## Výzkum látek ovlivňujících teplotu tání oligonukleotidových sond

Dizertačná práca



**Mgr. Filip Kostelanský**

Vedúci dizertačnej práce:

prof. PharmDr. Petr Zimčík, Ph.D.

Odborný konzultant:

doc. PharmDr. Miroslav Miletín, Ph.D.

Hradec Králové 2023



*„Vyhlasujem, že táto práca je mojim pôvodným autorským dielom, ktoré som vypracoval samostatne (pod vedením svojho školiteľa a konzultanta). Všetka literatúra a ďalšie zdroje, z ktorých som pri spracovávaní čerpal, sú uvedené v zozname použitej literatúry a v práci sú riadne citované. Práca nebola využitá na získanie iného alebo rovnakého titulu.“*

V Hradci Králové, január 2023

.....  
Mgr. Filip Kostelanský



Na tomto mieste by som sa rád poďakoval svojmu školiteľovi prof. PharmDr. Petrovi Zimčíkovi, Ph.D., a doc. PharmDr. Miroslavovi Miletínovi, Ph.D. ktorí sa starali o odborné vedenie behom môjho postgraduálneho štúdia. Ďalej by som sa rád poďakoval Doc. PharmDr. Veronike Novákovej, Ph.D. za cenné rady a pomoc pri spisovaní publikácií.

Neuveriteľná vďaka patrí členom našej výskumnej skupiny AzaPc Group, a to menovito PharmDr. Jurovi Demuthovi, Ph.D., Mgr. Miške Kolářovej, Mgr. Lucke Kočiščákovej, PharmDr. Honzovi Kollárovi, Ph.D. a ďalším členom našej katedry, a to menovito Mgr. Ondrovi Horáčkovi, PharmDr. Lukemu Lochmanovi, Ph.D. a PharmDr. Nele Váňovej, Ph.D. pretože vďaka nim bolo moje doktorské štúdium znesiteľnejšie. Nemalá vďaka patrí aj všetkým ostatným pracovníkom našej Katedry farmaceutickej chémie a farmaceutickej analýzy, a to za odbornú pomoc a pohodové pracovné prostredie.

Poďakovanie patrí aj docentovi Assoc. Prof. Sergejovi Borisovovi, Ph.D. za umožnenie krátkej stáže na „Graz University of Technology“ (Graz, Rakúsko).

Obrovské poďakovanie patrí aj môjmu priateľovi Lukášovi a mojej rodine za pochopenie a psychickú oporu počas môjho dlhoročného štúdia.

Táto dizertačná práca vznikla za finančnej podpory týchto grantov či programov:

Grantová agentura Univerzity Karlovy (GAUK: 994218)

Primus, Univerzita Karlova (Primus/20/SCI/013)

Grantová agentura České republiky (GAČR: 17-19094S, 21-14919J)

Technologická agentura České republiky (TAČR: TH03010251)

Specifický vysokoškolský výzkum (SVV 260547)

# Abstrakt

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra: Katedra farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy

Autor: **Mgr. Filip Kostelanský**

Školiteľ: **prof. PharmDr. Petr Zimčík, Ph.D.**

Dizertačná práca: **Výzkum látek ovlivňujících teplotu tání oligonukleotidových sond**

Real-time PCR je široko využívanou metódou v rôznych oblastiach výskumu ako sú napr. biomedicína, mikrobiológia, veterinárna medicína, atď. Kvantifikácia génovej expresie, alelická diskriminácia či detekcia sekvenčných variantov sú novými a zaujímavými možnosťami pre PCR. Diskriminácia bodových zmien pri použití dlhších sond nie je optimálna. Rozdiel teploty topenia medzi plne komplementárnym duplexom a duplexom obsahujúcim bodovú zmenu je v prípade použitia dlhších sond zanedbateľný.

Na druhej strane, krátke oligonukleotidové (ON) sondy sú vhodné na dobrú diskrimináciu bodových zmien. Krátke ON sondy majú nízke teploty topenia. Tento problém je možné vyriešiť pripojením látok viažucich sa do malého žliabku DNA (minor groove binder, MGB), či iných látok, ktoré majú silnú interakciu s DNA ako napríklad interkalačné farbivá či polyamíny. Táto konjugácia môže zvýšiť teplotu topenia duplexov krátkych ON sond.

Táto práca bola venovaná syntéze akridín-4-karboxamidových interkalátorov, ktoré boli pripravené v niekoľkých sériách. Na účely porovnania účinnosti boli modifikované látky Hoechst 33258 a spermín. Bola skúmaná stabilizácia akridínovými stabilizátormi a ich štruktúra bola optimalizovaná, za účelom zlepšenia schopnosti termálnej stabilizácie DNA duplexov. Štúdium niekoľkých sérií akridínov odhalilo, že optimálna stabilizácia akridínmi bola dosiahnutá pri použití sekundárnej karboxamidovej skupiny nesúcej menšiu bázickú skupinu viazanú prostredníctvom dvojuhlíkatého reťazca. Niekoľko vysoko-aktívnych akridínov bolo následne konjugovaných s krátkymi sondami (13 alebo 18 báz; navrhnutými ako časť HFE génu) pomocou copper-free click chémie v pozíciách 7 a/alebo 13. Bolo preukázané, že teplota topenia ( $T_m$ ) ich duplexov bola v prípade najlepšej kombinácie zvýšená až o takmer 9 °C. Štúdium interakcie akridínov s jednovláknovou a dvojláknovou DNA poukázali na schopnosť interagovať s oboma typmi DNA a súčasne bola potvrdená vyššia afinita akridínov k GC- bohatej sekvencii v porovnaní s AT- bohatou sekvenciou. Bola skúmaná schopnosť sond konjugovaných s akridínmi diskriminovať sekvenčné varianty HFE génu na reálnom modeli s nezmenenou formou, tzv. wild type, H63D C>G a S65C A>T sekvenčnými variantmi. Bolo potvrdené, že akridín samotný môže slúžiť ako fluorescenčný reportér a súčasne stabilizátor DNA duplexu umožňujúci diskrimináciu plne komplementárných duplexov od duplexov obsahujúcich bodové zmeny.

# Abstract

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Kralove

Department: Department of Pharmaceutical Chemistry and Pharmaceutical Analysis

Author: **Mgr. Filip Kostelanský**

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

Doctoral Thesis: **Investigation of the compounds influencing the melting temperature of oligonucleotide probes**

Real-time PCR is widely used method in various research fields like biomedicine, microbiology, veterinary medicine, etc. Quantification of gene expression, allelic discrimination and alteration detection are new and interesting application possibilities. Mismatch discrimination is not optimal when longer probes are used. Melting temperature difference between fully complementary duplex and mismatched duplex is negligible in the case of longer probes.

The short oligodeoxynucleotide (ODN) probes, on the other hand, are suitable for good discrimination of single nucleotide variants. However, these probes suffer from low melting temperatures. Adding minor groove binders (MGB), or other substances, which can strongly interact with DNA such as intercalating dyes or polyamines, can increase the melting temperature of short probes duplexes.

In this work, several series of acridine-4-carboxamide intercalators were synthesized. MGB (Hoechst 33258) and polyamine (spermine) were modified and used for comparison purposes. Stabilisation by these compounds was investigated and structure of acridine stabilisators was optimized to improve the ability to increase thermal stabilisation. The study of large series of acridines revealed that optimal stabilisation was achieved upon decoration of acridine by secondary carboxamide carrying sterically not demanding basic function bound through a two-carbon linker. Several highly active acridines were attached to short probes (13 or 18 bases; designed as a part of HFE gene) by copper-free click chemistry into positions 7 and/or 13 and proved to increase the melting temperature ( $T_m$ ) of their duplexes by almost 9 °C for the best combination. The acridines interact with both single- and double-stranded DNAs with substantially preferred interaction for the latter. The study of interaction suggested higher affinity of the acridines toward the GC- than AT-rich sequences. Good discrimination of two mutated variants was shown in practical application with HFE gene (wild type, H63D C>G and S65C A>T mutations). Acridine itself can also serve as a fluorophore and also allows discrimination of the matched duplexes from those with point mutations in probes labelled only with acridine.

# Obsah

1	Zoznam použitých skratiek.....	12
2	Formulácia problematiky a cieľ práce.....	15
3	Prehľad súčasného stavu riešenej problematiky .....	17
3.1	PCR .....	17
3.2	Detekcia a kvantifikácia nukleových kyselín v PCR aplikácii .....	18
3.2.1	Fluoroforom značené ON.....	18
3.3	Genotypizácia (alelická diskriminácia - detekcia známych zmien DNA) .....	24
3.3.1	Alelovo špecifická hybridizácia.....	24
3.3.2	Alelovo špecifická primerová extenzia.....	25
3.3.3	Alelovo špecifická ligácia.....	25
3.3.4	Alelovo špecifické invazívne štiepenie (Invasive cleavage).....	26
3.4	Zvýšenie termálnej stability krátkych DNA duplexov .....	26
3.4.1	Modifikácie DNA zvyšujúce stabilitu duplexu .....	27
3.4.2	Syntéza ON reťazca .....	34
3.4.3	Chrániace skupiny .....	37
3.4.4	Značenie ON.....	38
4	Výsledky a diskusia.....	43
4.1	Syntéza.....	43
4.1.1	Syntéza derivátov antranilovej kyseliny a derivátov akridónu .....	44
4.1.2	Syntéza 1. a 2. série akridínových derivátov .....	45
4.1.3	Syntéza 3. série akridínových derivátov („obrátené deriváty“) .....	47
4.1.4	Syntéza 4. série akridínových derivátov.....	47
4.1.5	Syntéza 5. série akridínových derivátov.....	48
4.1.6	Syntéza modifikovaného spermínu a Hoechstu 33258.....	50
4.2	Testovanie vplyvu akridínov, polyamínov a MGB na $T_m$ duplexu voľne v roztoku 51	
4.3	Príprava modifikovaných ON sond.....	53
4.3.1	Modifikácia ON sond na pevnej fáze.....	53
4.3.2	Deprotekcia a čistenie modifikovaných ON sond .....	55
4.4	Štúdiá interakcie akridínových derivátov s DNA.....	57
4.5	Štúdie termálnej denaturácie sond značených FAM a stabilizátorom .....	59
4.6	Štúdium interkalácie akridínu 2 viazaného na ON pomocou absorpčných a fluorescenčných meraní .....	64
5	Záver.....	67
6	Experimentálna časť.....	68



6.1	Syntéza .....	68
6.1.1	2-(fenylamino)benzoová kyselina (13) .....	68
6.1.2	2,2'-iminodibenzoová kyselina (14).....	69
6.1.3	metyl 9-oxo-9,10-dihydroakridín-4-karboxylát (15).....	69
6.1.4	metyl 9-[(6-azidohexyl)amino]akridín-4-karboxylát (16) .....	69
6.1.5	9-[(6-azidohexyl)amino]akridín-4-karboxylová kyselina (17) .....	70
6.1.6	N-(6-azidohexyl)akridín-9-amín (1) .....	70
6.1.7	Obecný postup 1.....	71
6.1.8	Obecný postup 2.....	71
6.1.9	9-[(6-azidohexyl)amino]-N-[2-(dimetylamino)etyl]akridín-4-karboxamid (2)...	71
6.1.10	<i>tert</i> -butyl (2-{9-[(6-azidohexyl)amino]akridín-4-karboxamido}etyl)karbamát (3- <i>Boc</i> ).....	71
6.1.11	bis(2-metyl-2-propanyl)                      {[(2-{9-[(6-azidohexyl)amino]akridín-4-karboxamido}etyl)amino]metylylidén}biskarbamát (4- <i>Boc</i> ) .....	71
6.1.12	N-(2-aminoetyl)-9-[(6-azidohexyl)amino]akridín-4-karboxamid dihydrochlorid (3) .....	72
6.1.13	9-[(6-azidohexyl)amino]-N-(2-guanidinoetyl)akridín-4-karboxamid dihydrochlorid (4) .....	72
6.1.14	9-[(6-azidohexyl)amino]-N-[3-(dimetylamino)propyl]akridín-4-karboxamid (5).....	72
6.1.15	9-[(6-azidohexyl)amino]-N-[2-(pyrrolidin-1-yl)etyl]akridín-4-karboxamid (6) .....	73
6.1.16	9-[(6-azidohexyl)amino]-N-[2-(dietylamino)etyl]akridín-4-karboxamid (7) 73	
6.1.17	9-[(6-azidohexyl)amino]-N-[2-(piperidín-1-yl)etyl]akridín-4-karboxamid (8) .	73
6.1.18	9-[(6-azidohexyl)amino]-N-butylakridín-4-karboxamid (9) .....	73
6.1.19	9-[(6-azidohexyl)amino]-N-[2-(dimetylamino)etyl]-N-metylakridín-4-karboxamid (10).....	74
6.1.20	{9-[(6-azidohexyl)amino]akridín-4-yl}{4-metyl piperazín-1-yl}metanón (11) ..	74
6.1.21	9-[(6-azidohexyl)amino]-N,N-bis[2-(dietylamino)etyl]akridín-4-karboxamid (12).....	74
6.1.22	N-(6-azidohexyl)-9-oxo-9,10-dihydroakridín-4-karboxamid (18) .....	74
6.1.23	metyl 9-[[2-(dimetylamino)etyl]amino]akridín-4-karboxylát (19) .....	75
6.1.24	9-[[2-(dimetylamino)etyl]amino]akridín-4-karboxylát sodný (20) .....	75
6.1.25	N-(6-azidohexyl)-9-[[2-(dimetylamino)etyl]amino]akridín-4-karboxamid (21) .....	76
6.1.26	metyl 9-[[2-(dietylamino)etyl]amino]akridín-4-karboxylát (22).....	76

6.1.27	9-[[2-(diethylamino)etyl]amino]akridín-4-karboxylát sodný (23).....	76
6.1.28	N-(6-azidohexyl)-9-[[2-(diethylamino)etyl]amino]akridín-4-karboxamid (24) . .....	76
6.1.29	2-[(2-karboxyfenyl)amino]izoftalová kyselina (25) .....	77
6.1.30	9-oxo-9,10-dihydroakridín-4,5-dikarboxylová kyselina (26) .....	77
6.1.31	dimetyl 9-oxo-9,10-dihydroakridín-4,5-dikarboxylát (27) .....	77
6.1.32	dimetyl 9-aminoakridín-4,5-dikarboxylát (28) .....	78
6.1.33	dimetyl 9-[(6-azidohexyl)amino]akridín-4,5-dikarboxylát (29).....	78
6.1.34	9-[(6-azidohexyl)amino]akridín-4,5-dikarboxylát sodný (30) .....	79
6.1.35	<i>N</i> <sup>4</sup> , <i>N</i> <sup>5</sup> -bis[2-(dimethylamino)etyl]-9-oxo-4a,9,9a,10-tetrahydroakridín-4,5- dikarboxamid (31) .....	79
6.1.36	9-[(6-azidohexyl)amino]- <i>N</i> <sup>4</sup> , <i>N</i> <sup>5</sup> -bis[[2-(dimethylamino)etyl]akridín-4,5- dikarboxamid (32) .....	79
6.1.37	2-[(2-karboxyfenyl)amino]-3-jódbenzoová kyselina (33).....	80
6.1.38	metyl 5-jód-9-oxo-9,10-dihydroakridín-4-karboxylát (34).....	80
6.1.39	metyl 5-(6-hydroxyhex-1-ýn-1-yl)-9-oxo-9,10-dihydroakridín-4-karboxylát (35) .....	80
6.1.40	metyl 5-(6-azidohex-1-ýn-1-yl)-9-oxo-9,10-dihydroakridín-4-karboxylát (36) .....	81
6.1.41	metyl 9-amino-5-(6-azidohex-1-ýn-1-yl)akridín-4-karboxylát (37) .....	81
6.1.42	metyl 9-amino-5-(4,5,6,7-tetrahydro-[1,2,3]triazolo[1,5-a]pyridín-3- yl)akridín-4-karboxylát (37-1).....	81
6.1.43	5-(6-azidohex-1-ýn-1-yl)-N-[2-(dimethylamino)etyl]-9-oxo-9,10- dihydroakridín-4-karboxamid (38) .....	82
6.1.44	metyl 9-amino-5-jódaakridín-4-karboxylát (39) .....	82
6.1.45	9-amino-N-[2-(dimethylamino)etyl]-5-jódaakridín-4-karboxamid (40).....	83
6.1.46	9-amino-5-(6-azidohex-1-ýn-1-yl)-N-[2-(dimethylamino)etyl]akridín-4- karboxamid (41) .....	83
6.1.47	9-amino-N-[2-(dimethylamino)etyl]-5-(6-hydroxyhex-1-ýn-1-yl)akridín-4- karboxamid (42) .....	83
6.1.48	9-amino-N-[2-(dimethylamino)etyl]-5-(6-hydroxyhexyl)akridín-4-karboxamid (43) .....	84
6.1.49	metyl 5-(6-hydroxyhexyl)-9-oxo-9,10-dihydroakridín-4-karboxylát (45)....	84
6.1.50	metyl 5-(6-azidohexyl)-9-oxo-9,10-dihydroakridín-4-karboxylát (46) .....	84
6.1.51	metyl 9-amino-5-(6-azidohexyl)akridín-4-karboxylát (47).....	85
6.1.52	9-amino-5-(6-azidohexyl)-N-[2-(dimethylamino)etyl]akridín-4-karboxamid (44) .....	85
6.1.53	<i>N</i> <sup>1</sup> -(3-amíniopropyl)- <i>N</i> <sup>4</sup> -(3-azidopropyl)bután-1,4-diamínium trifluoroocát (48) .....	86

6.1.54	2'-{4-[(6-azidohehyl)oxy]fenyl}-6-(4-metyl)piperazín-1-yl)-1H,3'H-2,5'- bibenzo[d]imidazol (49) .....	86
6.2	Modifikácia ON na pevnej fáze a purifikácia modifikovaného ON.....	86
6.2.1	Obecný postup modifikácie a purifikácie ON sond .....	86
6.3	Testovanie .....	87
6.3.1	Test aktivity akridínov voľne v roztoku.....	87
6.3.2	Na fluorescencii založená štúdia termálnej denaturácie sond značených FAM a akridínom .....	87
6.3.3	Na absorpcii založená štúdia termálnej denaturácie sond značených FAM a akridínom .....	87
6.3.4	Na fluorescencii založená štúdia termálnej denaturácie sond modifikovaných akridínom.....	88
6.3.5	Štúdia interakcie akridínu 2 s ssDNA a dsDNA .....	88
6.3.6	Job's plot.....	88
6.3.7	Štúdium hybridizácie sondy modifikovanej akridínom 2 (L_7_2*) .....	89
6.3.8	Štúdium teplotne závislých zmien emisného spektra sondy L_7_2* .....	89
6.3.9	Meltingová analýza amplifikovaného templátu HFE génu .....	89
7	Publikované vedecké práce, podané patenty, prezentácie vedeckých výsledkov .....	90
8	Granty, výskumné stáže a ocenenia .....	92
8.1	Granty .....	92
8.2	Výskumné stáže .....	92
9	Zoznam použitej literatúry .....	93
10	Zoznam príloh.....	103
10.1	Príloha 1.....	103
10.2	Príloha 2.....	104
10.3	Príloha 3.....	105
10.4	Príloha 4.....	106
10.5	Príloha 5.....	106
10.6	Príloha 6.....	107
10.7	Príloha 7.....	108

# 1 Zoznam použitých skratiek

AA	kyselina octová (z angl. acetic acid)
AAC	azid-alkýn cykloadície
ACN	acetonitril
AMA	zmes hydroxidu amónneho a metylamínu v objemovom pomere 1:1
BCN	bicyklononýn, (1 <i>R</i> ,8 <i>S</i> ,9 <i>S</i> )bicyklo[6.1.0]non-4-ýn-9-ylmetyl
BHQ1	black hole quencher 1
CDPI	6-(6-(6-(3,6,7,8-tetrahydropyrolo[3,2- <i>e</i> ]indol-2-karbonyl)-3,6,7,8-tetrahydropyrolo[3,2- <i>e</i> ]indol-2-karbonyl)-3,6,7,8-tetrahydropyrolo[3,2- <i>e</i> ]indol
CpG	deoxycytidín-fosfát-deoxyguanozín
CPG	sklenená pevná fáza s kontrolovanou pórovitosťou (z angl. controlled pore glass)
ctDNA	calf thymus DNA
CuAAC	meďou katalyzované azid-alkýn cykloadície (z angl. copper-catalyzed azide-alkyne cycloadditions)
Cy5	cyanín 5
DBCO	dibenzoazacyklooktýn, dibenzo[ <i>b,f</i> ]azacyklookt-4-ýn
DBCO-dT	DBCO deoxytymidín
DEE	dietyléter
DETA	dietyléntriamín, <i>N</i> -(2-aminoetyl)-1,2-etándiamín
DIBO	dibenzocyklooktýn, dibenzo[ <i>b,f</i> ]cyklookt-4-ýn
DIMAC	6,7-dimetoxyazacyklookt-4-ýn
DMC	dichlórmetán
DMF	dimetylformamid
DMSO	dimetylsulfoxid
DMT	dimetoxytrityl
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dsAT	dvojvláknová AT-bohatá DNA, (z angl. double stranded AT)
dsDNA	dvojvláknová DNA, (z angl. double stranded DNA)
dsGC	dvojvláknová GC-bohatá DNA, (z angl. double stranded GC)
dsHFE	dvojvláknová HFE DNA, (z angl. double stranded HFE)
EAC	etylacetát
EB	etídium bromid

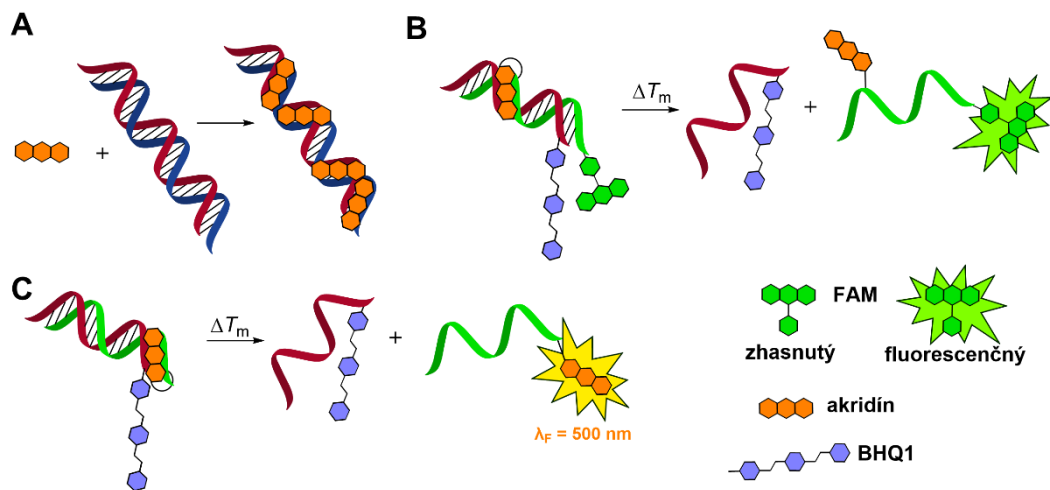
EtOH	etanol
FAM	fluoresceín
FRET	Försterov rezonančný prenos energie (z angl. Förster resonance energy transfer)
HBTU	(1 <i>H</i> -Benzotriazol-1-yloxy)(dimetylamino)- <i>N,N</i> -dimetylmutánimínium hexafluorofosfát
HEX	hexán
HFE	ľudský gén pre homeostatický proteín regulátora železa
HPLC	vysokoučinná kvapalinová chromatografia (z angl. high performance liquid chromatography)
HRMS	hmotnostná spektrometria s vysokým rozlíšením (z angl. high resolution mass spectrometry)
LNA	zamknuté nukleové kyseliny (z angl. locked nucleic acids)
MALDI-TOF	matricou asistovaná laserová desorpcia/ionizácia (z angl. matrix assisted laser desorption ionization – time of flight mass spectrometry)
MeOH	metanol
MF	mobilná fáza
MGB	látka viažuca sa do malého žliabku DNA (z angl. minor groove binder)
MsCl	metánsulfonylchlorid
NHS	<i>N</i> -hydroxysukcinimid
NK	nukleová kyselina
ON	oligonukleotid (oligoribonukleotid, oligodeoxyribonukleotid)
PAH	polycyklické aromatické uhľovodíky (z angl. polycyclic aromatic hydrocarbons)
PCR	polymerázová reťazová reakcia (z angl. polymerase chain reaction)
PNA	peptidové nukleové kyseliny (z angl. peptide nucleic acids)
SAR	vzťah medzi štruktúrou a účinkom (z angl. structure-activity relationship)
SBE	jednonukleotidová extenzia (z angl. single base extension)
SNV	jednonukleotidový variant (z angl. single nucleotide variant/variants - SNVs)
SPAAC	pnutím podporené azid-alkýn cykloadície (z angl. strain promoted azide-alkyne cycloaddition)
ssAT	jednovláknová AT-bohatá DNA (z angl. single stranded AT)
ssDNA	jednovláknová DNA (z angl. single stranded DNA)
ssGC	jednovláknová GC-bohatá DNA (z angl. single stranded GC)
ssHFE	jednovláknová HFE DNA (z angl. single stranded HFE)

TAMRA	tetrametylrodamín, 2-[3,6-bis(dimetylamino)-9-xanténiumyl]benzoát
TBTA	tris(benzyltriazolylmetyl)amín, 1-(1-Benzyl-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-yl)- <i>N,N</i> -bis[(1-benzyl-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-yl)metyl]metánamín
tBuOH	<i>terc</i> -butanol
TCA	trichlóroctová kyselina (z angl. trichloroacetic acid)
TEA	trietylamín
TEAA	trietylamónium acetát
TEPA	tetraetylémpentamín, <i>N</i> -(2-Aminoetyl)- <i>N'</i> -{2-[(2-aminoetyl)amino]etyl}-1,2-etándiamín
TETA	trietyléntetramín, <i>N,N'</i> -bis(2-aminoetyl)-1,2-etándiamín
TFA	trifluóroctová kyselina (z angl. trifluoroacetic acid)
THPTA	Tris(3-hydroxypropyltriazolylmetyl)amín, 3,3',3''-[Nitrilotris(metylén-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4,1-diyl)]tri(1-propanol)
THF	tetrahydrofurán
TLC-MS	hmotnostná spektrometria z tenkovrstvovej chromatografie (z angl. thin layer chromatography – mass spectrometry)
$T_m$	teplota topenia
Tris-HCl	Trometamol hydrochlorid, 2-amino-2-(hydroxymetyl)-1,3-propándiol hydrochlorid
ZNA	Zip nukleové kyseliny (z angl. Zip nucleic acids)
$\Delta T_m$	zmena teploty topenia

## 2 Formulácia problematiky a cieľ práce

V súčasnej dobe výskytu veľmi infekčného vírusu SARS-CoV-2 nadobudla potreba rutinej, časovo a technicky menej náročnej, detekcie zmien v genetickom materiáli, nielen spomínaného vírusu, nový rozmer. Bolo vyvinutých niekoľko techník detekcie zmien a jednonukleotidových variantov (single nucleotide variants, SNVs). Obecne možno SNVs detegovať štyrmi základnými mechanizmami, a to alelovo špecifickou hybridizáciou, alelovo špecifickou primerovou extenziou, alelovo špecifickou ligáciou oligonukleotidov a alelovo špecifickým invazívnym štiepením. Pravdepodobne najviac využívanou metódou v súčasnosti je alelická diskriminácia založená na alelovo špecifickej PCR využívajúcej alelovo špecifickú hybridizáciu a alelovo špecifickú primerovú extenziu. Pri tomto type detekcie je dôležité aby použité primery či sondy boli schopné dostatočne dobre diskriminovať SNVs. Dobrá schopnosť diskriminácie je závislá hlavne na dvoch faktoroch, a to zložení použitej sekvencie a dĺžke použitej sekvencie. Dĺžka sekvencie oligonukleotidových (ON) sond ovplyvňuje výslednú termálnu stabilitu ich komplementárnych duplexov. S predlžujúcou sa sekvenciou rastie aj termálna stabilita jej komplementárneho duplexu. Preto sú duplexy dlhších ON sond stabilné aj pri vyšších teplotách (70 °C) používaných v PCR. Nevýhodou dlhších sond je ich nižšia schopnosť diskriminácie SNVs. Krátke sondy naopak majú výbornú schopnosť diskriminácie SNVs, avšak ich veľkou nevýhodou je nízka teplota topenia, vďaka ktorej nie sú použiteľné v PCR.

Cieľom tejto dizertačnej práce bolo pripraviť sériu látok schopných zvýšiť termálnu stabilitu duplexov DNA. Na zvýšenie termálnej stability krátkych ON sond som sa rozhodol použiť akridíny, ktoré boli pripravené v niekoľkých sériách. Tieto akridíny boli testované na schopnosť zvyšovať termálnu stabilitu duplexu DNA voľne v roztoku (Obrázok 1A). Z výsledkov týchto testov bolo možné určiť vzťahy medzi štruktúrou a účinkom (SAR). Následne bolo pripravených niekoľko sond modifikovaných nádejnými akridínmi a pre účely porovnania aj s polyamínom a látkou viažucou sa do malého žliabku DNA. Tieto sondy boli čistené pomocou semipreparatívnej HPLC. So sondami boli následne robené štúdie termálnej denaturácie, ktoré poskytli informácie o stabilizácii duplexov týchto sond (Obrázok 1B). Sondy boli ďalej testované na schopnosť diskriminovať SNVs. Bola študovaná interakcia akridínu s jednovláknovou (single strand DNA, ssDNA) a dvojláknovou (double strand DNA, dsDNA) DNA. Súčasne bola študovaná interakcia s AT a GC bohatými sekvenciami. Sondy modifikované len akridínom boli nakoniec testované na možnosť použitia akridínu súčasne ako reportéru a látky zvyšujúcej teplotu topenia duplexov týchto sond (Obrázok 1C).



Obrázok 1. Obecné schémy (A) interakcie akridínu s DNA, (B) termálnej denaturácie sond značených FAM a konjugovaných s akridínom, (C) termálnej denaturácie sond konjugovaných s akridínom.



### 3 Prehľad súčasného stavu riešenej problematiky

Polymerázová reťazová reakcia (polymerase chain reaction, PCR) je metóda umožňujúca amplifikáciu špecifického úseku DNA pomocou dvoch ON primerov a termostabilnej DNA-polymerázy (*Taq*-polymeráza).<sup>1, 2</sup> V dnešnej dobe je táto metóda, hlavne v modifikácii real-time PCR, často využívaná v rôznych oblastiach (biomedicína, mikrobiológia, veterinárna medicína, farmakológia, biotechnológia, toxikológia)<sup>3, 4</sup> a v rôznych aplikáciách (génová expresia, genotypizácia, klonovanie, sekvenovanie, mutagenéza, analýza metylovanej DNA).

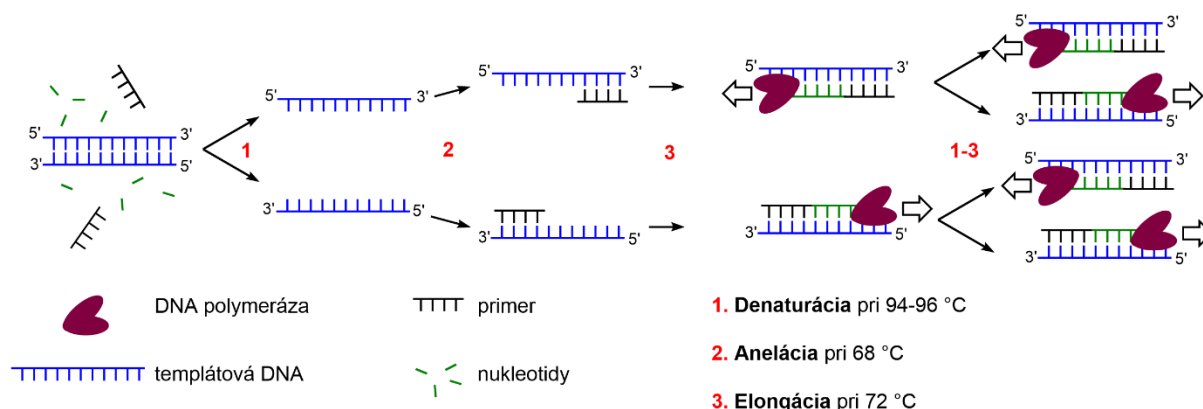
PCR je neoceniteľným nástrojom pri genotypizácii a sekvenovaní DNA a umožňuje detekciu SNV alebo alelickú diskrimináciu.<sup>4</sup> V súčasnosti sa pri real-time PCR používajú dva spôsoby detekcie množstva amplifikovanej DNA. Detekcia prebieha za pomoci interkalačných farbív viažucich sa do dsDNA alebo za použitia fluorescenčne značených ON, tzv. sond.<sup>3</sup> Real-time PCR analýza pomocou interkalačných farbív je ekonomicky výhodnejšia v porovnaní s analýzou pomocou fluorescenčne značených sond. Naopak veľkou výhodou fluorescenčne značených sond v real-time PCR je špecifickosť detekcie vyplývajúca z vlastností DNA – sonda hybridizuje len ku komplementárnej sekvencii. Dĺžka sekvencie sondy je závislá na detekčnom systéme (rôzny obsah AT a GC párov vplýva na termálnu stabilitu). Kratšie ON sondy majú v porovnaní s dlhšími ON sondami výhodu lepšieho rozlíšenia mutácií, no na úkor nižšej termálnej stability.

#### 3.1 PCR

Polymerázová reťazová reakcia (PCR) slúži na amplifikáciu (zmnoženie) určitého úseku DNA, ohraničeného primermi (krátke, synteticky pripravené úseky DNA komplementárne k 3'-koncom templátovej DNA) *in vitro*. Na tento účel je potrebné do PCR reakcie dodať DNA polymerázu, nukleozidtrifosfáty a primery. Templátovú DNA je na začiatku potrebné denaturovať zahriatím na 95 °C (Obrázok 2). Pri ochladení na cca 45 – 70 °C dochádza k hybridizácii primerov (anelácia, Obrázok 2) na jednotlivé vlákna templátovej DNA. DNA polymeráza nasadá na duplex templátovej DNA s primerom a syntetizuje reťazec komplementárny k templátovej DNA v smere 5'-3', väčšinou pri 72 °C (elongácia, Obrázok 2).

PCR bola vyvinutá K. Mullisom a spolupracovníkmi pred viac ako tridsiatimi piatimi rokmi.<sup>5</sup> Mullisova metóda bola založená na použití Klenow fragmentu DNA polymerázy *Escherichia coli*, v kombinácii s krátkymi ON sekvenciami – primermi, ktoré ohraničovali amplifikovaný úsek DNA, nukleozidtrifosfátmi a polymerázovým pufrom. Amplifikácia DNA prebiehala za použitia cyklického zahrievania a chladenia. Nevýhodou Klenow fragmentu bola jeho denaturácia počas zahrievania a nutnosť jeho pridávania do reakcie po každom cykle, čo zvyšovalo možnosť kontaminácie. Neskôr bol Klenow fragment nahradený termostabilnou *Taq* polymerázou izolovanou z *Thermus aquaticus*,<sup>6</sup> a v súčasnosti sú v PCR štandardne používané termostabilné polymerázy. Na detekciu amplifikovanej DNA bola nutná hybridizácia,<sup>7</sup> gélová elektroforéza, HPLC či kapilárna elektroforéza. Tieto metódy analýzy amplifikovanej DNA sú časovo náročné, prácne a ťažko automatizovateľné. Veľkým krokom vpred bolo použitie etídium bromidu (EB), ktorý umožnil pomocou fluorescencie sledovanie priebehu PCR v reálnom čase. EB bol hneď vzápätí nahradený dnes široko využívaným farbivom SYBR Green I. Veľký prielom, vďaka špecifickosti hybridizácie, nastal zavedením fluorescenčne značených TaqMan® sond,<sup>8</sup> ktoré vychádzali z princípu TaqMan® sond značených rádioaktívnou značkou 5'- $\gamma$ -<sup>32</sup>P popísaných o dva roky skôr.<sup>9</sup> Tento prielom odštartoval vývoj množstva ďalších fluorescenčne značených sond (Quenched FRET Probes, MolecularBeacons, Scorpions atď.) založených na odlišných mechanizmoch detekcie, tzn. za akých okolností dôjde k produkcii fluorescenčného signálu. Obecne možno povedať, že

hybridizácia (vysoko špecifický dej) je detegovaná zmenou fluorescence spôsobenou práve väzbou (hybridizáciou) ON sondy k cieľovej sekvencii.



Obrázok 2. Schematické znázornenie priebehu PCR reakcie.

## 3.2 Detekcia a kvantifikácia nukleových kyselín v PCR aplikácii

V súčasnosti existujú dva spôsoby detekcie v PCR amplifikovanej DNA – použitie farbív viažucich sa na dsDNA (umožňujú detekciu špecificky a nešpecificky amplifikovanej DNA, viz ďalej kapitola Interkalátory) alebo použitie fluorescenčne značených ON.

### 3.2.1 Fluoroforom značené ON

Reportér (fluorofor) je molekula, ktorá po ožiarení excitačným svetlom určitej vlnovej dĺžky toto svetlo (energiu) absorbuje a prechádza do excitovaného stavu. Reportéry sa vyznačujú tým, že pri prechode z excitovaného stavu do stavu základného vyžarujú energiu vo forme fluorescence. Emitované svetlo má všeobecne nižšiu energiu a vyššiu vlnovú dĺžku ako svetlo excitačné. Emitované svetlo môže byť zachytené akceptorom, ktorý je buď fluorescenčnou alebo nefluorescenčnou molekulou. Po absorpcii emitovaného svetla môže teda dôjsť buď k fluorescencii akceptoru (fluorescenčný akceptor) alebo v prípade nefluorescenčnej molekuly (zhášača) k strate absorbovanej svetelnej energie vo forme tepla. Zhášač môže vytvárať s reportérom aj heterodiméry, u ktorých dochádza k statickému zhášaniu fluorescence.

Fluoroforom značené ON môžeme rozdeliť na primery a sondy. Fluorescenčné primery boli vyvinuté aby v PCR nahradili dovtedy používané rádioizotopmi značené sondy.<sup>10</sup> Následne boli fluoroformi značené ON aplikované ako detekčné činidlo hybridizácie nukleových kyselín.<sup>11</sup> Prvé fluoroformi značené sondy použité priamo v PCR reakcii fungovali na princípe TaqMan® sond (viz nižšie).<sup>8</sup> Výhodou týchto sond je homogénny systém, bez nutnosti post-PCR analýzy a s ňou spojených komplikácií ako sú falošne pozitívne výsledky z carry-over kontaminácie, falošne negatívne výsledky z neúspešných reakcií alebo neštandardizovaných reakčných podmienok.<sup>12</sup> Uzavretím PCR systému, kde dochádza k amplifikácii a súčasne k detekcii amplikónov, bolo možné analýzu automatizovať a zrýchliť.

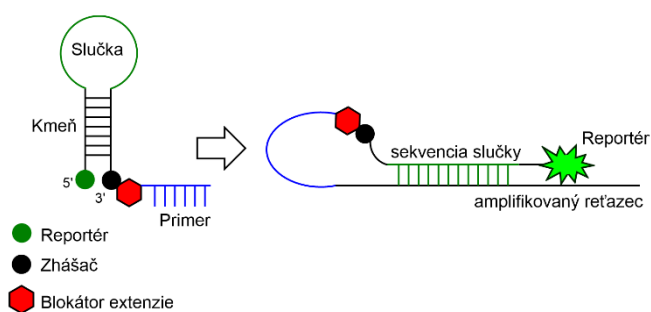
#### 3.2.1.1 Fluorescenčne značené primery

Fluorescenčne značené primery plnia súčasne úlohu primerov aj sond. Merať fluorescenciu týchto primerov je možné počas elongačnej fázy.

##### 3.2.1.1.1 Vlásokové primer-sondy

Vlásokové primer-sondy majú vlásokovú štruktúru, tj. na 3' a 5'-koncoch obsahujú krátke, k sebe komplementárne sekvencie. Tie hybridizáciou vytvoria slučku (loop) a kmeň (stem). Vlásokové primer-sondy sú značené fluorescenčným reportérom a môžu byť značené aj zhášačom.

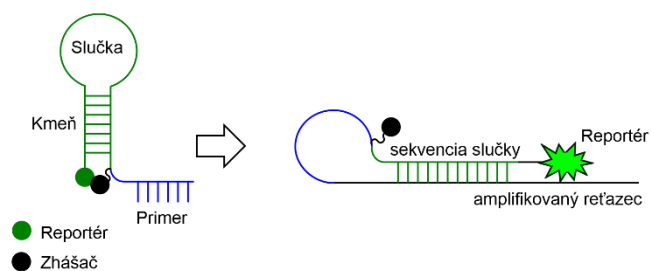
### Scorpion® primer-sondy



Obrázok 3. Scorpion primer-sondy. Schematické znázornenie princípu použitia.

Scorpion® primer-sondy sa skladajú z dvoch častí, primeru a fluoroformi značenej vlásenkovej sondy, spojených linkerom (Obrázok 3). Hexaetylénglykolový linker spája 3'-koniec vlásenkovej sondy s 5'-koncom primeru. Linker funguje zároveň ako blokátor extenzie sondy. Vlásoková sonda je značená na 3'-konci zhášačom a na 5'-konci reportérom. Vytvorením kmeňa sa oba fluorofory dostávajú do blízkej vzdialenosti a dochádza k zhášaniu fluorescence reportéra. Primer-sonda sa viaže na cieľ pomocou svojej primerovej časti. Následne *Taq* polymeráza syntetizuje od 3'-konca primeru vlákno komplementárne k cieľovej sekvencii. Slučka vlásenkovej sondy obsahuje špecifickú sekvenciu, ktorá je komplementárna k novo-syntetizovanej sekvencii DNA. Po druhej denaturácii a anelácii komplementárna sekvencia slučky hybridizuje k cieľovej sekvencii novo-syntetizovaného vlákna DNA, dochádza k rozvoľneniu kmeňa vlásenky, oddialeniu reportéra od zhášača a fluorescence. Nástup fluorescence je rýchly vďaka termodynamicky preferovanej tvorbe intramolekulárneho duplexu.<sup>13</sup> Fluorescencia je úmerná počtu novo vznikajúcich amplikónov. Výhodami vyplývajúcimi zo štruktúry Scorpion primer-sond (prítomnosť kmeňa) sú vysoký nárast fluorescence v prípade amplifikácie, nízka fluorescence pozadia (sondy v tzv. „OFF“ stave), nízka tvorba dimérov primerov a nárast fluorescence bez nutnosti degradácie sondy.

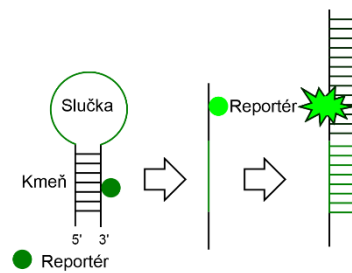
### Amplifluor™



Obrázok 4. Amplifluor™ primer-sondy. Schematické znázornenie princípu použitia.

Amplifluor™ primer-sondy fungujú na podobnom princípe ako Scorpion® primer-sondy. Sú tvorené jedným vláknom DNA, ktoré je možné rozdeliť na dve časti, primerovú a sondovú časť. 3'-koniec slúži ako primer. 5'-koniec obsahuje sekvenciu komplementárnu k sekvencii nasledujúcej za primerovou časťou primer-sondy (Obrázok 4).<sup>12</sup> Podobne, ako Scorpion® primer-sondy, využíva princíp slučky a kmeňa zavedený sondami Molecular Beacons.<sup>14</sup> Toto usporiadanie má totožné výhody ako Scorpion® primer-sondy.

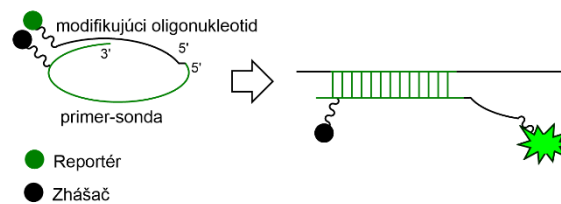
## LUX™



Obrázok 5. LUX™ primer-sondy. Schematické znázornenie princípu použitia.

LUX™ (Light-Upon-eXtension) funguje na princípe vlásenkovej primer-sondy.<sup>15</sup> Rozdielom oproti predchádzajúcim primer-sondám je neprítomnosť zhášača (Obrázok 5). 3'-koniec slúži ako primer. Kmeň vlásenkovej primer-sondy je na 3'-konci zakončený G-bázou, ktorá tvorí pár báz s C-bázou 5'-konca. Fluorescenčný reportér je viazaný v blízkosti 3'-konca, kde vďaka blízkosti k vyššie spomínanému páru báz dochádza k interakcii s týmto párom a fluorescencia reportéra je zhášaná.<sup>16</sup> Fluorescencia reportéra rastie po denaturácii (rozvoľnení vlásenkovej štruktúry) a dosahuje maximum pri inkorporácii primeru do dsDNA. Nárast fluorescencie je v porovnaní s duálne značenými primer-sondami alebo sondami nižší (osemnásobný pri laboratórnej teplote). Výhody sú rovnaké ako u Scorpion® alebo Amplifluor™.

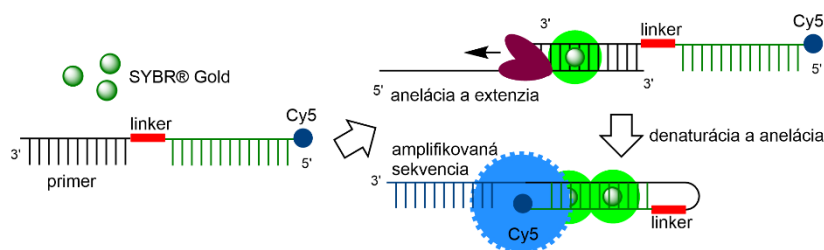
## Cyclicons



Obrázok 6. Cyklikóny. Schematické znázornenie princípu použitia.

Cyklikóny sú primer-sondy tvorené dvoma reťazcami DNA spojenými buď 5'-5'-koncami alebo 3'-3'-koncami. Jeden reťazec predstavuje primer-sondu a druhý reťazec predstavuje tzv. „modifikujúci oligonukleotid“. Reportér je viazaný na voľný koniec modifikujúceho ON (Obrázok 6). Zhášač je viazaný na jednu z tymínových báz primer-sondy. Modifikujúci ON sa viaže na koniec primer-sondy (3' / 5'). Touto väzbou sa dostáva reportér a zhášač do blízkej vzdialenosti a dochádza k zhášaniu fluorescencie reportéra pomocou FRET. V PCR je možné použiť ako primer-sondy len cyklikóny spojené 5'-5'-koncami. Cyklikón sa v prítomnosti cieľa naviaže primer-sondou na cieľovú sekvenciu a dochádza k rozvoľneniu sekundárnej štruktúry a extenzii primer-sondy DNA polymerázou. Výhodou je nižšia cena cyklikónov. Extenzia cyklikónov spojených 3'-3'-koncami DNA polymerázou nie je možná, preto tieto cyklikóny slúžia ako fluorescenčné sondy, podobne ako Molecular Beacons.<sup>17</sup>

## Angler®



Obrázok 7. Angler® primer-sondy. Schematické znázornenie princípu použitia.

Angler® primer-sondy sú založené na podobnom systéme ako Scorpion primer-sondy. Angler® primer-sondy sa skladajú z dvoch častí spojených hexaetylenglykolovým reťazcom. Prvá časť slúži ako primer, druhá časť slúži ako sonda komplementárna k amplifikovanej sekvencii primeru (Obrázok 7). Angler® primer-sondy na rozdiel od Scorpion primer-sond neobsahujú zhášač a ako reportér je použité farbivo cyanine 5 (Cy5). Do PCR reakcie je nutné dodať farbivo SYBR® Gold, ktoré má dve funkcie, slúži na detekciu nešpecificky amplifikovanej DNA a ako donor energie pre Cy5. Po amplifikácii sa sondová časť Angler® primer-sondy naviaže na cieľ a vytvorí duplex, do ktorého sa interkaluje SYBR® Gold. SYBR® Gold po interkalácii do duplexu deteguje jeho prítomnosť fluorescenciou a súčasne, v prípade naviazania sondovej časti k amplikónu, pomocou FRET excituje Cy5. Výhodou je súčasná detekcia špecificky (Cy5) a nešpecificky (SYBR® Gold) amplifikovanej DNA.<sup>18</sup>

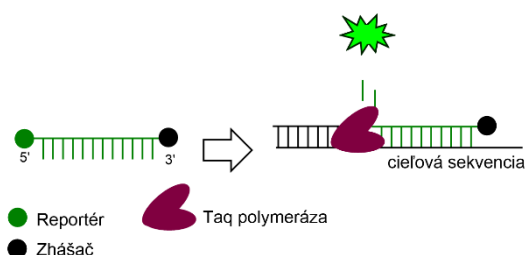
### 3.2.1.2 Sondy

Sondy sú ON značené fluorescenčným reportérom. Môžu obsahovať aj zhášač. Je možné ich rozdeliť do dvoch skupín, a to hydrolytické a hybridizačné sondy.

#### 3.2.1.2.1 Hydrolytické sondy

Hydrolytické sondy sú ON značené reportérom a zhášačom. Využívajú 5'–3' exonukleázovú aktivitu *Taq* polymerázy, vďaka ktorej dôjde k dostatočnému priestorovému oddeleniu reportéra od zhášača. Týmto spôsobom dochádza k produkcii fluorescenčného signálu.

## TaqMan®



Obrázok 8. TaqMan® sondy. Schematické znázornenie princípu použitia.

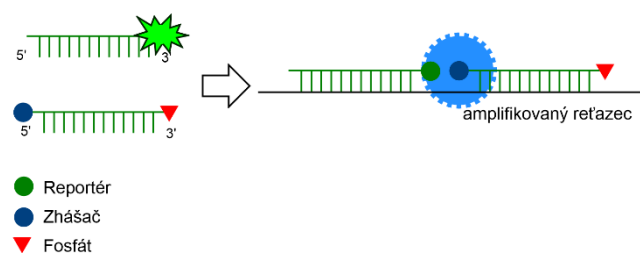
Princíp TaqMan® sond bol publikovaný Hollandovou *et al.* a využíval 5'–3' exonukleázovú aktivitu *Taq* polymerázy v kombinácii s 5'- $\gamma$ -<sup>32</sup>P značenou sondou.<sup>9</sup> Nedlho na to, Lee *et al.* publikovali fluorescenčne značené sondy so zhášačom na princípe TaqMan®.<sup>8</sup> V súčasnosti používané TaqMan® sondy sú značené reportérom na 5'-konci a zhášačom na 3'-konci (Obrázok 8). Sonda je v roztoku vo forme tzv. náhodného kľbka, kde sú reportér a zhášač dostatočne blízko aby dochádzalo ku kontaktnému/statickému zhášaniu fluorescencie reportéra. Po hybridizácii sondy na cieľovú sekvenciu DNA *Taq* polymeráza svojou 5'–3' exonukleázovou aktivitou degraduje sondu. Degradáciou sondy sa reportér a zhášač oddelia a dochádza k vzniku fluorescenčného

signálu.<sup>8, 19</sup> Tento proces sa opakuje pri každom cykle PCR. Výhodou tohto typu sond je ich jednoduchý dizajn a syntéza. V praxi patria k najviac využívaným sondám.

### 3.2.1.2.2 Hybridizačné sondy

Fluoroforom značené sondy, hybridizujúce k cieľovej DNA, boli vyvinuté za účelom nahradenia dovtedy používaných rádioizotopom značených sond.<sup>20</sup> Hybridizačné sondy sú založené na zhášaní fluorescence reportéra zhášačom pomocou statického zhášania alebo FRET. Fluorescenčný signál je meraný počas anelácie alebo extenzie. Intenzita fluorescence je priamo úmerná počtu komplementárnych amplikónov. Hybridizačné sondy na rozdiel od hydrolytických sond umožňujú meranie meltingových kriviek, a poskytujú tak dodatočné informácie.

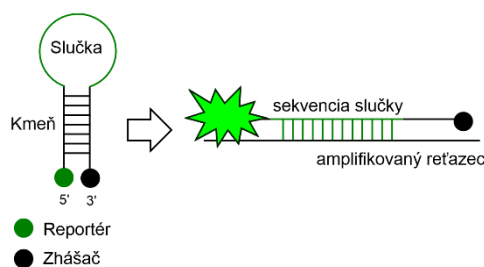
#### Quenched FRET probes



Obrázok 9. Binárne sondy. Schematické znázornenie princípu použitia.

Quenched FRET sondy pozostávajú z dvoch oddelených reportérom a zhášačom značených ON.<sup>20</sup> Prvý ON je značený reportérom na 3'-konci. Druhý ON je značený zhášačom na 5'-konci a fosfátom na 3'-konci (Obrázok 9).<sup>21</sup> ON sa viažu na cieľovú sekvenciu za sebou v tesnej blízkosti tak, že dochádza k FRET prenosu energie z reportéra prvého ON na zhášač druhého ON. V závislosti na dizajne binárnych sond môže byť reportér na 3'-konci jedného ON alebo na 5'-konci druhého ON. Veľkou výhodou binárnych sond je ich jednoduchý dizajn, syntéza a jednoduchá optimalizácia PCR podmienok. Spoločne s TaqMan® sondami patria k najviac využívaným sondám v praxi. Tieto sondy boli využité v mojej dizertačnej práci.

#### Molecular Beacons

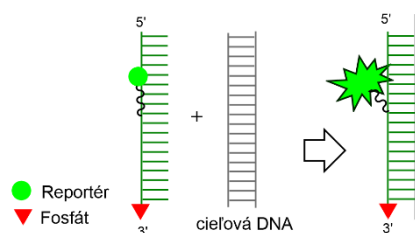


Obrázok 10. Molecular Beacons. Schematické znázornenie princípu použitia.

Molecular Beacons majú podobne ako vlásenkové primer-sondy vlásenkovú štruktúru, tj. obsahujú kmeň a slučku. Kmeň je tvorený 5 – 7 párami báz. Slučku tvorí 18 – 30 báz komplementárnych k cieľovej sekvencii. Molecular Beacons sú značené reportérom na 5'-konci a zhášačom na 3'-konci (Obrázok 10).<sup>14</sup> Toto usporiadanie vedie k statickému zhášaniu a veľmi nízkej fluorescence „OFF“ stavu. Sonda sa viaže na cieľovú sekvenciu slučkovou časťou počas anelácie, kedy dôjde k rozvoľneniu kmeňa a oddialeniu reportéra od zhášača. Po naviazaní sondy na cieľovú sekvenciu dochádza až k stonásobnému zvýšeniu fluorescence.<sup>22</sup> Podobne ako u predchádzajúcich hybridizačných sond je fluorescence úmerná počtu amplikónov. Výhodou Molecular Beacons je ich vysoká špecifickosť väzby na cieľ. V prítomnosti cieľových sekvencií

obsahujúcich chybné párované bázy (bodové zmeny) sa Molecular Beacons nenaviažu na tento cieľ pretože u nich preváži energeticky výhodnejšia intramolekulárna tvorba kmeňa.

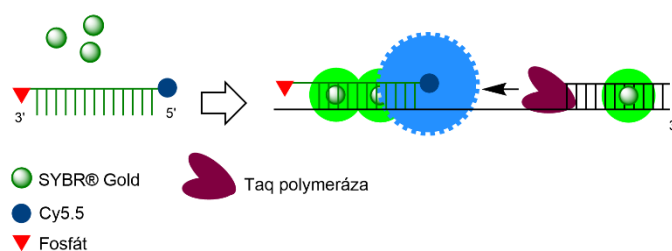
### HyBeacon™



Obrázok 11. HyBeacon™. Schematické znázornenie princípu použitia.

HyBeacon™ sú ON značené fluorescenčným reportérom vo vnútri sekvencie ON. HyBeacon™ neobsahujú zhášač. Na 3'-koniec je viazaný fosfát (prípadne oktámiol), ktoré blokuje extenziu sondy počas PCR reakcie (Obrázok 11).<sup>23</sup> HyBeacon™, podobne ako Molecular Beacons, majú voľne v roztoku nízku fluorescenciu vďaka zhášaniu fluorescence reportéra primárne purínovými bázami.<sup>24</sup> Po naviazaní na cieľovú sekvenciu sa reportér vzdiali od nukleových báz a fluorescencia sa zvýši. Výhodami tohto systému sú možnosť meltingovej analýzy, jednoduchosť dizajnu a relatívne nízka cena.

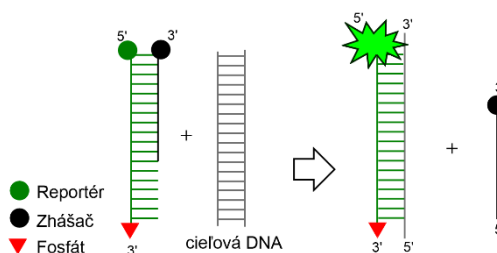
### ResonSense®



Obrázok 12. ResonSense®. Schematické znázornenie princípu použitia.

ResonSense® sondy sú založené na rovnakom princípe ako Angler® primer-sondy. Na rozdiel od Angler® sú ResonSense® sondy zložené z jedného reťazca DNA značeného Cy5/5.5. Na 3'-koniec je viazaný oktámiol, fosfát alebo iný blokátor extenzie (Obrázok 12).<sup>18, 25, 26</sup> Sonda je v roztoku vo forme náhodného kľbka. Po naviazaní na cieľovú sekvenciu vzniká duplex sondy s cieľovou sekvenciou. Do tohto duplexu sa následne môže viazať v PCR reakcii prítomné SYBR® Gold, ktoré po ožiarení pomocou FRET excituje fluorescenčný reportér Cy5/5.5. Výhodou tohto usporiadania je súčasná detekcia nešpecificky a špecificky amplifikovanej DNA na dvoch detekčných kanáloch (520 a 670 resp. 705 nm).<sup>18</sup>

### Yin-Yang



Obrázok 13. Yin-Yang. Schematické znázornenie princípu použitia.

Yin-Yang sondy tvoria dva komplementárne reťazce DNA. Prvý reťazec je v porovnaní s druhým reťazcom dlhší, na 5'-konci je značený fluorescenčným reportérom a na 3'-konci fosfátom. Druhý reťazec je kratší, na 3'-konci je značený zhášačom (Obrázok 13). V roztoku tvoria reťazce komplementárny duplex. V tomto duplexe je reportér a zhášač v tesnej blízkosti a fluorescencia reportéra je zhášaná. Pri anelácii dochádza k rozvoľneniu duplexu, hybridizácii prvého reťazca s reportérom k cieľovej sekvencii a produkcii fluorescenčného signálu. Jedná sa o tzv. „displacing probes“ kde je reťazec so zhášačom vymenený za cieľ. Reťazec so zhášačom musí byť kratší, aby bola počas PCR preferovaná tvorba duplexu reportérového reťazca s cieľom. Výhodami týchto sond je ich jednoduchý dizajn a nízka cena.<sup>27</sup>

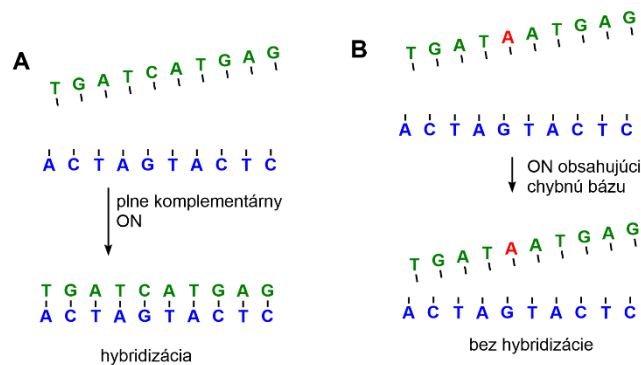
### 3.3 Genotypizácia (alelická diskriminácia - detekcia známych zmien DNA)

Genotypizácia napr. jednonukleotidových variantov (single nucleotide variants - SNV) je sekvenčne špecifická metóda detekcie mutácií. Je založená na hybridizácii komplementárnych ON reťazcov k cieľovej sekvencii. Alelická diskriminácia je založená na štyroch základných mechanizmoch, a to: alelovo špecifická hybridizácia, alelovo špecifická primerová extenzia, alelovo špecifická ligácia ON a alelovo špecifické invazívne štiepenie.

#### 3.3.1 Alelovo špecifická hybridizácia

Hybridizácia alelovo špecifickej sondy k cieľovej sekvencii obsahujúcej variant génu je často využívanou metódou alelickej diskriminácie. Sonda za optimalizovaných podmienok hybridizuje len k plne komplementárnej cieľovej sekvencii (Obrázok 14). Prítomnosť variantu génu (napr. vo forme chybné párovaných báz v cieľovej sekvencii) destabilizuje prípadný duplex s chybné párovanými bázami natoľko, že bráni anelácii sondy na cieľovú sekvenciu. Problémom hybridizácie ako genotypizačnej techniky je obmedzený vplyv jednonukleotidovej zmeny na celkovú stabilitu duplexu. Vplyv jednonukleotidovej zmeny na celkovú stabilitu duplexu sa znižuje s predlžujúcim sa DNA reťazcom. Dizajn sondy a následná optimalizácia reakčných podmienok sú pre alelickú diskrimináciu dôležité, kľúčovými sa stávajú v prípade SNVs. Používanie vhodných modifikácií DNA, ako sú napr: LNA, PNA, ZNA, MGB, či interkalátory zlepšuje diskriminačné vlastnosti navrhovaných sond. Alelická diskriminácia pomocou hybridizácie je najjednoduchším spôsobom detekcie génových variantov. Diskriminácia je v tomto prípade založená na dvoch, prípadne viacerých sondách<sup>28</sup> značených rôznymi reportérmi odpovedajúcimi jednotlivým génovým variantom. Detekcia je založená na zhášaní fluorescenčného signálu reportéra zhášačom. Podľa typu analýzy dochádza k detekcii signálu po naviazaní sondy k cieľovej sekvencii (Molecular Beacons), prípadne po jej rozložení polymerázou (TaqMan®). Genotypizácia pomocou alelovo špecifickej hybridizácie môže prebiehať v homogénnom prostredí (roztok)<sup>13, 29, 30</sup> alebo na pevnej fáze.<sup>31, 32</sup>

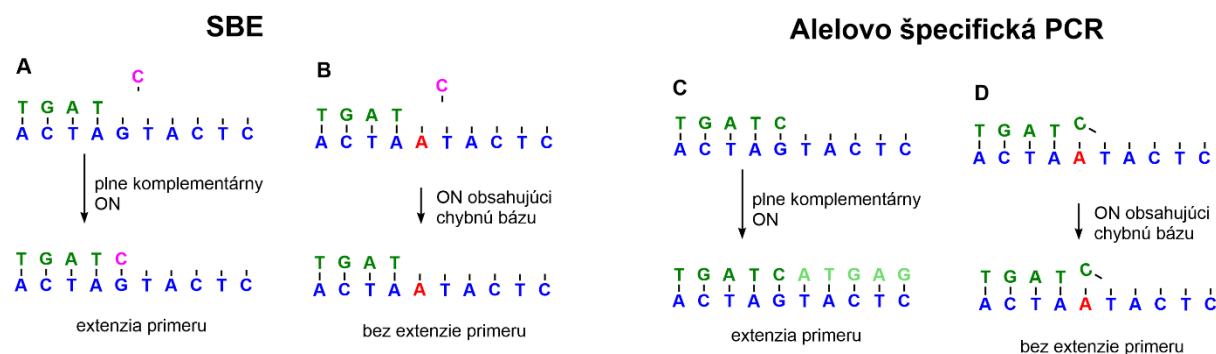




Obrázok 14. Schematické znázornenie princípu alelickej diskriminácie pomocou alelovo špecifickej hybridizácie. Plne komplementárny ON hybridizuje k cieľovej sekvencii (A), zatiaľ čo ON obsahujúci nekomplementárnu bázu nehybridizuje k cieľovej sekvencii (B).

### 3.3.2 Alelovo špecifická primerová extenzia

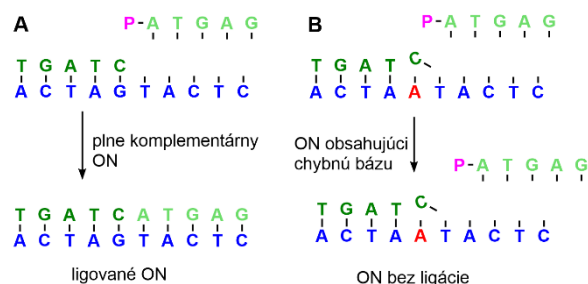
Alelickú diskrimináciu pomocou primerovej extenzie možno rozdeliť na alelovo špecifickú inkorporáciu dideoxynukleotidu (jednonukleotidovú extenziu – single base extension – SBE) a alelovo špecifickú PCR. Pri SBE dochádza k anelácii primeru v tesnej blízkosti SNV, jeho extenzii a inkorporácii dideoxynukleotidu. Produkt primerovej extenzie je detegovaný pomocou hmotnostnej spektrometrie (MALDI-TOF),<sup>33</sup> či fluorescenčne (SNapShot Assay).<sup>34</sup> Pri alelovo špecifickej PCR dochádza k elongácii primeru DNA polymerázou len v prípade, že je 3'-koniec primeru plne komplementárny k templátu. Alelická diskriminácia je v tomto prípade založená na prítomnosti alebo neprítomnosti PCR produktu.



Obrázok 15. Schematické znázornenie priebehu SBE a alelovo špecifickej PCR. (A) v prítomnosti komplementárneho nukleotidu dochádza k extenzii primeru. (B) v prítomnosti nekomplementárneho nukleotidu nedochádza k extenzii primeru. (C) plne komplementárny primer je v PCR predĺžený, zatiaľ čo primer s nekomplementárnou bázou na 3'-konci nie je predĺžený (D).

### 3.3.3 Alelovo špecifická ligácia

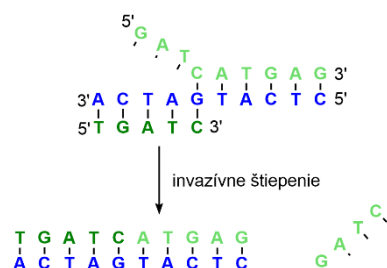
DNA ligáza je enzým zúčastňujúci sa replikácie DNA (spájanie Okazakiho fragmentov), či opravy poškodenej DNA. Alelická diskriminácia pomocou ligácie využíva schopnosť DNA ligázy kovalentne spájať susediace fragmenty DNA hybridizované k templátu.<sup>35</sup> Susediace ON reťazce sú kovalentne spojené ligázou len v prípade, že sa prerušenie nachádza medzi príľahlými nukleotidmi a ON reťazce sú plne komplementárne k templátu (Obrázok 16). Génový variant je detegovaný na základe prítomnosti či neprítomnosti ligačného produktu. Ligácia je často využívanou metódou detekcie SNVs a to vďaka vysokej špecifickosti, ktorá je dôsledkom hybridizácie dvoch krátkych ON reťazcov a selektívnej aktivity DNA ligázy. Ligácia je v porovnaní s ostatnými alelovo špecifickými detekciami vysoko špecifická a má veľmi nízky limit detekcie.<sup>36</sup>



Obrázok 16. Schematické znázornenie priebehu alelovo špecifickej ligácie. (A) v prípade plnej komplementarity ON reťazcov dochádza k ligácii ON. (B) v prítomnosti nekomplementárneho ON reťazca nedochádza k ligácii ON.

### 3.3.4 Alelovo špecifické invazívne štiepenie (Invasive cleavage)

Pri tomto type alelickej diskriminácie sú použité dve ON sondy komplementárne k templátu. Prvá sonda je značená reportérom (signálna sonda). Druhá (invazívna) sonda sa svojim 3'-koncom „prekrýva“ s 5'-koncom signálnej sondy a vymieňa ho (Obrázok 17). Endonukleáza rozpozná voľný 5'-koniec signálnej sondy a k jeho odštiepeniu dochádza len v prípade plnej komplementarity 5'-konca signálnej sondy k templátu. V prípade signálnej sondy obsahujúcej chybné párované bázy na 5'-konci nedochádza k vytvoreniu správnej štruktúry a k štiepeniu signálnej sondy.<sup>37</sup>



Obrázok 17. Princíp invazívneho štiepenia. Cieľová sekvencia (modrá), invazívna sonda (tmavozelená), signálna sonda (bledozelená).

### 3.4 Zvýšenie termálnej stability krátkych DNA duplexov

Stabilita DNA duplexu je ovplyvňovaná množstvom faktorov, ktoré môžeme rozdeliť na vnútorné (vychádzajúce z chemickej štruktúry DNA) a vonkajšie (zloženie roztoku). Tieto faktory môžu na DNA duplex pôsobiť stabilizačne alebo destabilizačne.

DNA duplex je tvorený dvoma reťazcami DNA. Reťazce DNA majú vďaka pentózofosfátovej kostre negatívny náboj, ktorým sa reťazce od seba odpudzujú (destabilizačný efekt). Na pentózofosfátovú kosť DNA sú viazané nukleové bázy tvoriace komplementárne páry (adenín – tymín, cytozín – guanín). DNA duplex je stabilizovaný slabými nekovalentnými interakciami: vodíkovými väzbami medzi komplementárnymi nukleovými bázami a  $\pi$ - $\pi$  interakciami susediacich párov nukleových báz (stacking).<sup>38</sup> Zloženie sekvencie DNA má vplyv na termálnu stabilitu duplexu. Duplexy GC bohatých sekvencií majú vyššiu termálnu stabilitu v porovnaní s duplexmi AT bohatých sekvencií a duplexmi s vyváženým pomerom GC a AT báz. S rastúcim počtom párov nukleových báz rastie aj termálna stabilita DNA duplexov. Dlhšie DNA duplexy (30 a viac bp) majú vyššiu termálnu stabilitu v porovnaní s krátkymi duplexmi. Obecné platí, že s predlžujúcim sa reťazcom DNA duplexu klesajú jednotlivé príspevky párov nukleových báz k termálnej stabilite DNA duplexu. Pre krátke DNA duplexy platí, že skrátenie alebo predĺženie DNA reťazca o jednu bázu má veľký vplyv na termálnu stabilitu duplexu a teda jeho teplotu topenia. Prítomnosť chybné párovaných báz v sekvencii DNA duplexu má destabilizačný vplyv. Chybné párované bázy sa líšia

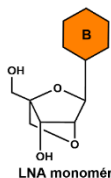
vplyvom na termálnu stabilitu duplexu podľa toho, aké bázy sú chybné párované. Najstabilnejšie sú chybné párované bázy obsahujúce guanín, najmenej stabilné sú chybné párované bázy obsahujúce cytozín. S rastúcim počtom chybné párovaných báz klesá stabilita DNA duplexu. Modifikácie vlastnej prirodzenej štruktúry DNA môžu mať stabilizačný alebo destabilizačný efekt. Modifikované môžu byť nukleové bázy (izocytozín, izoguanín) či pentózofosfátová kostra (LNA, PNA). DNA reťazec môže byť modifikovaný aj kovalentne pripojenou molekulou. Tá môže byť viazaná na jednu z báz či na pentózofosfátovú kostru.

Medzi vonkajšie faktory ovplyvňujúce termálnu stabilitu DNA duplexu patrí iónová sila roztoku ( $K^+$ ,  $Na^+$ )<sup>39</sup> či prítomnosť katiónov kovov ( $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ). Ďalšími látkami ovplyvňujúcimi stabilitu DNA duplexov sú napr. farbivá viažuce sa na DNA používané v PCR reakciách. Medzi tieto farbivá patrí EB (nepoužíva sa) a SYBR Green® I.<sup>40, 41</sup>

### 3.4.1 Modifikácie DNA zvyšujúce stabilitu duplexu

Od objavu PCR reakcie bolo vyvinutých niekoľko modifikácií DNA, ktoré zvyšujú stabilitu duplexu sondy s cieľom. Tieto modifikácie môžeme rozdeliť na analógy nukleových kyselín a na kovalentne viazané modifikácie DNA. U analógov nukleových kyselín (NK) ide z chemického hľadiska o modifikáciu pentózovej časti alebo celej pentózofosfátovej kostry. U kovalentne viazaných modifikácií DNA ide z chemického hľadiska hlavne o tri typy látok, a to polyamíny, MGB a interkalátory. Modifikácia DNA reťazca kovalentne viazanými molekulami je starším prístupom k zvyšovaniu stability duplexu. Použitie analógov NK je novším prístupom k zvyšovaniu stability duplexu.

#### 3.4.1.1 LNA

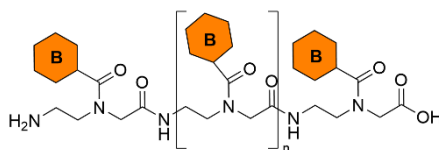


Obrázok 18. Všeobecná štruktúra LNA monomérov

Locked Nucleic Acids (LNA, Obrázok 18) patria medzi modifikácie pentózy. LNA vznikli zavedením metylénového mostíku spájajúceho 2'-O a 4'-C ribózy.<sup>42</sup> Zavedením metylénového mostíku do štruktúry ribózy vzniká bicyklická štruktúra, ktorá tzv. uzamyká konformáciu duplexu takto modifikovaného ON do A-konformácie. Prítomnosť LNA v ON reťazci zvyšuje jeho odolnosť voči nukleázam, čo je dôležité pre *in vivo* aplikácie takto modifikovaných ON. Rígídna štruktúra LNA modifikovaných ON znižuje stratu entropie počas prechodu z jednoláknovej na dvojláknovú DNA, čo má za následok zvýšenie stability ON duplexu.<sup>43-46</sup> Na zvýšenie stability duplexu má vplyv počet LNA monomérov v ON reťazci (aspoň dva). Prítomnosť jedného LNA monoméru v ON reťazci nemá vplyv na stabilitu duplexu. Podľa počtu LNA monomérov prítomných v ON reťazci sa zvýšenie teploty topenia duplexu pohybuje medzi 2 – 7 °C na LNA monomér.<sup>42, 43</sup> Stabilizačné vlastnosti LNA monomérov je možné využiť v diagnostických aplikáciách avšak je potrebné vziať do úvahy aj ich nevýhody. Pri návrhu primeru, primer-sondy či sondy nie je možné použiť výhradne LNA monoméry. ON zložené výhradne z LNA monomérov má signifikantne vyššiu stabilitu duplexu v porovnaní s ON zloženým z prirodzených monomérov. Zvýšenie stability je sprevádzané vyššou väzbovou afinitou, čo nevyhnutne vedie k zvýšeniu nešpecifickej hybridizácie a možnosti tvorby dimérov, ktoré sú extrémne stabilné.<sup>44</sup> Z uvedených dôvodov je nutné kombinovať LNA monoméry s prirodzenými monomérmi. LNA modifikované ON boli použité vo viacerých typoch detekcie PCR amplifikácie (Fluorescent Universal Primer,<sup>47</sup> TaqMan®,<sup>48, 49</sup> Molecular Beacons<sup>50</sup>).

LNA modifikácia ON umožňuje používať kratšie a špecifickejšie sekvencie. LNA modifikovné ON možno použiť pri detekcii mutácií,<sup>50, 51</sup> alelovo špecifickej PCR,<sup>52</sup> či multiplex PCR.<sup>53, 54</sup>

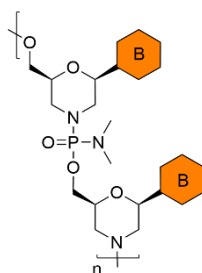
### 3.4.1.2 PNA



Obrázok 19. Všeobecná štruktúra peptidových nukleových kyselín.

Peptidové nukleové kyseliny (Peptide Nucleic Acids - PNA, Obrázok 19) patria medzi modifikácie pentózofosfátovej kostry. U PNA je celá pentózofosfátová kostra nahradená polypeptidovým reťazcom tvoreným *N*-(2-aminoetyl)glycínovými podjednotkami. Bázy sú na kostru PNA viazané cez acetylový linker. PNA sa vyznačujú unikátnymi fyzikálno-chemickými vlastnosťami (achiralita, neprítomnosť elektrostatického náboja).<sup>55</sup> Vďaka nenabitej kostre nie sú PNA odpudzované od nabitých molekúl DNA či RNA, čo vedie k vyššej termálnej stabilite ich duplexov. Hybridné duplexy PNA/DNA majú v porovnaní s duplexmi DNA/DNA vyššiu teplotu topenia o 2 – 4 °C na PNA monomér. PNA majú schopnosť viazať sa na dsDNA a tvoriť triplexy. PNA sú odolné voči enzymatickej degradácii. Nenabitá polypeptidová kostra PNA má za následok významné zníženie rozpustnosti vo vode.<sup>56</sup> Dĺžka a zloženie PNA je limitované (12 báz, obsah GC < 60 %). Pre použitie PNA je dôležitá aj koncentrácia elektrolytov. Tvorba hybridných duplexov PNA/DNA je preferovaná pri nízkej koncentrácii elektrolytov.<sup>57, 58</sup> PNA je možné použiť v PCR ako „svorku“ (clamp), ktorá selektívne blokuje amplifikáciu cieľa obsahujúceho nekomplementárnu bázu (chybne párovanú bázu). Výhodou PCR clampingu je možnosť diskriminácie alel, ktoré sa líšia len jednou nukleovou bázou.<sup>59</sup> PNA môžu slúžiť aj ako hybridizačné sondy založené na princípe Molecular Beacons.<sup>60-62</sup> Ich výhodami sú spomínaná vyššia termálna stabilita a špecifickosť.

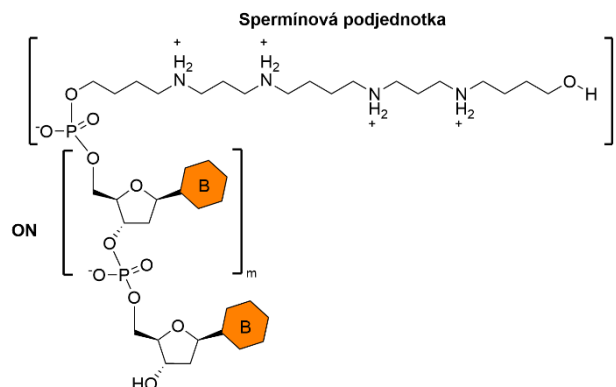
### 3.4.1.3 MO



Obrázok 20. Všeobecná štruktúra morfolino NK.

MO sú analógy NK, v ktorých bola pentóza nahradená morfolínovým cyklom (Obrázok 21), vďaka čomu došlo aj k zmene internukleozidových spojení na fosforamidáty.<sup>63</sup> MO majú nenabitú kostru a v porovnaní s PNA majú vyššiu rozpustnosť vo vode, a to práve vďaka morfolínovému cyklu. Taktiež sú odolné voči mnohým nukleázam. MO Molecular Beacon bola použitá na vizualizáciu RNA *in vivo*.<sup>64</sup> MO je možné použiť na detekciu miRNA,<sup>65</sup> DNA,<sup>66, 67</sup> pomocou biosenzoru. MO majú aj dobré diskriminačné vlastnosti.<sup>68</sup>

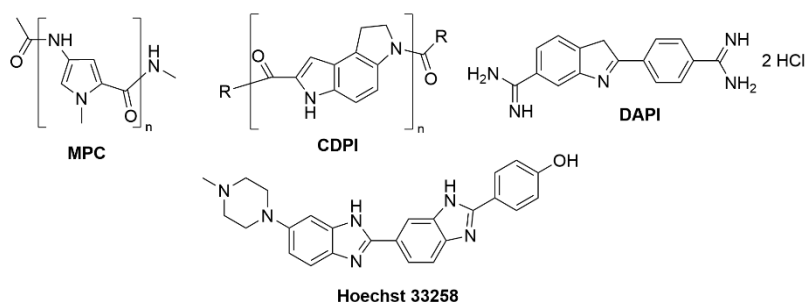
### 3.4.1.4 ZNA<sup>TM</sup>



Obrázok 21. Všeobecná štruktúra ZNA. ZNA sú rozdelené na ON časť a sperminovú podjednotku.

Zip Nucleic Acids (ZNA, Obrázok 21) patria medzi modifikácie kovalentne viazané na ON. Na koniec ON reťazca je cez fosfát naviazaná sperminová podjednotka (fosforamiditový syntón).<sup>69</sup> V štruktúre ZNA môže byť prítomných až dvadsať za sebou viazaných sperminových podjednotiek, ktoré sa viažu na ON pomocou klasickej fosforamiditovej syntézy.<sup>70</sup> Reťazec ON má vďaka pentózofosfátovej kostre negatívny náboj. V duplexe ON pôsobia proti sebe dve protichodné sily, príťažlivé vodíkové väzby tvorené medzi bázami ON a odpudivé elektrostatické sily pôsobiace medzi negatívne nabitými pentózofosfátovými kostrami reťazcov. Pôsobenie odpudivých elektrostatických síl je znižované prítomnosťou kladne nabitých iónov ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ). Kovalentným naviazaním kladne nabitých molekúl na ON, v tomto prípade sperminových podjednotiek, stabilizuje duplexy takto modifikovaných ON reťazcov a zvyšuje ich teploty topenia.<sup>69, 70</sup> Stabilizácia je závislá na počte sperminových podjednotiek viazaných na ON a na koncentrácii elektrolytov ( $\text{Na}^+$ ).<sup>69, 70</sup> Koncentrácia  $\text{Na}^+$  katiónov má relatívne veľký vplyv na výsledné zvýšenie teploty topenia ZNA. Pri zvýšení koncentrácie  $\text{Na}^+$  zo 115 na 150 mM došlo k zníženiu výslednej  $T_m$  u ON konjugátu so šiestimi sperminovými podjednotkami až o 11,3 °C. ZNA môžu v PCR slúžiť ako primery<sup>71</sup> či hydrolytické (TaqMan<sup>®</sup>) sondy.<sup>72</sup> Ďalším príkladom ich použitia sú napr. elektrochemické biosenzory pre Leidenskú mutáciu faktoru V.<sup>73</sup>

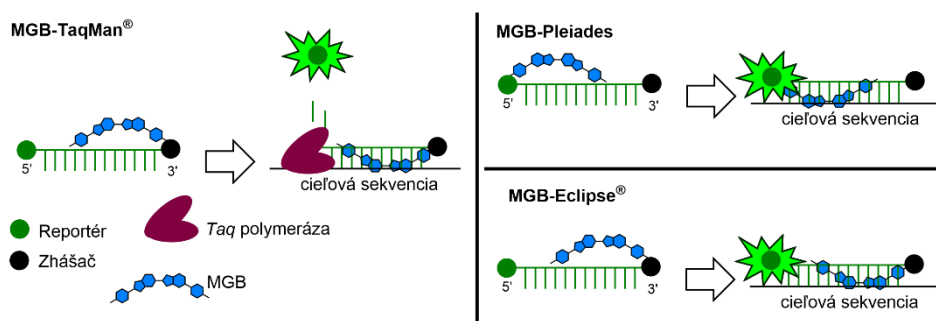
### 3.4.1.5 MGB



Obrázok 22. Príklady štruktúr niekoľkých MGB. V MGB sondách sa v súčasnosti bežne používa CDPI.

Malý žliabok DNA je úzky a plytký. Jeho šírka je približne 10 Å. Molekuly viažuce sa do malého žliabku DNA (minor groove binders – MGB), ako sú oligopeptid *N*-metylpyrrolidokarboxamidu (MPC),<sup>74</sup> dihydropyridoindolu (CDPI)<sup>75</sup> a Hoechst,<sup>76</sup> je možné charakterizovať obecné kosákovitým tvarom, prítomnosťou spojených aromatických cyklov, kladným nábojom, tvorbou nekovalentných väzieb s nukleovými bázami malého žliabku DNA (van der Waalsove a elektrostatické interakcie) a selektivitou k AT-bohatým sekvenciám. MGB ligandy majú vďaka väzbe do malého žliabku DNA rôzne biologické vlastnosti: antineoplasické,

antiparazitárne, antibakteriálne, antivírusové, ale aj mutagénne.<sup>77</sup> MGB ligandy našli uplatnenie v mikrobiológii ako farbivá bunkového jadra (Hoechst 33258, 33342, DAPI). MGB ligandy je možné použiť ako stabilizátory duplexu DNA, a to vďaka nekovalentným interakciám zvyšujúcich termálnu stabilitu AT-bohatých duplexov. Pre toto použitie je nutné ich kovalentné naviazanie na ON. Prvé MGB modifikované ON vychádzali zo štruktúry netropsínu a distamycínu A. Základom ich oligopeptidov (až pentapeptid) bol *N*-metylpyrrolkarboxamid (MPC, Obrázok 22).<sup>74</sup> Duplexy tvorené polyadenínovým ON modifikovaným týmito oligopeptidmi (MGB ON) a nemodifikovanými polytymidínovými ON mali výrazne vyššiu termálnu stabilitu v porovnaní s nemodifikovanými ON. Duplexy tvorené GC bohatým MGB ON neboli konjugáciou s MGB ovplyvnené. Ďalšia MGB štruktúra kovalentne viazaná na polytymidínové ON vychádzala zo štruktúry rachelmycínu. MGB ligand vychádzajúci z tejto štruktúry je tvorený jednou až tromi 1,2-dihydro-3*H*-pyrolo[3,2-*e*]indol-7-karboxylátovými podjednotkami (CDPI<sub>1-3</sub>). Duplexy ON modifikované týmito MGB boli výrazne stabilizované, v prípade ON modifikovaného CDPI<sub>3</sub> bola teplota topenia duplexu v porovnaní s nemodifikovaným ON duplexom až o 44°C vyššia. Duplexy ON modifikovaných syntetickým farbivom Hoechst mali zvýšenú stabilitu v porovnaní s nemodifikovaným duplexom. Zvýšenie termálnej stability duplexov Hoechstom modifikovaných ON bolo v porovnaní s CDPI<sub>3</sub> modifikovanými ON nižšie, no stále výrazné (13-20°C).<sup>78, 79</sup> Prvé MGB modifikované fluorescenčné PCR sondy boli modifikované CDPI<sub>3</sub> a ich mechanizmus účinku bol založený na TaqMan® sondách.<sup>80</sup> Ďalšími popísanými technológiami sú MGB Eclipse™ a MGB Pleiades ktoré využívajú ON značené CDPI<sub>3</sub>.<sup>81, 82</sup> Mechanizmus účinku MGB TaqMan® je totožný s vyššie spomínanými TaqMan® sondami. U MGB Eclipse® a MGB Pleiades sondách rastie fluorescencia po naviazaní sondy na cieľovú sekvenciu, kedy dôjde k rozvoľneniu náhodného kľbka, oddialeniu reportéra od zhášača a zvýšeniu fluorescencie. MGB Eclipse® majú MGB ligand viazaný na 3'-konci (so zhášačom). MGB Pleiades majú viazaný MGB ligand na 5'-konci (s reportérom), viz Obrázok 23.



Obrázok 23. Schematické znázornenie mechanizmu účinku MGB-TaqMan®, MGB-Pleiades a MGB-Eclipse™ sond.

### 3.4.1.6 Interkalátory

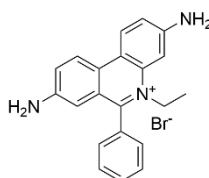
Interkalátory sú molekuly tvorené lipofilnými heteroaromatickými alebo aromatickými jadrami. Interkalátory majú planárnu štruktúru a tvoria nekovalentné väzby s nukleovými bázami (van der Waalove, hydrofóbne a  $\pi$ - $\pi$  interakcie, vodíkové väzby). Tieto vlastnosti sú dôležité pre interkaláciu molekuly medzi susediace páry báz DNA. Interkalácia je reverzibilný proces, pri ktorom sa molekula interkalátoru vmedzerí medzi susediace páry báz DNA. Interkalátory je možné rozdeliť na dva typy, monofunkčné a bifunkčné. Monofunkčné interkalátory obsahujú jednu podjednotku schopnú interkalácie do DNA. Bifunkčné interkalátory obsahujú dve podjednotky schopné interkalácie do DNA, ktoré sú spojené vhodným linkerom. Bifunkčné interkalátory majú v porovnaní s monofunkčnými interkalátormi vyššiu väzbovú konštantu.<sup>83</sup> Ďalšie možné rozdelenie interkalátorov je na základe spôsobu interkalácie do DNA na klasické a „threading“ interkalátory. Klasické interkalátory interagujú s CpG pármami celou plochou aromatického systému.

Threading interkalátory majú navyše substituenty, ktoré sa viažu do veľkého alebo malého žliabku DNA. Z chemického hľadiska môžeme rozdeliť interkalátory podľa štruktúry na:

- Fenantridíny
- Akridíny
- Antrachinóny
- Cyanínové farbivá
- Pyrén a polycyklické aromatické uhľovodíky (polycyclic aromatic hydrocarbons - PAH)

Látky typu interkalátorov sa používajú v rôznych aplikáciách, napríklad pri liečbe nádorov (daunorubicín a doxorubicín), ako farbivá viažuce sa na DNA v mikrobiológii či biochémií (SYTO™, TOTO™, SYTOX™, SYBR® Green®, etídium jodid, propídium jodid a mnoho ďalších) a ako stabilizátory duplexov ON (PCR sondy, antisense ON). Konjugáty ON s interkalátormi boli pripravené za rôznymi účelmi, napr. zvýšenie termálnej stability duplexov týchto ON (PCR sondy), zvýšenie stability triplexov týchto ON, gene silencing či fluorescenčné sondy zobrazujúce RNA či DNA v bunkách. Za týmto účelom boli na ON kovalentne naviazané interkalátory, ako napríklad akridín,<sup>84-87</sup> pyrén,<sup>88-93</sup> antracén,<sup>94-98</sup> antrachinón,<sup>99-103</sup> fenazín,<sup>104-107</sup> psoralén<sup>108</sup> alebo tiazolová oranž.<sup>109, 110</sup>

### Fenantridíny



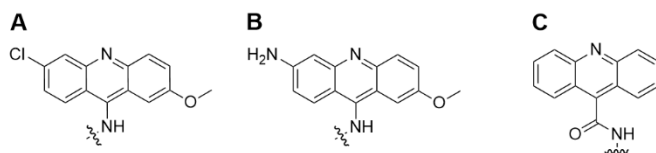
Obrázok 24. Štruktúra etídium bromidu

Do fenantridínových interkalátorov patrí etídium bromid (EB), chemicky 3,8-diamino-5-etyl-6-fenylfenantridínium bromid, ktorý sa vďaka jeho vlastnostiam (interkalácia do DNA a následná fluorescencia) začal používať na fluorescenčnú vizualizáciu DNA analyzovanej pomocou gélovej elektroforézy.<sup>111</sup> EB bol testovaný aj pre použitie v real-time PCR.<sup>7, 112</sup> V tomto prípade slúžil EB ako fluorescenčná sonda, ktorej fluorescencia rástla so zvyšujúcim sa počtom amplikónov. Po naviazaní na dsDNA, ktorá poskytne hydrofóbne prostredie, jeho fluorescencia vzrástla až dvadsaťpäťnásobne, a to vďaka prerušeniu protónového transferu z excitovaného singletového stavu na vodu.<sup>113</sup> EB má preferenciu ku GC-bohatým sekvenciám a zvyšuje termálnu stabilitu duplexu DNA. Veľmi rýchlo bol v PCR nahradený farbivami SYBR® Green. V súčasnosti sa od jeho používania upúšťa kvôli mutagenite a karcinogenite.

### Akridíny

Pravdepodobne najviac študovanými konjugátmi DNA s interkalátormi sú konjugáty s akridínovými derivátmi. Konjugáty akridínových derivátov s ON boli pripravené za účelom zvýšenia stability duplexov a triplexov takto modifikovaných ON. Na kovalentnú modifikáciu ON bolo použitých niekoľko derivátov akridínu. Najčastejšie študovaným bol 9-amino-6-chlór-2-metoxiakridín<sup>84, 85, 114-116</sup>, ktorý bol kovalentne naviazaný na ON napr. za účelom regulácie génovej expresie. 6,9-diamino-2-metoxiakridín<sup>117, 118</sup> bol kovalentne naviazaný na ON za účelom stabilizácie triplexov týchto ON. Akridín-9-karboxamid<sup>87</sup> a 9-amino-6-chlór-2-metoxiakridín<sup>86</sup> (Obrázok 25) boli použité na prípravu krátkych fluorescenčných ON sond na detekciu komplementárnych cieľov, či ako nový typ fluorescenčných PCR sond. Akridínové deriváty boli konjugované do sekvencie reťazca DNA alebo na 3'- a 5'-koniec, pričom z hľadiska termálnej

stability duplexu akridínom modifikovaných ON je preferovaná konjugácia na konce reťazca. Konjugácia akridínového derivátu na 3'-koniec vedie k zvýšenej odolnosti voči nukleázam. Väčšina akridínových derivátov bola na ON viazaná cez aminoskupinu v polohe 9 akridínového jadra. Táto väzba je v prostredí deprotečných činidiel (NH<sub>4</sub>OH, AMA) nestabilná a dochádza k odštiepeniu aminoakridínového zvyšku z ON. Z tohto dôvodu je nutné pri syntéze ON používať Ultra MILD chrániace skupiny, prípadne iné deprotečné činidlá pri štandardnom chránení.



Obrázok 25. Štruktúry akridínov použitých na modifikáciu ON v publikovanej literatúre.

Fluoresceínom značené ON modifikované akridín-9-karboxamidom používali tento akridínový derivát ako donor pre FRET.<sup>87</sup> Fluorescencia tejto sondy viazanej v duplexe s cieľom bola v porovnaní s fluorescenciou sondy samotnej približne dvakrát nižšia. Akridínový derivát sa po naviazaní sondy na cieľ interkaloval do vzniknutého duplexu, čo malo za následok prerušenie FRET a zníženie fluorescencie. So zvyšujúcou sa teplotou fluorescencia sondy viazanej v duplexe postupne rástla (obnova FRET). Duplex akridínom modifikovanej fluorescenčnej sondy bol v porovnaní s duplexom nemodifikovanej sondy stabilizovaný a jeho teplota topenia bola o 2 °C vyššia.

Fluorescenčná sonda modifikovaná 9-amino-6-chlór-2-metoxyakridínom a fluoresceínom používala tento akridínový derivát ako zhášač fluorescencie.<sup>86</sup> Sonda mala voľne v roztoku nízku fluorescenciu vďaka statickému zhášaniu vytvorením heterodiméru akridín-fluoresceín. Po naviazaní na cieľ sa fluorescencia sondy zvýšila 4,5-násobne. Nárast fluorescencie bol spôsobený interkaláciou akridínu do duplexu alebo stackingom akridínu na koniec duplexu a prerušením statického zhášania. Duplex akridínom modifikovanej sondy bol stabilizovaný v porovnaní s duplexom nemodifikovanej sondy. Teplota topenia duplexu akridínom modifikovanej sondy bola vyššia o 1,7 °C. Sonda si zachovala diskriminačné vlastnosti a teplota topenia duplexov sondy s cieľovými sekvenciami obsahujúcimi chybné párované bázy bola v porovnaní s plne komplementárnym duplexom nižšia o 15 až 18 °C.

### Antrachinóny

Široko študované boli aj deriváty antrachinónu. Konjugáciou ON s derivátmi antrachinónu boli pripravené napr. oligodeoxynukleotidy (ODN),<sup>119, 120</sup> fosforotioátové ODN,<sup>121</sup> oligoribonukleotidy či hybridné ON s antrachinónovými pseudonukleotidmi.<sup>99, 122</sup> Na kovalentnú modifikáciu ON boli použité nasledujúce antrachinónové deriváty: 1-amino-9,10-antrachinón,<sup>121</sup> 2-amino-9,10-antrachinón,<sup>123</sup> 2-(hydroxymetyl)-9,10-antrachinón,<sup>119</sup> 1,4-diamino-9,10-antrachinón,<sup>124</sup> 1,4-diamino-9,10-antrachinón,<sup>125</sup> 2,6-dihydroxy-9,10-antrachinón,<sup>122</sup> 9,10-antrachinón-2-karboxylová kyselina<sup>120</sup> a 4-(antrachinón-2-oxy)butánová kyselina.<sup>102</sup> Duplexy a triplexy ON modifikovaných antrachinónovým derivátom mali vyššiu termálnu stabilitu v porovnaní s duplexmi a triplexmi nemodifikovaných ON. Antrachinónom modifikované ON boli použité ako antisense ON, ultrasenzitívne Molecular Beacons určené na monitorovanie mRNA v bunkách, elektrochemické biosenzory na detekciu HPV či SNVs rôznych druhov *Bacillus*.

1,4-diamino-9,10-antrachinónový derivát bol použitý na modifikáciu PCR primer-sondy (Scorpions) a sondy (TaqMan®). V oboch detekčných systémoch fungoval antrachinónový derivát ako zhášač fluorescencie rôznych reportérov (FAM, TAMRA, Cy3, Cy5/5.5). Oba detekčné systémy

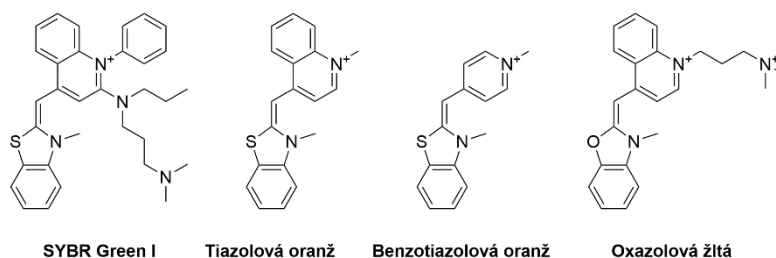


mali lepší pomer signálu k šumu v porovnaní s kontrolou používajúcou metylčerveň ako zhášač (okrem FAM značených sond). Antrachinónový zhášač zvyšoval termálnu stabilitu duplexov sond s cieľmi a ich teplota topenia bola zvýšená oproti antrachinónom nemodifikovaným sondám až o 6,4 °C. Diskriminačné vlastnosti antrachinónom značených sond zostali zachované alebo boli zlepšené.<sup>124</sup>

### Cyanínové farbivá

Rodina cyanínových farbív je široká. Cyanínové farbivá používané na detekciu NK sa vyznačujú výrazným nárastom fluorescence po interkalácii do dsDNA. Do tejto rodiny patria farbivá SYBR Green I, II, SYBR Gold, SYBR Safe, ktoré sa používajú v PCR aplikácii na detekciu nešpecificky amplifikovanej DNA. Farbivo SYBR Green I (2-[N-(3-dimethylaminopropyl)-N-propylamino]-4-[2,3-dihydro-3-metyl-(benzo-1,3-tiazol-2-yl)-metylidén]-1-fenylchinolínium, Obrázok 26) patrí medzi asymetrické cyanínové farbivá. Farbivo má vysokú afinitu k dsDNA k čomu prispievajú dva kladné náboje prítomné za štandardných PCR podmienok. SYBR® Green I nahradilo EB pri monitorovaní real-time PCR.<sup>19, 40</sup> SYBR® Green I zvyšuje teplotu topenia ( $T_m$ ) detegovanej dsDNA, a to v závislosti na svojej koncentrácii v reakcii až o 10 °C.<sup>40, 41</sup> SYBR® Green I je v súčasnosti stále najviac využívaným cyanínovým farbivom v PCR,<sup>126</sup> a to napriek niekoľkým nevýhodám (inhibícia PCR pri vyšších koncentráciách,<sup>41, 127</sup> sekvenčná špecifickosť ku GC<sup>128</sup> či nižšia stabilita<sup>129</sup>).

Ďalej do tejto rodiny farbív patria aj farbivá tiazolová oranž (TO), benzotiazolová oranž (BO), oxazolová žltá (YO-PRO1, Obrázok 26) a ich diméry TOTO a YOYO. Popísané sú ON konjugáty len s TO a BO.<sup>109, 110, 130</sup> Duplexy a triplexy týchto konjugátov majú obecnú vyššiu termálnu stabilitu v porovnaní s duplexmi a triplexmi nemodifikovaných ON.



Obrázok 26. Štruktúry cyanínových farbív.

### Pyrén a polyaromatické uhľovodíky (polyaromatic hydrocarbons - PAH)

Veľkou skupinou študovaných interkalátorov je pyrén a PAH (antracén, perylén či koronén). Konjugáty týchto interkalátorov s ON boli pripravené za účelom zvýšenia stability duplexov či triplexov takto modifikovaných ON. Najviac študovanou podskupinou sú konjugáty ON s pyrénom. Z štruktúrneho hľadiska boli na ON konjugované 4-(pyrén-1-yl)butánová kyselina, metylpyrén a 4-(1-pyrenyletynyl)benzylalkohol. Deriváty pyrénu môžu byť na ON viazané na rôznych pozíciách ako je internukleozidový fosfát, ribóza či nukleová báza. Pyrénový derivát môže byť umiestnený v reťazci, na 3'- alebo 5'-koniec. Duplexy pyrénom modifikovaných ON s komplementárnou sekvenciou majú vyššiu stabilitu a teplotu topenia (až o 15 °C) v porovnaní s nemodifikovanými ON.<sup>88, 131, 132</sup> Triplexy pyrénom modifikovaných ON majú vyššiu stabilitu v porovnaní s nemodifikovanými ON.<sup>133</sup> Duplexy a triplexy ON modifikovaných perilénom (až o 31 °C) či koronénom (až o 24,5 °C) majú vyššiu termálnu stabilitu ako duplexy a triplexy ON modifikovaných pyrénom („len“ o 15 °C).<sup>131</sup> Antracénom modifikované ON môžu mať zvýšenú (11 °C)<sup>96</sup> alebo zníženú (až o -6 °C)<sup>94, 97</sup> teplotu topenia.

Pyrén možno v ON sondách využiť taktiež ako zhášač fluorescence. Pyrénom modifikované PCR sondy (MagiPobe) majú dobré diskriminačné vlastnosti. Princípom týchto sond

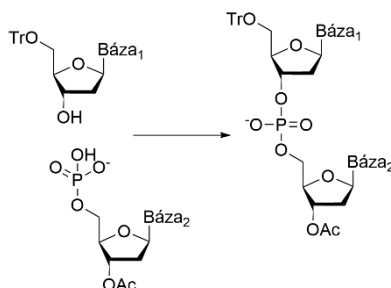
je väzba pyrënu (zhášač) a fluoresceínu (reportér) priamo do ON reťazca, pomocou fosforamiditových monomérov, kde nahradzujú dve nukleové bázy. Zaujímavosťou je o 6-11 °C nižšia teplota topenia duplexov týchto sond v porovnaní s nemodifikovanými duplexmi. Nižšia stabilita duplexov týchto sond však neovplyvňuje ich diskriminačné vlastnosti, pretože sú nezávislé na termálnej stabilite ich duplexov.<sup>89</sup> Fluorescencia reportéra je zhášaná dynamickým zhášaním (kolízie), ktoré je prerušené interkaláciou pyrënu do duplexu sondy s cieľovou sekvenciou. Pyrën a fluoresceín môžu byť v sekvencii vedľa seba alebo oddelené jednou bázou.

### 3.4.2 Syntéza ON reťazca

Z historického pohľadu je možné vývoj syntetických postupov prípravy ON reťazcov rozdeliť podľa použitých prístupov k syntéze.

#### 3.4.2.1 Fosfodiesterová syntéza

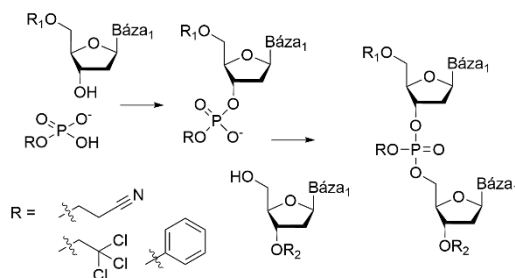
Hlavnou charakteristikou tohto syntetického prístupu (Obrázok 27) bola chýbajúca protekcia internukleotidových fosfodiesterových skupín, a to počas celej syntézy ON reťazca. Chránené zostávali nukleové bázy, 5'- a 3'-koniec. Nevýhodou tohto prístupu boli nežiadúce vedľajšie reakcie spôsobené akumuláciou nabitých fosfodiesterových skupín. Tieto reakcie viedli k zníženiu celkového výťažku syntézy ON. Z vyššie uvedených dôvodov bol tento syntetický prístup v sedemdesiatych rokoch minulého storočia viac-menej opustený.



Obrázok 27. Schéma fosfodiesterovej syntézy

#### 3.4.2.2 Fosfortriesterová syntéza

Fosfortriesterový prístup vychádzal z publikácie Michelsona a Todda z roku 1955.<sup>134</sup> Na ich prácu nadviazali v druhej polovici šesťdesiatych rokov Letsinger s Ogilviem,<sup>135-137</sup> Eckstein s Rizkom<sup>138, 139</sup> a Rees s Saffhillom.<sup>140</sup> Charakteristikou tohto syntetického prístupu bola príprava chráneného fosfortriesteru (2-kyanoetylovou<sup>135-137</sup>, 2,2,2-trichlóretylovou,<sup>138, 139</sup> fenylovou skupinou<sup>140</sup>, Obrázok 28) ako medziproduktu syntézy. V súčasnosti sa z poznatkov tohto syntetického prístupu vo veľkom využíva chránenie internukleozidových spojení 2-kyanoetylovou skupinou.



Obrázok 28. Fosfortriesterová syntéza

### 3.4.2.3 Fosforamiditová syntéza

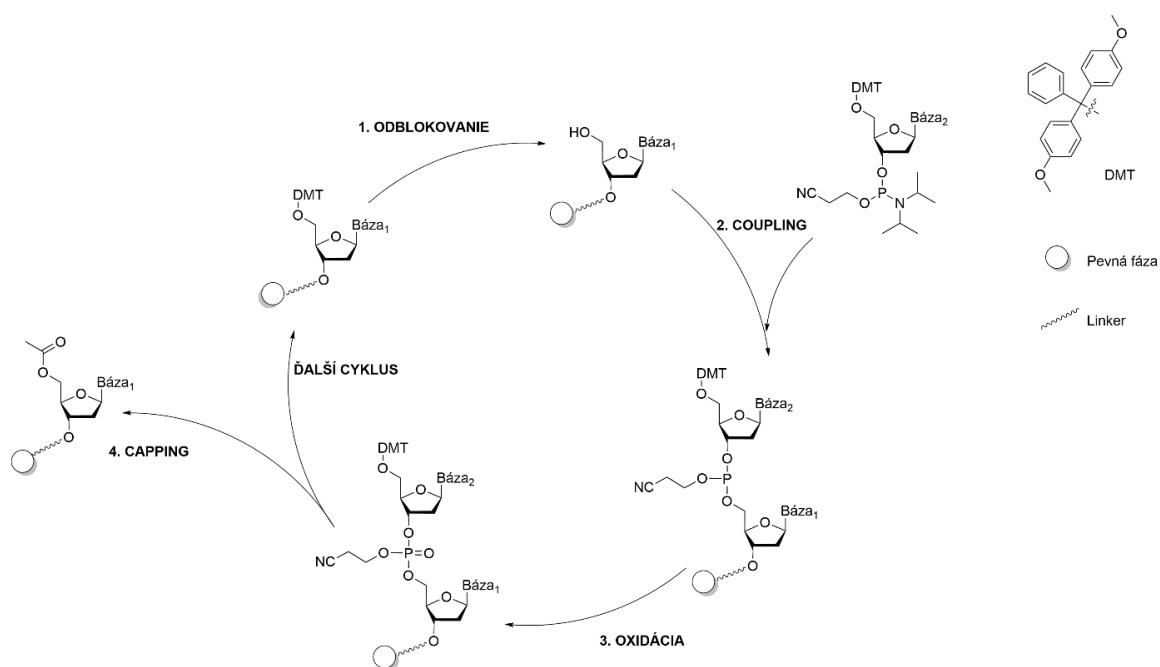
V sedemdesiatych rokoch minulého storočia Letsinger a spolupracovníci vyvinuli takzvaný „fosfit triesterový prístup“.<sup>141</sup> Tento prístup spočíval vo využití značne vyššej reaktivity derivátov fosfitov v porovnaní s derivátmi fosfátov. Letsinger s Lunsfordom boli schopní týmto prístupom získať tetradeoxynukleozid vo výťažku 49%. Použitie (2,2,2-trichlóretyl)dichlórfosfínu v reakcii s deoxytimidínom viedlo k vzniku reaktívneho, k vlhkosti citlivého medziproduktu, nevhodného pre automatizovanú syntézu. V snahe zmierniť spomínané nevhodné vlastnosti medziproduktov syntézy ON reťazca vyvinuli Beaucage s Caruthersom nový typ medziproduktu, fosforamiditový prekursor.<sup>142</sup> V tomto prípade bol ako zdroj fosfínového mostíku použitý chlór(dimetylamino)metoxyfosfín. Ten reakciou s vhodne chránenými deoxynukleozidmi poskytol stabilné, hydrolyze a oxidácii odolné, fosforamiditové deriváty. Fosforamiditové deriváty boli následne použité na prípravu dinukleotidov v roztoku a na pevnej fáze. Ako kyslý aktivátor bol v týchto prípadoch použitý 1*H*-tetrazol. Neskôr sa ukázalo, že *N,N*-dimetylamínofosforamidity nie sú stabilné v roztoku a boli nahradené stabilnejšími *N,N*-diizopropylamínofosforamiditmi.<sup>143, 144</sup> Rovnako bol v syntéze ON na pevnej fáze nahradený aj 1*H*-tetrazol derivátmi, ktoré majú vyššiu rozpustnosť a nekryštalizujú behom automatickej syntézy na pevnej fáze (5-(etyltio)-1*H*-tetrazol či 4,5-dikyanoimidazol). Benzyltietrazol má uplatnenie v syntéze RNA. Požiadavky na odchránenie jednotlivých chrániacich skupín boli rôzne. Na odchránenie metoxyskupiny fosfínu sa používala zmes tiofenol : trietylamín : dioxán alebo zmes *terc*-butylamín : metanol (MeOH). Na odchránenie exocyklických aminoskupín nukleových báz sa používal koncentrovaný hydroxid amónny. Použitie dvoch rôznych deprotektčných činidiel predlžovalo reakčný čas a samotný tiofenol často kontaminoval výsledný produkt. Zmenu chrániacej skupiny fosfínu (metoxyskupina) načrtli Sinha *et al.*<sup>145</sup> Navrhli podmienky, ktoré by mala chrániaca skupina fosfínu spĺňať (rýchle odchránenie v podmienkach (mierne) bázického deprotektčného činidla použitého na odchránenie exocyklických aminoskupín nukleových báz a odštiepenie ON z pevnej fázy, nízka tvorba solí v priebehu reakcie). Chrániacou skupinou, ktorá napĺňala tieto požiadavky, bola 2-kyanoetylová skupina. V súčasnosti používaná chemická syntéza štandardného ON reťazca je takmer výhradne založená na fosforamiditovej metóde syntézy na pevnej fáze.

#### 3.4.2.3.1 Fosforamiditová syntéza na pevnej fáze

V súčasnosti je najpoužívanejšou metódou prípravy ON reťazcov ich automatizovaná fosforamiditová syntéza na pevnej fáze pomocou ON syntetizérov.<sup>146</sup> Fosforamiditová syntéza na pevnej fáze je zložená zo štyroch syntetických krokov (Obrázok 29):

1. Odblokovanie (detritylácia) – na pevnej fáze je viazaný buď prvý nukleozid syntetizovanej sekvencie, svojím 3'-koncom, alebo univerzálny linker (napr. *N*-metyl-sukcinimido[3,4-*b*]-7-oxabicyklo[2.2.1]heptán-6-(4,4'-dimetoxytrityloxy)-5-sukcinoyl, či 1-dimetoxytrityloxy-2-*O*-dichlóracetyl-propyl-3-*N*-ureayl). 5'-Koniec nukleozidu, prípadne hydroxylová skupina univerzálného linkeru sú chránené 4,4'-dimetoxytritylom (DMT). Prvým krokom cyklu je preto odchránenie a to najčastejšie pomocou dichlóroctovej alebo trichlóroctovej kyseliny v organickom rozpúšťadle (dichlórmetán).
2. Coupling – voľná hydroxylová skupina umožňuje predĺženie reťazca o jeden nukleotid. Na toto predĺženie je potrebné do reakcie pridať fosforamiditový monomér. Do reakcie je pridaná zmes použitého monoméru s 5-(etyltio)-1*H*-tetrazolom, ktorý má funkciu katalyzátora. Kyslý 5-(etyltio)-1*H*-tetrazol protonizuje diisopropylamínový substituent pridávaného fosforamiditu, ktorý následne nahradí. Následne odchránená 5'-hydroxylová skupina napadne svojím voľným elektrónovým párom elektródeficitný fosfor, za vzniku novej väzby.

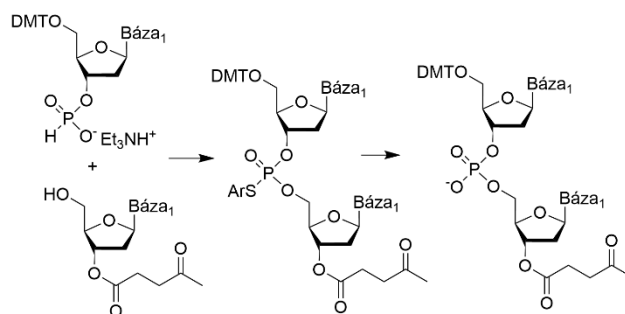
- Oxidácia – pri predlžovaní reťazca vzniká triester fosfitu. Ten je potrebné oxidovať na triester fosfátu, tj. prirodzenú a stabilnú formu fosforu. K oxidácii sa najčastejšie používa jód za prítomnosti vody a pyridínu. Najprv dochádza k ataku molekuly jódu atómom fosforu. Jódotriesterfosfóniový medziprodukt je napadnutý voľným elektrónovým párom kyslíku v molekule vody. Súčasne odstupuje jód vo forme pyridínium jodidu. Kyslý vodík zo vzniknutej hydroxylovej skupiny je odštiepený molekulou pyridínu za vzniku triesteru fosfátu.
- Capping – je posledným krokom cyklu. Napriek vysokému nadbytku fosforamiditového monoméru v reakcii nie je možné dosiahnuť 100% výťažok couplingu. Neblokovaná 5'-hydroxylová skupina predchádzajúceho nukleotidu by mohla viesť v ďalších syntetických cykloch k tvorbe a kumulácii nežiadúcich sekvencií s chýbajúcimi bázami. Preto je pred pokračovaním do ďalšieho syntetického cyklu potrebné zablockovať nezreagované 5'-hydroxylové skupiny acetylom. K zablokovaniu voľných 5'-hydroxylových skupín sa najčastejšie používa acetanhydrid v zmesi s *N*-metylimidazolom s malým prídavkom pyridínu. *N*-metylimidazol plní funkciu katalyzátora, pyridín udržiava bázické pH a zabraňuje detritylácii.



Obrázok 29. Cyklus fosforamiditovej syntézy ON na pevnej fáze

#### 3.4.2.4 H-fosfonátová syntéza

H-fosfonátová syntéza bola prvý krát popísaná v roku 1952.<sup>147</sup> Hall a spolupracovníci vtedy popísali syntézu chráneného 5'-5'-dinukleozid H-fosfonátu. Ďalej rozvinutá bola táto metóda syntézy až v druhej polovici osemdesiatych rokov<sup>148-150</sup> a bola vhodná pre syntézu na pevnej fáze. V deväťdesiatych rokoch bola táto metóda upravená a chráneným produktom boli aryltiofosfáty (Obrázok 30). Tie bolo možné následne previesť na fosfáty.<sup>151-153</sup> Nedávno bola metóda použitá na syntézu chimérickej DNA na pevnej fáze.<sup>154, 155</sup> H-fosfonátová syntéza bola vyvinutá ako alternatívna cesta k príprave dinukleozid fosfátov.<sup>156</sup> Výhodou tejto metódy syntézy na pevnej fáze je oxidácia na fosfát až na konci syntézy ON reťazca.



Obrázok 30. H-fosfonátová syntéza

### 3.4.3 Chrániace skupiny

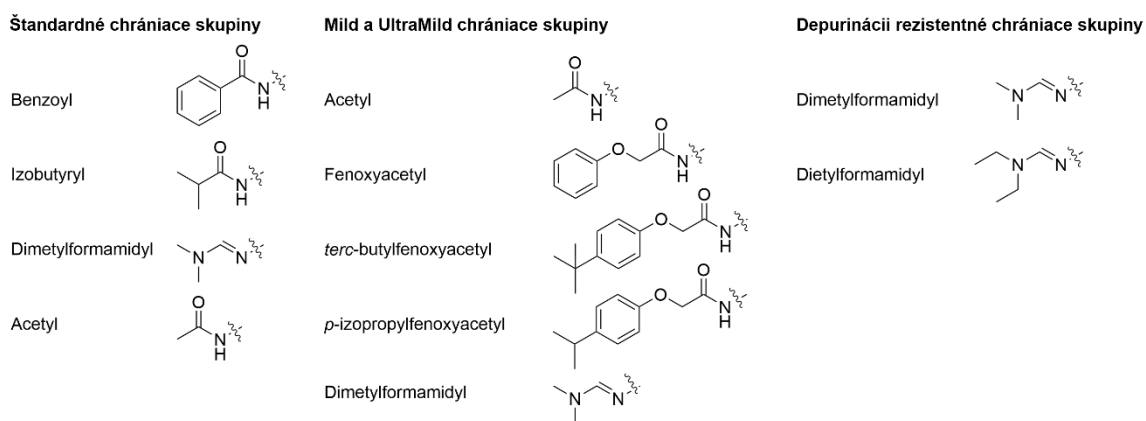
Syntéza ON reťazcov vyžaduje chránenie funkčných skupín deoxynukleotidov z dôvodu zabránenia nežiadúcim reakciám týchto funkčných skupín. Vývoj týchto chrániacich skupín prešiel od roku 1955, kedy bol prvýkrát publikovaný syntetický postup k príprave tymidyl dinukleotidu<sup>134</sup>, dlhú cestu<sup>157</sup> k dnes všeobecne používaným a komerčne dostupným chráneným fosforamiditovým monomérom. Obecne je možné rozdeliť chrániace skupiny fosforamiditových monomérov do kategórií podľa použitého typu chránenej funkčnej skupiny na:

1. Skupiny chrániace 5'-hydroxyl
2. Skupiny chrániace fosfát
3. Skupiny chrániace exocyklické aminoskupiny nukleových báz (Obrázok 31)

Dnes je na chránenie 5'-hydroxylovej skupiny takmer výhradne používaná dimetoxytritylová skupina. Rovnako na chránenie fosfátu je dnes takmer výhradne používaná 2-kyanoetylová skupina. Väčšia variabilita chrániacich skupín sa zachovala len pre exocyklické aminoskupiny nukleových báz. Chrániace skupiny nukleových báz je ďalej možné členiť podľa deprotektického činidla a typu nukleovej bázy, ktorú chráni na:

1. Štandardné skupiny chrániace:
  - a. Adenzín – benzoyl, fenoxycetyl, dietylformamidyl
  - b. Guanosín – izobutyryl, dimetylformamidyl, izopropylfenoxycetyl
  - c. Cytosín – benzoyl, acetyl
2. Mild a Ultra-Mild skupiny chrániace:
  - a. Adenzín – fenoxycetyl, *terc*-butylfenoxycetyl
  - b. Guanosín – dimetylformamidyl, izopropylfenoxycetyl, *terc*-butylfenoxycetyl
  - c. Cytosín – acetyl, *terc*-butylfenoxycetyl
3. Depurinácii rezistentné skupiny chrániace:
  - a. Adenzín – dietylformamidyl
  - b. Guanosín – dimetylformamidyl

Štandardné chrániace skupiny nukleových báz sa používajú v prípade neprítomnosti modifikácii ON reťazca citlivých k deprotektickým podmienkam (hydroxid amónny). V prípade prítomnosti modifikácie alebo modifikácií nestabilných v deprotektických podmienkach, je nutné použitie Ultra Mild chrániacich skupín. Depurinácii rezistentné chrániace skupiny sa využívajú v syntéze farmakologicky aktívnych ON, kde je veľmi dôležitý nízky počet abázických chýb.



Obrázok 31. Štruktúry používaných chrániacich skupín fosforamiditových monomérov. Skupiny sú znázornené už s väzbou na exocyklíckú aminoskupinu nukleových báz.

### 3.4.3.1 Deprotekcia oligodeoxynukleotidu

Deprotekciu oligodeoxynukleotidu je možné rozdeliť do troch častí, a to cleavage (odštiepenie oligodeoxynukleotidu z pevnej fázy), deprotekcii fosfátovej kostry oligodeoxynukleotidu a deprotekcii nukleových báz. Cleavage je možné urobiť samostatne, tj. oddelene od nasledujúcich častí (deprotekcii fosfátovej kostry a nukleových báz), alebo súčasne s nasledujúcimi časťami. Na samostatnú cleavage sa používajú rovnaké činidlá, s rozdielom reakčných podmienok.

#### 3.4.3.1.1 Štandardná deprotekcii

Štandardne chránené nukleové bázy sa bežne odchraňujú nasýteným roztokom hydroxidu amónneho vo vode (28 – 33 %). Bežne používaným deprotektčným činidlom je aj zmes hydroxidu amónneho a metylamínu v objemovom pomere 1:1 (tzv. AMA).<sup>158</sup> Ďalšou možnosťou je použitie 0,4 M hydroxidu sodného v zmesi MeOH s vodou 4:1.

#### 3.4.3.1.2 Ultra Mild deprotekcii

Ultra Mild chránené nukleové bázy sa odchraňujú Ultra Mild deprotektčným činidlami ako je 50 mM K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> v MeOH, *terc*-butylamín:MeOH:voda v pomere 1:1:2<sup>159</sup>, *terc*-butylamín:voda v pomere 1:3, alebo Ultra-UltraMild deprotektčné činidlo 10% diizopropylamín v 0,25M roztoku β-merkaptóetanolu v MeOH.<sup>160</sup> V závislosti na použítom deprotektčnom činidle sa líši reakčný čas a teplota.

### 3.4.4 Značenie ON

V súčasnosti prevládajú dva hlavné spôsoby značenia ON, a to na pevnej fáze (supporte) a v roztoku. Na pevnej fáze môže byť ON reťazec značený inkorporáciou modifikovaných fosforamiditových monomérov do reťazca ON počas jeho syntézy na pevnej fáze alebo postsyntetickým značením na pevnej fáze. Pri použití postsyntetického značenia ON v roztoku je ON najprv syntetizovaný na pevnej fáze, kedy sa do ON reťazca inkorporuje vhodná funkčná skupina (-NH<sub>2</sub>, -SH, atď.), a po deprotekcii je ON reťazec konjugovaný so značkou (väčšinou fluorofor).

#### 3.4.4.1 Postsyntetické značenie ON

Prítomnosť veľkého množstva potenciálne reaktívnych funkčných skupín v ON reťazci umožňuje používať na postsyntetické značenie ON len chemoselektívne ortogonálne reakcie prebiehajúce za miernych reakčných podmienok. Na postsyntetické značenie ON je nutné aby ON obsahoval vhodné reaktívne funkčné skupiny umožňujúce takéto značenie. Tieto funkčné skupiny sú do ON reťazca zavedené počas syntézy ON reťazca a v závislosti na type funkčnej skupiny môžu

byť zavedené na začiatok reťazca, tzn na 3'-koniec, do „stredú“ reťazca, či na 5'-koniec. Postsyntetické značenie ON môže prebiehať v roztoku, po deprotekcii, alebo na pevnej fáze, kde je ON ešte chránený chrániacimi skupinami. Obecnou výhodou postsyntetického značenia ON je nutnosť vývoja menšieho množstva fosforamiditových monomérov používaných na syntézu ON. Postsyntetické značenie ON zahŕňa samostatnú syntézu ON na pevnej fáze, deprotekcii, purifikáciu a následné značenie ON požadovanou značkou za vzniku stabilnej kovalentnej väzby medzi značkou a ON reťazcom. Na zavedenie vhodných reaktívnych funkčných skupín do reťazca ON sa používajú modifikované fosforamiditové monoméry.

Výhodou postsyntetického značenia v roztoku je možnosť použitia molekúl nekompatibilných s podmienkami používanými počas syntézy a hlavne deprotekcii ON reťazca, napr. skupina ATTO farbív. Dôležitou podmienkou postsyntetického značenia v roztoku je kompatibilita reakcií s vodným prostredím a rozpustnosť značiek vo vode. Nižšia rozpustnosť molekúl vo vode môže viesť k nižším výťažkom značenia. Nevýhodou tohto typu značenia je aj náročnejšie čistenie výsledného konjugátu.

V prípade postsyntetického značenia ON na pevnej fáze je ON stále viazaný na pevnú fázu a chránený chrániacimi skupinami. Výhodami tohto postupu značenia sú: značenie ON lipofilnými značkami, možnosť použitia iných rozpúšťadiel (MeOH, DCM atď.) a jednoduché čistenie značeného ON premytím pevnej fázy čistým rozpúšťadlom. Nevýhodou tohto postupu značenia je možnosť degradácie konjugátu pri deprotekcii ON (stabilita značky).

Obecne sa na postsyntetické značenie ON môžu použiť nasledovné reakcie:

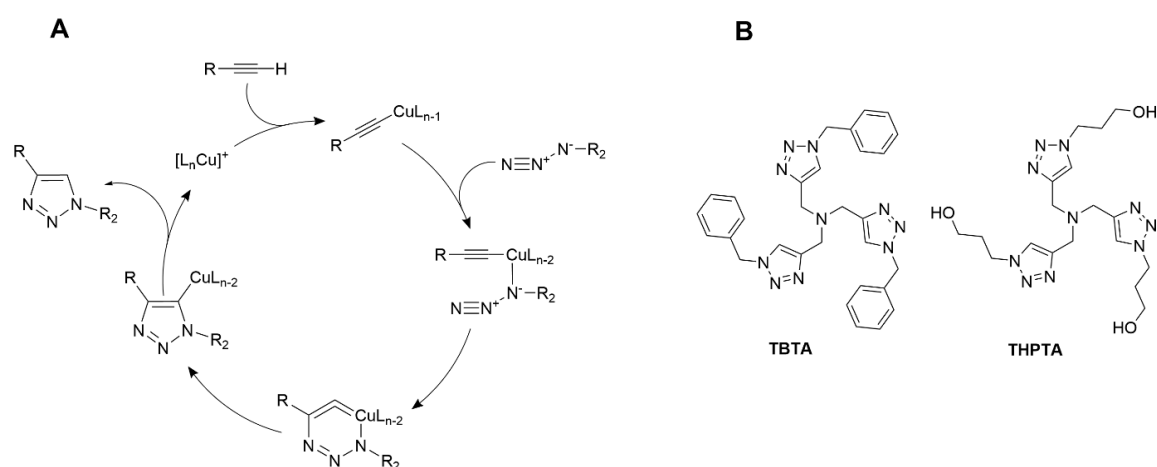
- NHS-esterov (NHS – *N*-hydroxysukcinimid)<sup>161-163</sup>
- Maleimidov<sup>164</sup>
- Tiolov<sup>165</sup>
- Reduktívna aminácia<sup>166</sup>
- Staudingerova ligácia<sup>167</sup>
- Aminooxyskupiny<sup>168, 169</sup> a hydrazínu<sup>170, 171</sup>
- Diels-Alderové cykloadície<sup>172</sup>
- Suzuki-Miyaura cross coupling<sup>173</sup>
- Sonogashira coupling<sup>174-176</sup>
- Azid-alkýn cykloadície – AAC (copper-catalyzed azide-alkyne cycloadditions – CuAAC,<sup>177-183</sup> strain promoted azide-alkyne cycloaddition – SPAAC<sup>184-187</sup>)

Vzhľadom na využitie v mojej dizertačnej práci, sa bližšie zameriam len na AAC.

#### 3.4.4.1.1 CuAAC („click“ chémia)

Azidoskupina a alkynyl sú pre svoju indiferentnosť voči väčšine funkčných skupín biologických látok ako sú cukry, NK, lipidy či proteíny, považované za bioortogonálne. Reakciou azidu s alkýnom vzniká 1,2,3-triazolový cyklus. Triazolový cyklus je veľmi stabilný a v prípade použitia organicky substituovaného azidu v reakcii s terminálnym alkýnom môže byť triazolový cyklus substituovaný v polohách 1 a 4 alebo 1 a 5. Hoci je 1,3-dipolárna cykloadícia (Huisgenova cykloadícia) známa už takmer stotridsať rokov,<sup>188</sup> jej využitie v príprave konjugátov biologických látok s množstvom organických molekúl nabralo na význame až po zavedení katalýzy meďnými kationmi.<sup>189, 190</sup> Za výskum a veľký prínos CuAAC a nižšie spomínanej SPAAC bola pre rok 2022 udelená Nobelova cena za chémiu.<sup>191</sup> Meďnými kationmi katalyzovaná reakcia poskytuje preferenčne 1,4-substituovaný triazolový cyklus (Obrázok 32A).<sup>189</sup> Veľkou výhodou CuAAC v porovnaní s inými spôsobmi postsyntetického značenia ON je, že prebieha takmer kvantitatívne.

CuAAC sa bežne používa na konjugáciu ON s malými organickými molekulami v pufrach (tlmivých roztokoch).<sup>178-180</sup> Meďné katióny sú nestabilné a vo vodných tlmivých roztokoch majú tendenciu k disproportionácii na kovovú meď ( $\text{Cu}^0$ ) a meďnaté katióny ( $\text{Cu}^{2+}$ ). Ligandy viažuce sa na meďné katióny, ako sú napr. s DNA kompatibilné tris(triazolyl)amínové ligandy (TBTA, THPTA, Obrázok 32B), stabilizujú meďné katióny voči oxidácii či disproportionácii. „Click“ reakcie katalyzované v komplexe viazanými meďnými katiónmi prebiehajú v porovnaní s reakciami katalyzovanými voľnými meďnými katiónmi až tisícnásobne rýchlejšie.<sup>192</sup> Pri značení nukleových kyselín pomocou CuAAC je najviac využívaná *in situ* príprava meďných katiónov, a to redukciami vo vode lepšie rozpustných meďnatých solí, pričom najčastejšie používaným redukčným činidlom je L-askorbát.<sup>193</sup> CuAAC je možné použiť aj na značenie ON na pevnej fáze. Na značenie je nutné použiť značky stabilné v deprotektčných podmienkach. Týmto spôsobom bolo pripravených niekoľko konjugátov ON napr. s cyanínovými farbivami (Cy3, Cy5),<sup>194, 195</sup> manózou,<sup>196</sup> pyrénom,<sup>197</sup> peptidov a iných malých molekúl.<sup>181, 182</sup> Ako rozpúšťadla bola v týchto reakciách použitá zmes vody s organickým rozpúšťadlom (MeOH, DMSO, *t*BuOH, ACN). Meďné katióny boli vo väčšine publikácií buď pripravené *in situ* použitím L-askorbátu sodného, alebo dodané priamo a vznikajúce meďnaté katióny boli redukované L-askorbátom sodným. Niektoré reakcie prebiehali pod inertným plynom ( $\text{Ar}^0$ ),<sup>194, 195</sup> ostatné prebiehali bez použitia inertného plynu. Obecne je pri CuAAC nutné do reakcii pridávať okrem meďných katiónov aj redukčné činidlo (L-askorbát), stabilizujúce ligandy (TBTA), či kosolventy (DMSO, *t*-BuOH). Podobne ako pri CuAAC v roztoku aj v prípade CuAAC na pevnej fáze hrozí degradácia ON či už pôsobením kombinácie meďných katiónov s L-askorbátom alebo samotných meďných či meďnatých katiónov. V oboch prípadoch meďné/meďnaté katióny produkujú ROS, ktoré oxidatívne štiepia ON (obecne DNA).<sup>198, 199</sup>



Obrázok 32. (A) Predpokladaný reakčný mechanizmus CuAAC,<sup>200</sup> (B) štruktúry ligandov používaných na stabilizáciu  $\text{Cu}^+$  katiónov

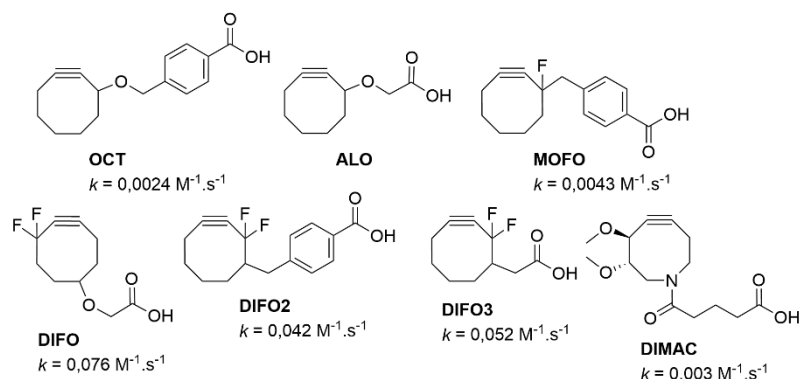
#### 3.4.4.1.2 SPAAC

Nutnosť používania meďných katiónov a ďalších aditív v CuAAC viedla k vývoju alternatívnych tzv. „copper-free click“ reakcií vhodných najmä na značenie biomolekúl v živých organizmoch. Bolo vyvinutých niekoľko typov „copper-free click“ reakcií, menovito SPAAC (pnutím podporená azid-alkýn cykloadícia),<sup>201</sup> konjugácia oxanorbordiékových derivátov s azidmi,<sup>202</sup> reakcie tetrazínov s alkénmi<sup>203</sup> a svetlom katalyzovaná alkén-tetrazolová reakcia.<sup>204</sup>

SPAAC je pnutím podporená reakcia cykloalkýnových derivátov s azidovou skupinou, ktorá prebieha aj bez katalýzy meďnými katiónmi. Pnutie a „aktivácia“ trojitej väzby vzniká uzavretím lineárnej trojitej väzby alkýnu do cyklu. Vďaka zakriveniu trojitej väzby (pnutiu) je alkýn tlačný do prechodného cykloadičného stavu. Reaktivita cykloalkýnov klesá v poradí cykloheptén >



cyklooktýn > cyklononýn. Stabilita cykloalkýnov klesá v opačnom poradí. Kompromisom medzi dostatočnou stabilitou a vysokou reaktivitou cykloalkýnov je cyklooktýn. Jeho reaktivita a stabilita je aj vo vodnom prostredí dostatočná. Reaktivitu cyklooktýnu je možné ďalej zvýšiť substitúciou elektrón-odťahujúcimi substituentmi ako je fluór, viz. Obrázok 33. Ďalšie zvýšenie reaktivity je možné dosiahnuť kondenzáciou s alifatickým či aromatickým cyklami, viz Obrázok 34.

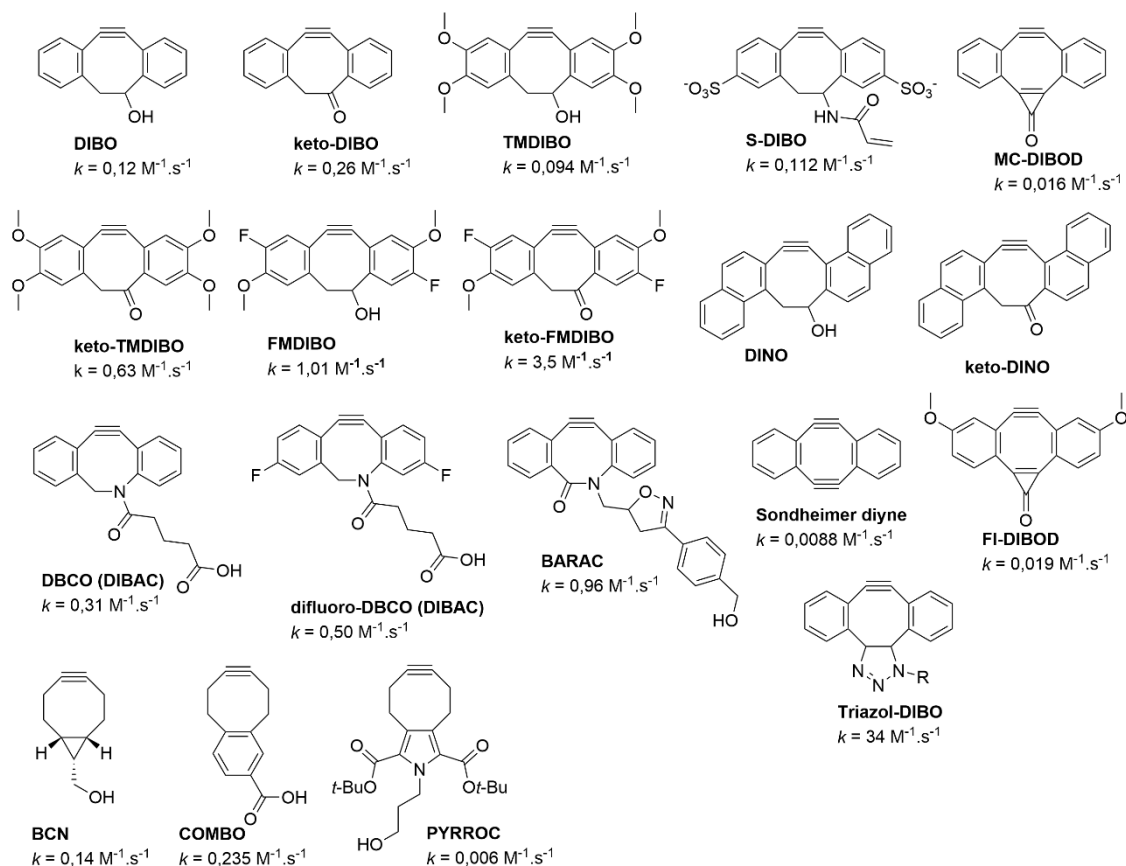


Obrázok 33. Štruktúry publikovaných substituovaných cyklooktýnov použitých pri značení biomolekúl ( $k$  – rýchlostná konštanta pre SPAAC).<sup>205</sup>

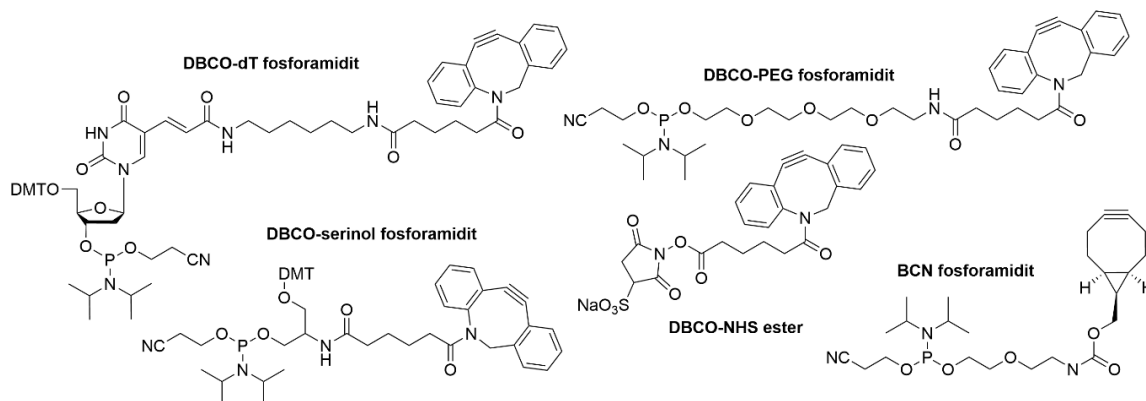
Za posledných 15 rokov bolo vyvinutých viac ako 15 cyklooktýnov substituovaných elektrónodťahujúcimi substituentmi (Obrázok 33, Obrázok 34). Takto substituované cyklooktýny majú až stošesťdesiatpäťkrát vyššiu reaktivitu v porovnaní s nesubstituovaným cyklooktýnom.<sup>205, 206</sup> V súčasnosti sú komerčne dostupné deriváty DIMAC, DIBO, DBCO, BCN, ktoré sú vhodné obecné na SPAAC. Na značenie ON pomocou SPAAC boli vyvinuté a v súčasnosti sú komerčne dostupné fosforamiditové monoméry nesúce DBCO a BCN (Obrázok 35). DBCO môže byť viazané na 5'-fosforamidit prípadne na modifikovanú bázu dT. BCN je vďaka inkompatibilite s TCA, používanou pri syntéze ON, možné viazať len na 5'-koniec ON reťazca, prípadne na 3'-koniec za predpokladu použitia DCA na deprotekcii počas syntézy ON.<sup>184</sup> BCN je preto ako fosforamidit komerčne dostupné len vo forme 5'-fosforamiditu. DBCO-dT má v porovnaní s BCN veľkú výhodu v možnosti inkorporácie (DBCOdT) do akejkoľvek pozície v reťazci syntetizovaného ON.

Reakčná rýchlosť SPAAC je závislá nielen na substitúcii cyklooktýnu, ale aj organického azidu a ďalej na rozpúšťadle. Najčastejšie používanými azidmi v SPAAC s dibenzocyklooktýnmi sú alifatické azidy. Ojedinelé používanie aromatických azidov v SPAAC vychádza z poznatkov o sedemkrát nižšej reaktivite aromatických azidov v porovnaní s azidometylovým analógom<sup>207</sup> a ovplyvňovaní reakčnej rýchlosti elektrónodťahujúcimi substituentmi.<sup>208</sup> Naopak reakcie aromatických azidov s BCN sú pozitívne ovplyvnené substitúciou aromatického azidu elektrónodťahujúcimi substituentmi.<sup>208</sup> SPAAC je ďalej ovplyvnená aj použitým rozpúšťadlom. Prítomnosť vody v reakčnej zmesi má pozitívny vplyv na reakčnú rýchlosť.<sup>205</sup>

Kondenzované cyklooktýny sú bežne používané na konjugáciu ON s rôznymi látkami (peptidy, protilátky, enzýmy, ON)<sup>186, 187, 209-216</sup> a povrchmi.<sup>216-222</sup> Zmienok o značení ON malými molekulami prostredníctvom DIBO, či DBCO je veľmi málo.<sup>185, 223</sup> ON je možné pomocou DBCO značiť na pevnej fáze aj v roztoku.



Obrázok 34. Štruktúry kondenzovaných cyklooktýnov použitých na značenie biomolekúl ( $k$  – rýchlostná konštanta pre SPAAC).<sup>205, 224</sup>



Obrázok 35. Prehľad komerčne dostupných fosforamiditových monomérov nesúcich DBCO ([glenresearch.com](http://glenresearch.com)) a BCN ([lumiprobe.com](http://lumiprobe.com) či [Biotechsearch Technologies](http://Biotechsearch Technologies)). DBCO je dostupné aj vo forme NHS-esteru ([glenresearch.com](http://glenresearch.com)).

## 4 Výsledky a diskusia

Počas svojho doktorského štúdia som sa zaoberal syntézou akridínových derivátov vhodných na stabilizáciu duplexov DNA a modifikáciu ON. Na účely porovnania stabilizačných vlastností akridínových derivátov bol pripravený derivát Hoechstu 33258 a azidoderivát spermínu. Syntetická časť mojej práce zahŕňala prípravu prekursorov, z ktorých som neskôr niekoľkokrokovou syntézou pripravil konečné látky. U látok boli fotofyzikálnymi meraniami určené absorpčné, excitačné a emisné spektrá. Súčasťou mojej práce bola aj príprava, čistenie a testovanie modifikovaných ON sond. Príprave modifikovaných sond predchádzalo testovanie pripravených akridínových derivátov na schopnosť stabilizácie duplexov DNA voľne v roztoku, ktoré bolo robené v spolupráci s kolegami z firmy Generi Biotech. Na základe výsledkov z týchto meraní boli vybrané akridínové deriváty najviac stabilizujúce duplex DNA. Tieto akridínové deriváty boli potom pomocou click chémie kovalentne naviazané na ON sondy na pevnej fáze. Rovnakým postupom boli pripravené sondy modifikované derivátom Hoechst 33258 a derivátom spermínu. S akridínmi konjugované ON sondy a sondy konjugované derivátom Hoechst 33258 a spermínu boli následne testované pomocou reálneho systému na detekciu sekvenčných variantov HFE génu.

Hlavnou publikáciou, na ktorej som uvedený ako prvý autor je Thermal stabilisation of the short DNA duplexes by acridine-4-carboxamide derivatives. Táto publikácia bude z dôvodu prehľadnosti v tejto časti citovaná ako [P1]. Ide o recenzovanú publikáciu prijatú do časopisu *Nucleic Acids Research*. Ďalšie publikácie, na ktorých som uvedený ako spoluautor vychádzajú z mojej diplomovej práce a tematicky nesúvisia s témou dizertačnej práce, preto nie sú v texte spomenuté.

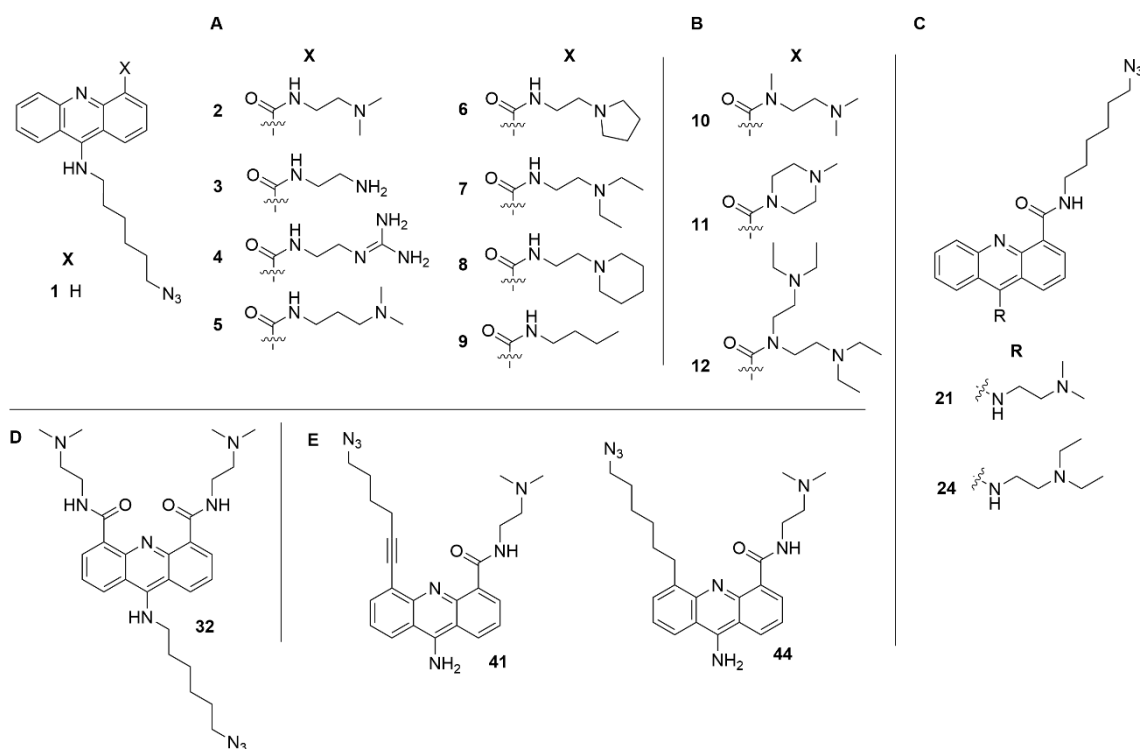
V rámci svojej dizertačnej práce som pracoval na syntézach akridínov, modifikácii spermínu a Hoechst 33258. Ďalej som pripravil konjugáty ON sond s jednotlivými typmi stabilizátorov (akridíny, spermín, Hoechst), tieto konjugáty som následne analyzoval na HPLC a pomocou semipreparatívnej HPLC som tieto konjugáty čistil. V ďalšej časti svojej dizertačnej práce som vyhodnocoval výsledky jednotlivých testov (termálna stabilizácia duplexov látkami voľne v roztoku a konjugovaných s ON sondami) konjugátov ON sond. Študoval som interakciu akridínov s DNA (ss-, dsDNA, AT-, GC-bohatá sekvencia a HFE sekvencia) pomocou absorpčných a fluorescenčných titrácií. Študoval som aj použitie akridínov súčasne ako reportérov a stabilizátorov duplexu DNA.

V spolupráci s kolegami zo spoločnosti Generi Biotech boli pripravené stabilizátory (akridíny, spermín a Hoechst) testované na schopnosť zvyšovať termálnu stabilitu DNA duplexu voľne v roztoku. Takisto boli v spolupráci s kolegami z Generi Biotech testované duplexy konjugátov ON sond s jednotlivými stabilizátormi na schopnosť stabilizácie duplexov týchto konjugátov. Následne bola testovaná schopnosť diskriminovať bodové zmeny HFE génu v použitej sekvencii. Modelový test v PCR systéme prebehol takisto v tejto spoločnosti.

### 4.1 Syntéza

Návrh akridínov vychádzal z publikácie *Design and synthesis of threading intercalators to target DNA*,<sup>225</sup> v ktorej autori popísali niekoľko látok odvodených od akridín-3-karboxamidov alebo akridín-4-karboxamidov, ich silnú väzbu na DNA a protinádorové účinky. Z týchto látok sa ako najvhodnejšie ukázali byť deriváty akridín-4-karboxamidov, u ktorých sme očakávali, že silná väzba na DNA pôjde ruka v ruke so schopnosťou akridínov zvyšovať termálnu stabilitu duplexov. Preto sme sa najprv sústredili na 1. (1 a sekundárne amidy 2 – 9) a 2. sériu (terciárne amidy 10 - 12) akridín-4-karboxamidov, na ktorých sme chceli určiť základné vzťahy medzi štruktúrou

a schopnosťou zvyšovať termálnu stabilitu duplexov DNA (Obrázok 36A,B). Voľná alifatická bázičná skupina podľa literatúry prispieva k interakcii vo veľkom žliabku<sup>226</sup> a azidoskupina bola následne využitá na naviazanie na ON sondu pomocou click chémie. V ďalšej fáze sme sledovali, či otočenie substituentov na akridínovom jadre (3. séria) povedie k zmenám v aktivite (**21** a **24**, Obrázok 36C). Podobne bola navrhnutá aj 4. séria, kde bola do štruktúry akridínu zavedená ďalšia karboxamidová skupina v polohe 5 (Obrázok 36D). Posledná, 5. séria, bola navrhnutá tak, aby sa bázičná skupina viazaná cez karboxamidovú skupinu a linker nesúci azidoskupinu nachádzali na rovnakej strane akridínu (Obrázok 36E). Cieľom posledného návrhu bolo taktiež zaviesť na akridínové jadro linker nesúci azidoskupinu pomocou väzby uhlík-uhlík (C-C), aby bolo možné neskôr pri deprotekcii ON sondy konjugovanej s týmto akridínom používať štandardné deprotektčné činidlá (napr. koncentrovaný NH<sub>4</sub>OH).



Obrázok 36. Štruktúry akridínov, (A) 1. séria, (B) 2 séria, (C) 3. séria, (D) 4. séria, (E) 5. séria.

#### 4.1.1 Syntéza derivátov antranilovej kyseliny a derivátov akridónu

Syntéza substituovaných akridínov najčastejšie vychádza z derivátov substituovanej kyseliny antranilovej. Vhodne substituované deriváty kyseliny antranilovej je možné syntetizovať z komerčne dostupných prekursorov. Podmienky Ullmannovej kondenzácie sa líšili použitým katalyzátorom a reakčným časom. Syntéza látky **13** a **14** v tejto práci vychádzala z kyseliny antranilovej, prípadne anilínu, a kyseliny 2-chlórbenzoovej, ktoré v prostredí vysokovriaceho izoamylalkoholu a za katalýzy práškovou meďou podstupovali Ullmannovu kondenzáciu [P1]. Tieto látky boli použité ako prekursor v ďalších reakciách. Akridón **15** bol pripravený reakciou látky **14** a POCl<sub>3</sub>. Pri použití POCl<sub>3</sub> dochádza k intramolekulárnej acylácii za súčasnej substitúcie hydroxylovej skupiny enol formy vzniknutého akridónu za chlór. Pri tejto reakcii dochádza aj k tvorbe chloridu karboxylovej kyseliny potrebného na prípravu metylesteru v akridóne **15** (Schéma 1). Reakciou chloridu 9-chlórakridín-4-karboxylovej kyseliny s MeOH dochádzalo k esterifikácii karboxylovej skupiny. Súčasne dochádzalo k substitúcii chlóru v polohe 9 za hydroxyskupinu, ktorá okamžite prechádza z enolformy na stabilnejšiu ketoformu. Takto pripravený metylester **15** bol používaný ako východisková látka pre všetky syntézy prvej, druhej a

tretej série akridínov. Na syntézu prekursoru štvrtej série bola použitá kyselina antranilová, ktorá reakciou s halogénom (bróm) substituovanou kyselinou izoftalovou (Schéma 1) poskytla látku **25**. Jej reakciou v koncentrovanej  $H_2SO_4$  bola pripravená kyselina **26**. Z nej bol prevedením na dichlorid kyseliny 9-chlórankridín-4,5-dikarboxylovej a následnou reakciou s MeOH pripravený diester **27**. Jednoduchším a kratším postupom syntézy diesteru **27** bolo použitie  $POCl_3$  s látkou **25**, kedy došlo k vytvoreniu dichloridu kyseliny 9-chlórankridín-4,5-dikarboxylovej, ktorý bol rovno prevedený na diester **27** bez nutnosti izolácie medziproduktu. Diester **27** slúžil ako východisková látka na syntézy štvrtej série akridínov. Piata séria akridínov vychádzala z 2-amino-3-jódbenzoovej kyseliny. Jej reakciou s 2-jódbenzoovou kyselinou bola pripravená kyselina **33**. Jej reakciou s  $POCl_3$  a následne MeOH bol pripravený metylester **34** (Schéma 1), ktorý slúžil ako východisková látka pre syntézy piatej série akridínov.

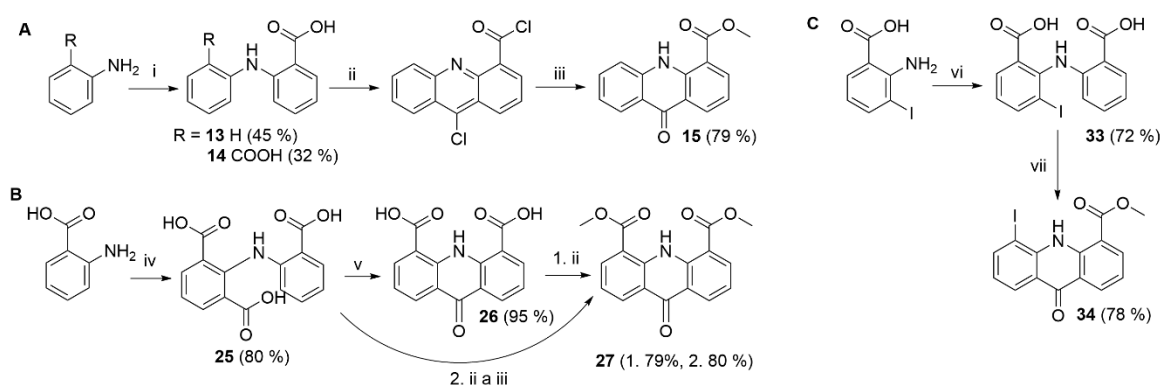


Schéma 1. Schéma prípravy akridónu na prípravu (A) 1., 2. a 3. série akridinových derivátov, (B) 4. série akridinových derivátov, (C) 5. série akridinových derivátov. i)  $Cu^0$ ,  $K_2CO_3$ , izoamylalkohol, 2-chlórbenzoová kyselina,  $140^\circ C$ , 12 h; ii)  $POCl_3$ ,  $140^\circ C$ , 1 h; iii) MeOH,  $50^\circ C$ , 12 h; iv)  $Cu^0$ , CuI,  $K_2CO_3$ , izoamylalkohol, 2-bromizoftalová kyselina,  $140^\circ C$ , 1 h; v)  $H_2SO_4$ ,  $105^\circ C$ , 1 h; vi)  $Cu^0$ ,  $Cu_2O$ ,  $K_2CO_3$ , izoamylalkohol, 2-jódbenzoová kyselina,  $140^\circ C$ , 3 h; vii) 1.  $POCl_3$ ,  $100^\circ C$ , 1 h; 2. MeOH,  $50^\circ C$ , 12 h.

#### 4.1.2 Syntéza 1. a 2. série akridínových derivátov

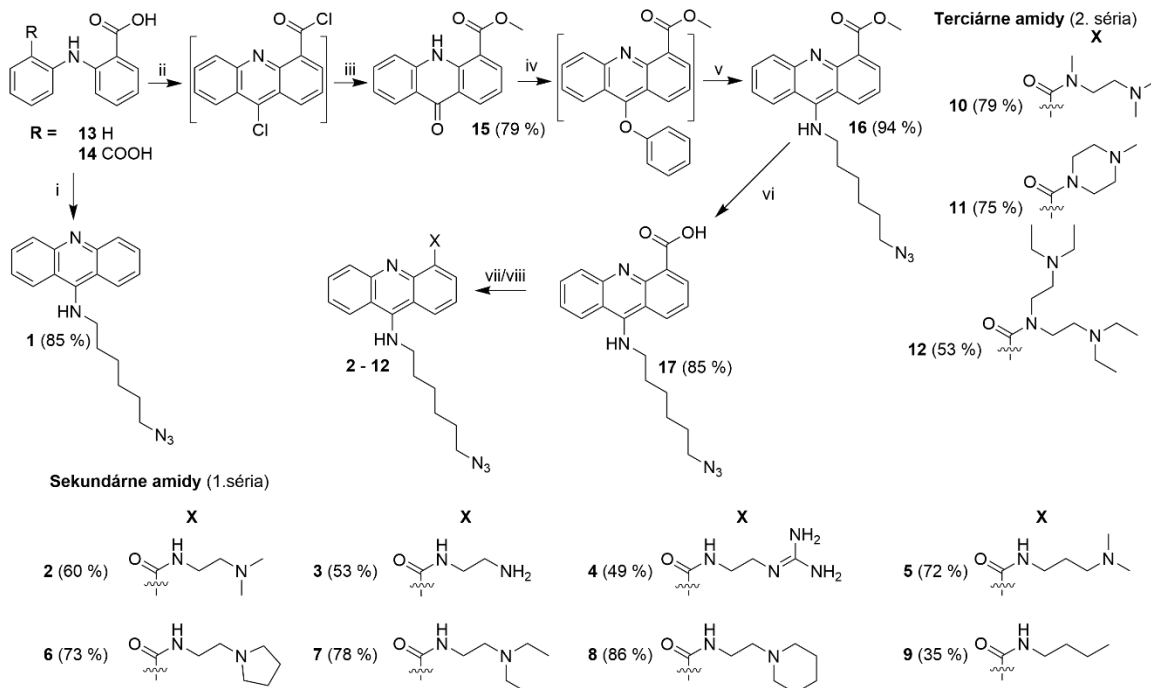


Schéma 2. Syntéza akridínových derivátov **1 – 12**. Reakčné podmienky: i) 1. **13**,  $POCl_3$ ,  $140^\circ C$ , 1 h; 2. fenol,  $110^\circ C$ , 15 min; 3. 6-azidoheptyl-1-amin,  $55^\circ C$ , 24 h; ii) **14**,  $POCl_3$ ,  $140^\circ C$ , 1 h; iii) MeOH,  $50^\circ C$ , 12 h; iv) 1.  $SOCl_2$ ,  $80^\circ C$ , 1 h; 2. fenol,

110 °C, 15 min; v) 6-azidohexyl-1-amín, 55 °C, 24 h; vi) THF, nadbytok nasýteného roztoku NaOH v zmesi MeOH:H<sub>2</sub>O 5:1, 50 °C, 1 h; vii) 1. SOCl<sub>2</sub>, rt, 1 h; 2. amín (1 ekvív.), TEA (4 ekvív.), DCM, 0 °C, 30 min / viii) HBTU (2 ekvív.), TEA (2 ekvív.), DCM, amín (2 ekvív.), -10 °C, 30 min. Látka **2 – 12**, okrem látky **9**, boli prevedené na odpovedajúce hydrochloridy.

Syntéza substituovaných akridínových derivátov prvej (sekundárne amidy) a druhej (terciárne amidy) série vychádzala z metylesteru **15** (Schéma 1A), ktorého enol forma podstupovala nukleofilnú substitúciu pôsobením chloračného činidla na príslušný derivát 9-chlórakridínu. Nukleofilná substitúcia chlóru v polohe 9 za fenoxyskupinu prebieha pomerne ľahko. Následnou reakciou chlór derivátov v tavenine fenolu vznikol príslušný aktivovaný 9-fenoxyakridínový derivát. Táto reakcia sa štandardne používa na prípravu 9-(alkyl)amino substituovaných akridínov. Aktivovaný 9-fenoxyderivát akridínu reaguje pomerne ľahko s nukleofilmi ako sú napr. alifatické amíny alebo amoniak. Pridaním 6-azidohexán-1-amínu do reakčnej zmesi bol pripravený metyl ester **16**, ktorý slúžil na prípravu kyseliny **17** (Schéma 2). Tá bola použitá ako východisková látka na syntézu akridínových derivátov 1., 2. série s výnimkou látky **1**, ktorá nenesie finálnu karboxamidovú skupinu. Akridín-4-karboxamidy 1. a 2. série boli následne pripravené dvoma spôsobmi.[P1]

Prvým spôsobom prípravy akridín-4-karboxamidov bola reakcia akridín-4-karboxylovej kyseliny s príslušným amínom za prítomnosti aktivátoru (1*H*-benzotriazol-1-yloxy)(dimetylamino)-*N,N*-dimetylmétánimínium hexafluorofosfátu (HBTU). V tomto prípade bolo potrebné metylester najskôr previesť bázickou hydrolyzou na karboxylovú kyselinu, či jej soľ, ktorá následne reagovala s aktivátorom za vzniku *N*-akridín-4-oyloxybenzotriazolu. Ten podstupoval nukleofilnú substitúciu len v prípade použitia príslušných primárnych amínov. Reakcie so sekundárnymi amínmi neprebehli (Tabuľka 1).

Tabuľka 1 Výťažky jednotlivých akridínových derivátov pripravených dvoma metódami syntézy.

Číslo látky	<b>2</b>	<b>3-Boc</b>	<b>4-Boc</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>11</b>	<b>12</b>
Výťažok syntézy s HBTU (%)	30	24	21	33	17	21	15	23	0	0	0
Výťažok syntézy s SOCl <sub>2</sub> (%)	60	63	88	72	73	78	86	35	79	75	53

Pretože reakcie so sekundárnymi amínmi neprebehli a výťažky u primárnych amínov boli pomerne nízke, pristúpili sme k alternatívne postupu amidácie. Druhým spôsobom prípravy akridín-4-karboxamidov bola reakcia chloridu akridín-4-karboxylovej kyseliny s príslušným amínom za prítomnosti bázy (Schéma 2). Aj v tomto prípade bolo potrebné hydrolyzovať metylester na karboxylovú kyselinu, či jej soľ, ktorá bola následne prevedená na chlorid kyseliny. Ten veľmi ochotne podstupuje nukleofilnú substitúciu s príslušným amínom. Veľkou výhodou tohto postupu boli vyššie výťažky reakcií v porovnaní s prvým postupom využívajúcim aktivátor a hlavne možnosť prípravy derivátov substituovaných sekundárnymi amínmi (Schéma 2). Aktívne skupiny látok **3-Boc** (amino) a **4-Boc** (guanidino) bolo potrebné ochrániť *t*-butoxykarbonylom (Boc) pred amidáciou. Následne bola chrániaca skupina odstránená pomocou TFA.

#### 4.1.3 Syntéza 3. série akridínových derivátov („obrátene deriváty“)

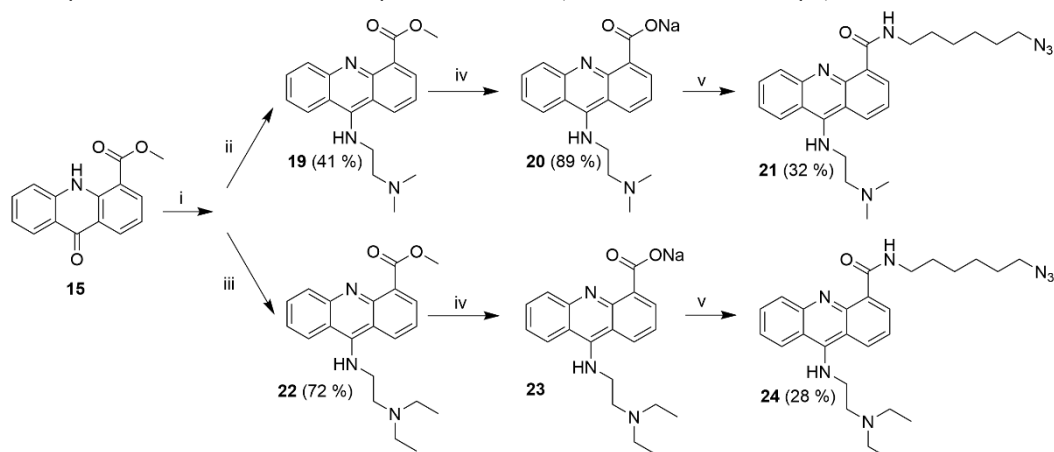


Schéma 3. Syntéza akridínových derivátov **19** – **24**. Reakčné podmienky: i)  $\text{SOCl}_2$ , 80 °C, 1 h; ii) 1. fenol, 110 °C, 15 min; 2. *N,N*-dimetyletán-1,2-diamín, 55 °C, 24 h; iii) 1. fenol, 110 °C, 15 min; 2. *N,N*-dietyletán-1,2-diamín, 55 °C, 24 h; iv) THF, nadbytok nasýteného roztoku NaOH v zmesi MeOH:H<sub>2</sub>O 5:1, rt, 5 min; v) HBTU, TEA, 6-azidohexán-1-amín, rt, 24 h.

Syntéza 3. série vychádzala rovnako ako syntéza 1. a 2. série akridínových z látky **15** (Schéma 1A). Na substitúciu v polohe 9 boli v tejto sérii použité *N,N*-dimetyletán-1,2-diamín a *N,N*-dietyletán-1,2-diamín, ktoré boli v predchádzajúcich sériách použité ako substituenty karboxamidovej skupiny. Substitúcia v polohe 9 prebiehala za rovnakých podmienok ako príprava látky **16**. Následná bázičná hydrolýza príslušných metylesterov **19** a **22** prebiehala v porovnaní s hydrolýzou látky **16** rýchlejšie. Na hydrolýzu metylesterov **19** a **22** stačilo do reakcie za miešania pridať nasýtený roztok hydroxid sodného v zmesi MeOH:H<sub>2</sub>O 5:1, bez nutnosti dlhšieho miešania pri laboratórnej teplote. Syntéza príslušných *N*-6-azidohexyl karboxamidov (**21** a **24**, Schéma 3) prebiehala s pomocou aktivátoru HBTU. Boli pripravené dva konečné deriváty. Látka **24** nepreukázala schopnosť stabilizovať duplex DNA pri testovaní jej schopnosti stabilizovať DNA duplex v roztoku. Z tohto dôvodu sa so syntézou ďalších derivátov tejto série nepokračovalo.

#### 4.1.4 Syntéza 4. série akridínových derivátov

Syntéza 4. série akridínových derivátov vychádzala z diesteru **27**. Syntéza látky **28** bude diskutovaná až v kapitole popisujúcej syntézu 5. série. Látka **29** (Schéma 4) bola pripravená obdobným spôsobom ako látka **16** (Schéma 2). Rozdiel bol v reakčnom čase s  $\text{POCl}_3$ , kedy bolo potrebné nechať látku **27** reagovať o 30 minút dlhšie kvôli zlej rozpustnosti. Následné pokusy s prípravou dikarboxylátu sodného **30** neboli úspešné, a preto aj napriek hroziacej von Braunovej degradácii amidov<sup>227, 228</sup> v prostredí  $\text{POCl}_3$  či  $\text{SOCl}_2$  bola pripravená najprv látka **31** (Schéma 4). Tá bola reakciou s  $\text{SOCl}_2$  prevedená na 9-chlór derivát, ktorý bol ďalej použitý na syntézu finálnej látky **32**. Látka **32** sa podarilo získať v prekvapujúco dobrom výťažku 44 %, a to pravdepodobne súhrou niekoľkých faktorov ako bolo skrátenie reakčného času a znížená elektrónová hustota na karboxamidových skupinách látky **31**.

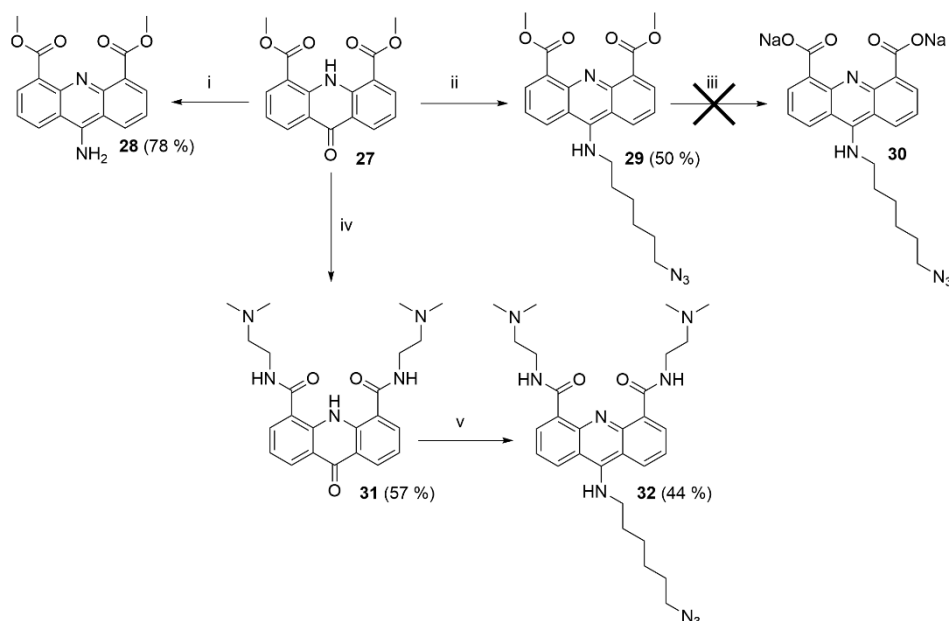


Schéma 4. Syntéza akridínov **28–32**. i) 1.  $\text{POCl}_3$ ,  $140^\circ\text{C}$ , 1 h; 2. fenol,  $110^\circ\text{C}$ , 15 min; 3.  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ ,  $55^\circ\text{C}$ , 1 h; ii) 1.  $\text{POCl}_3$ ,  $140^\circ\text{C}$ , 1,5 h; 2. fenol,  $110^\circ\text{C}$ , 15 min; 3. 6-azidohehyl-1-amín,  $55^\circ\text{C}$ , 16 h; iii) THF, nadbytok nasýteného roztoku NaOH v zmesi MeOH:H<sub>2</sub>O 5:1, rt; iv) *N,N*-dimetyletán-1,2-diamín,  $108^\circ\text{C}$ , 24 h; v) 1.  $\text{SOCl}_2$ ,  $85^\circ\text{C}$ , 30 min; 2. fenol,  $110^\circ\text{C}$ , 15 min; 3. 6-azidohehyl-1-amín,  $55^\circ\text{C}$ , 24 h.

#### 4.1.5 Syntéza 5. série akridínových derivátov

Vzhľadom na nestabilitu väzby C-N v polohe 9 akridínového jadra v prítomnosti štandardne používaných deprotečných činidiel (koncentrovaný  $\text{NH}_4\text{OH}$ <sup>114</sup> alebo AMA) u všetkých predchádzajúcich sérií, bola 5. séria akridínov vyvinutá za účelom prípravy látok stabilných v štandardne používanom deprotečnom prostredí. Súčasne sme sa zamerali na zmenu polôh bázičného reťazca a linkeru s azidoskupinou, ktoré môžu viesť k inému typu interakcie s finálnym duplexom. Na syntézu piatej série akridínov bolo potrebné zvoliť nový prekursor, kyselinu 2-amino-3-jódbenzoovú (Schéma 1C). Následná Ullmannova kondenzácia s kyselinou 2-jódbenzoovou poskytla kyselinu **33**, ktorá bola pomocou  $\text{POCl}_3$  a následne MeOH prevedená na metylester **34**. Ten bol použitý ako východisková látka na syntézy piatej série akridínov. Z látky **34** bol pomocou Sonogashirovho couplingu pripravený 5-alkynylovaný derivát **35** s hydroxylovou skupinou na konci hexynylového reťazca. Z nej bol pripravený príslušný metánsulfonát, z ktorého bol *in situ* pripravený azidoderivát **36**. Z tohto azidoderivátu bolo potrebné pripraviť 9-aminoderivát **37**. V tomto prípade poslúžila modelová syntéza látky **28** zo 4. série, ktorá bola pripravená za účelom overenia možnosti použitia  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$  ako alternatívneho zdroja aminoskupiny v polohe 9 k štandardne používanému plynnému amoniaku. Príprava látky **28** bola úspešná s výťažkom 78 %, a preto je možné tento spôsob prípravy 9-aminoderivátov akridínov použiť ako vhodnejší. Následný pokus o prípravu látky **37** nebol úspešný, nie však kvôli aminačnému činidlu. Pri tejto reakcii došlo primárne k intramolekulárnej cykloadícii azidu na trojitú väzbu a bola pripravená látka **37-1** (Schéma 5). Látka **36** bola použitá taktiež na modelovú reakciu aminolýzy metylesteru, ktorá poskytla požadovaný produkt **38** v nižšom výťažku (35 %). Látka **38** nebola prevedená na 9-aminoderivát, a to už z vyššie spomínaného dôvodu intramolekulárnej cykloadície.



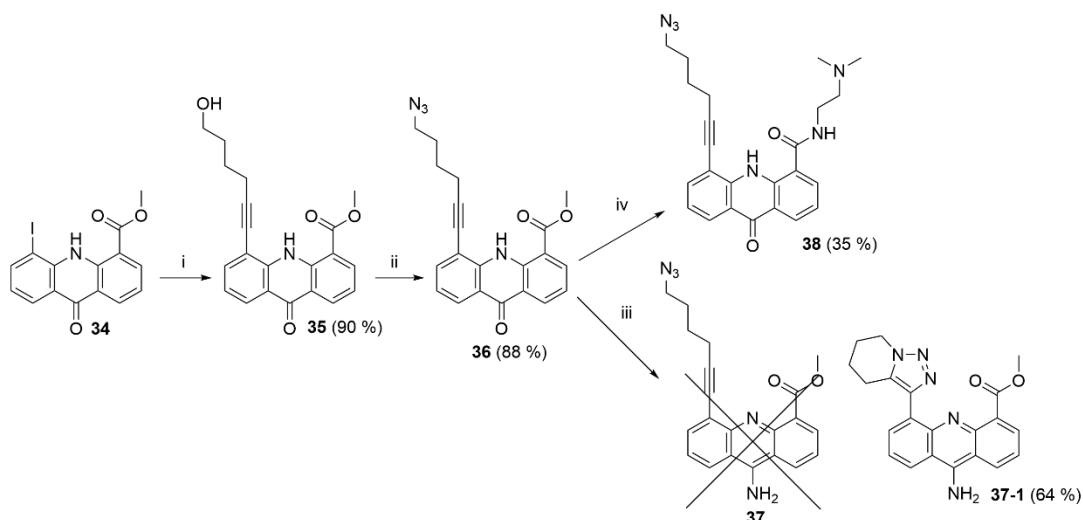


Schéma 5. Syntéza akridínov **35** – **38-1**. i)  $\text{CuI}$ ,  $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ ,  $\text{CHCl}_3$ ,  $\text{TEA}$ , hex-5-ýn-1-ol, 30 min, 60 °C; ii) 1.  $\text{DCM}$ ,  $\text{TEA}$ ,  $\text{MsCl}$ ; 2.  $\text{NaN}_3$ ,  $\text{DMF}$ , 3 h, 60 °C; iii) 1.  $\text{POCl}_3$ , 140 °C, 1 h; 2. fenol, 110 °C, 15 min; 3.  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ , 55 °C, 1 h; iv)  $\text{N,N}$ -dimetyletán-1,2-diamín, 108 °C, 1 h.

Po týchto nie veľmi úspešných pokusoch bola zvolená nová syntetická stratégia. Látka **34** bola pomocou  $\text{SOCl}_2$  prevedená na aromatický 9-chlóorderivát, ktorý bol použitý na prípravu látky **39**. Na prípravu tejto látky bol ako zdroj aminoskupiny použitý vyššie spomínaný  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ . Produkt bol získaný vo vysokom výťažku, takmer 90 %. Následne bola pripravená a izolovaná látka **37** (Schéma 6). Pokusy o jej charakterizáciu neboli úspešné, vzhľadom na jej nestabilitu. Pri čistení pomocou stĺpcovej chromatografie sa látka nerozkladala, no k jej čiastočnému rozkladu dochádzalo vždy pri pokuse o oddestilovanie rozpúšťadiel mobilnej fázy za zníženého tlaku aj teploty. Čisté NMR spektrum tejto látky sa nepodarilo získať. V tomto momente bola zvolená ďalšia syntetická stratégia vychádzajúca z látky **39**. Z nej bola aminolýzou pripravená látka **40** s vysokým výťažkom 91 %. Látka **40** bola podrobená Sonogashirovemu couplingu s hex-5-ýn-1-metánsulfonátom za vzniku nestabilného medziproduktu, ktorý bol bez čistenia prevedený na finálny azidoderivát **41** (Schéma 6). Látku sa podarilo pripraviť pri reakcii v malom množstve (100 mg) s výťažkom 47 %. Pokusy o prípravu väčšieho množstva látky dosahovali omnoho nižšie výťažky spôsobené intramolekulárnou click reakciou (Schéma 6).

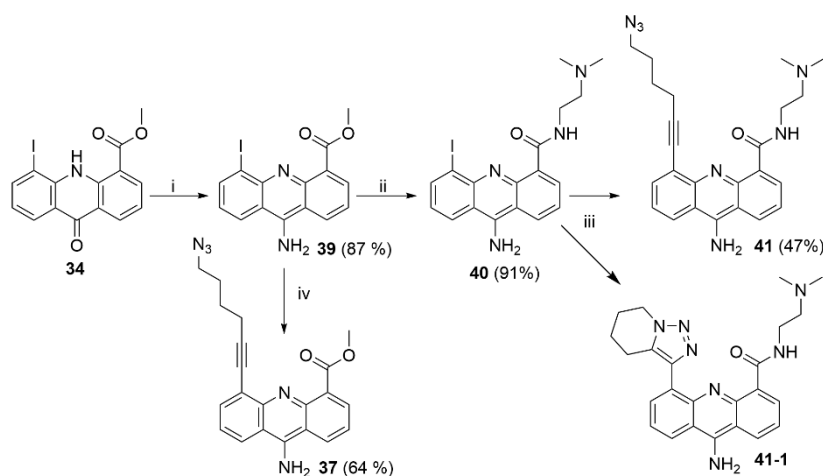


Schéma 6. Syntéza akridínov **37**, **39** – **41**. i) 1.  $\text{SOCl}_2$ , 80 °C, 1 h; 2. fenol, 110 °C, 15 min; 3.  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ , 65 °C, 1 h; ii)  $\text{N,N}$ -dimetyletán-1,2-diamín, 60 °C, 4 h; iii)  $\text{CuI}$ ,  $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ ,  $\text{CHCl}_3$ ,  $\text{TEA}$ , hex-5-ýn-1-metánsulfonát, 60 °C; iv) 1.  $\text{CuI}$ ,  $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ ,  $\text{CHCl}_3$ ,  $\text{TEA}$ , hex-5-ýn-1-yl metánsulfonát, 45 °C, 2 h; 2.  $\text{NaN}_3$ ,  $\text{DMF}$ , 3 h, 60 °C.

Kvôli zabráneniu intramolekulárnej cykloadícií sme sa rozhodli pripraviť derivát akridínu **44** s redukovanou trojitou väzbou. Jeho syntéza najprv vychádzala z látky **40** (Schéma 7). Sonogashirovým couplingom bola pripravená látka **42** s hydroxyskupinou na konci hexynylového reťazca. V porovnaní s couplingom látky **34** (metylester akridónu) prebiehal coupling v tomto prípade pomalšie a potreboval o 2,5 h dlhší reakčný čas. Na redukcii trojitej väzby látky **42** bolo potrebné túto látku najprv rozpustiť vo vhodnom rozpúšťadle (kompatibilnom s použitým reduktorom H-Cube®). Následne bolo potrebné optimalizovať podmienky redukcie, kedy bolo zistené, že za tlaku 10 bar prebiehala redukcia na dvojitú väzbu. Zvýšením tlaku v reakcii na 30 bar došlo k redukcii na dvojitú a jednoduchú väzbu. Následne bol tlak zvýšený na 50 bar a prietok celou s katalyzátorom znížený na 0,5 ml/min, čo viedlo k redukcii na jednoduchú väzbu (látka **43**). Látka **43** bola znečistená približne 10 % látky s dvojitou väzbou (podľa údajov z TLC-MS). Ďalšie zvýšenie tlaku na 70 bar neprinieslo zlepšenie redukcie trojitej väzby, naopak došlo k výraznému rozkladu látky **43**. V ďalšom kroku reagovala látka **43** s MsCl, avšak k vytvoreniu produktu nedošlo pravdepodobne kvôli reakcii s aromatickou aminoskupinou v polohe 9. Preto bola ako východisková látka pre ďalšie syntézy zvolená látka **35** (Schéma 8). Látka **35** bola za nižšieho tlaku (30 bar) a rovnakej teploty redukovaná vo vysokom výťažku 85 %. Z látky **45** bol následne pomocou metánsulfonátu pripravený azidoderivát **46**. Z neho bol, už vyššie spomínaným postupom pomocou  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ , pripravený 9-aminoderivát **47**, a to v relatívne dobrom výťažku 67 %. Látka **47** bola následne jednoduchou aminolýzou metylesteru prevedená na finálnu látku **44**.

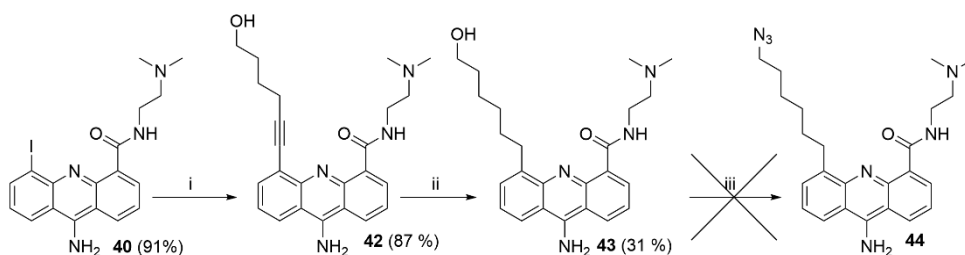


Schéma 7. Syntéza akridínov **42** – **44**. i) CuI, Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>, CHCl<sub>3</sub>, TEA, hex-5-ýn-1-metánsulfonát, 60 °C; ii) Pd/C, MeOH, 45 °C, 50 bar, 0,5 ml/min (H-Cube®); iii) 1. DCM, TEA, MsCl; 2. NaN<sub>3</sub>, DMF, 3 h, 60 °C.

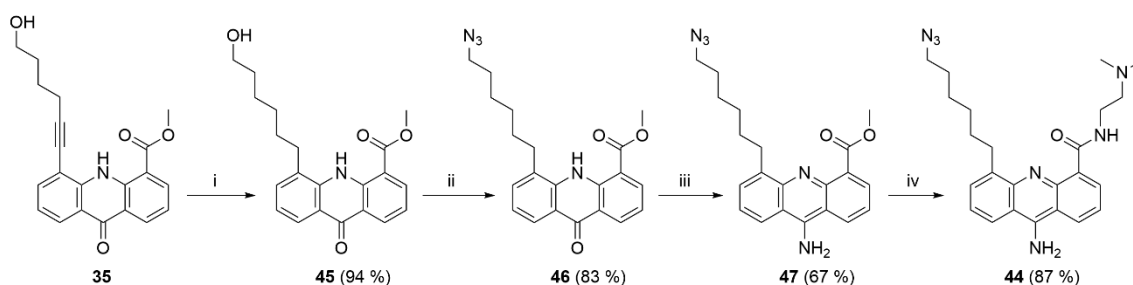
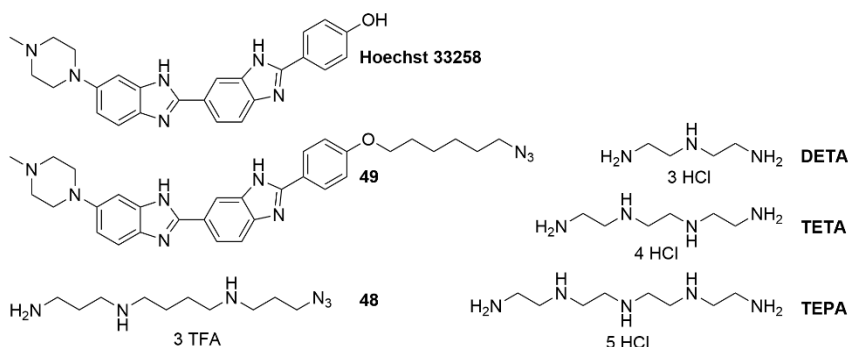


Schéma 8. Syntéza akridínov **44** – **47**. i) Pd/C, MeOH, 45 °C 30 bar, 0,5 ml/min (H-Cube®); ii) 1. DCM, TEA, MsCl; 2. NaN<sub>3</sub>, DMF, 3 h, 60 °C, iii) 1. SOCl<sub>2</sub>, 80 °C, 1 h; 2. fenol, 110 °C, 15 min; 3.  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ , 65 °C, 1 h; iv) N,N-dimetyletán-1,2-diamín, 60 °C, 1 h.

#### 4.1.6 Syntéza modifikovaného spermínu a Hoechstu 33258

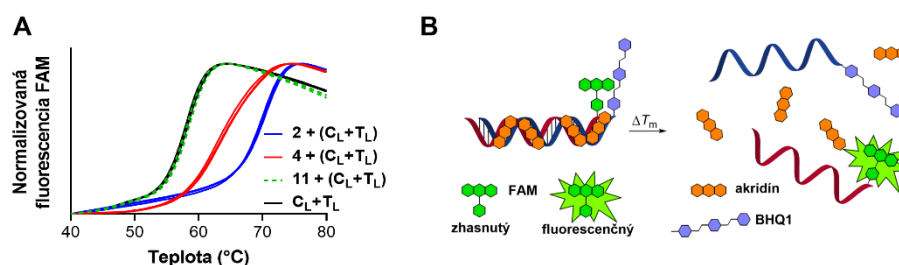
Na porovnanie aktivity akridínov boli vybrané ďalšie dve skupiny látok, a to polyamíny (spermín, DETA, TETA, TEPA) a MGB (Hoechst 33258). Zo spermínu bol pripravený jeho azidoderivát **48** a z Hoechst 33258 bol pripravený jeho alkylovaný derivát nesúci azidoskupinu (**49**, Obrázok 37), aby mohli byť následne konjugované s ON. Syntéza azidospermínu bola publikovaná.<sup>229</sup> Syntéza látky **49** Williamsonovou reakciou bola inšpirovaná publikovanými postupmi.<sup>229</sup> Samotná syntéza látky **49** bola jednoduchá, avšak následné čistenie látky **49** bolo

výzvou. Kvôli vysokej fotolabilite, bolo nutné látku čistiť za neprítomnosti svetla, čo spôsobovalo nemalé problémy pri odoberaní jednotlivých frakcií pri čistení pomocou stĺpcovej chromatografie.



Obrázok 37. Štruktúry použitých látok 48, 49 a štruktúry syntetických polyamínov (DETA, TETA, TEPA).

#### 4.2 Testovanie vplyvu akridínov, polyamínov a MGB na $T_m$ duplexu voľne v roztoku



Obrázok 38. (A) Meltingové krivky duplexov  $C_L+T_L$  v prítomnosti akridínov 2 (modrá), 4 (červená), 11 (prerušovaná zelená) pri koncentrácii akridínov  $6,25 \mu\text{M}$  a  $C_L+T_L$  bez pridaného akridínu (čierna). (B) Princíp testovania aktivity akridínov voľne v roztoku.

Vyššie zmieňované látky boli testované na schopnosť ovplyvňovať teplotu topenia ( $T_m$ ) duplexu DNA voľne v roztoku v závislosti na ich koncentrácii (Obrázok 39) [P1]. Akridíny boli pridané k roztoku modelového duplexu DNA tvoreného  $C_L$  (5'-FAM) a  $T_L$  (3'-BHQ1) sekvenciou (Tabuľka 3). Následne prebehla termálna denaturácia s postupným zvyšovaním teploty a meraním fluorescence. V rámci duplexu je fluorescence FAM zhasnutá vďaka krátkej vzdialenosti medzi FAM a zhášačom BHQ1. Pri zvyšovaní teploty dochádza k topeniu duplexu a reportér so zhášačom sa dostávajú do väčšej vzdialenosti a dochádza k nárastu fluorescence (Obrázok 38). Zo závislosti fluorescence na teplote možno následne stanoviť  $T_m$  pre daný testovací systém. Použitá sekvencia modelového duplexu je súčasťou systému na detekciu sekvenčných zmien v HFE géne.  $T_m$  tohto duplexu bola stanovená v prítomnosti a neprítomnosti testovaných akridínov. Zvýšenie teploty topenia ( $\Delta T_m$ ) bolo spočítané ako rozdiel medzi hodnotou  $T_m$  s a  $T_m$  bez prítomnosti odpovedajúceho akridínu. V Tabuľka 2 sú pre porovnanie účinnosti jednotlivých akridínov uvedené hodnoty  $\Delta T_m$  pri koncentrácii akridínov  $6,25 \mu\text{M}$ . Na základe týchto testov bolo možné odvodiť vzťahy medzi štruktúrou a účinkom (SAR). Zo získaných dát z 1. a 2. série bolo možné vyvodit základné SAR:

(1) Akridíny nesúce terciárnu karboxamidovú skupinu nezvyšujú  $T_m$  ani pri vysokých koncentráciách ( $100 \mu\text{M}$ , viz napr. látky 2 a 10). Akridíny nesúce sekundárnu karboxamidovú skupinu vykazujú najvyššiu aktivitu. Tento rozdiel sa zdá byť v súlade s publikovanými kryštalografickými údajmi o interakcii akridínov s DNA, kde prítomnosť vodíkového atómu na dusíku karboxamidovej skupiny vytvárala dôležitú vodou-premostenú vodíkovú väzbu na fosfátovú skupinu kostry DNA.<sup>230</sup>

(2) Neprítomnosť bázeickej skupiny v bočnom reťazci karboxamidu (látka **9**) či zmena karboxamidovej skupiny na skupinu karboxylovú (látka **17**) viedli k úplnej strate schopnosti zvyšovať teplotu topenia.<sup>230</sup>

(3) Samotné nesubstituované akridínové jadro má tiež schopnosť stabilizácie (látka **1**). Avšak neprítomnosť karboxamidovej skupiny výrazne znižuje schopnosť stabilizovať duplex DNA v porovnaní so sekundárnymi karboxamidmi nesúcimi bázeickú skupinu.

(4) Prítomnosť bázeickej skupiny v postrannom reťazci výrazne prispieva k stabilizácii (viz látka **9** a látky **2-8**). Jej charakter (hlavne veľkosť) ovplyvňuje výslednú schopnosť stabilizácie duplexu. Čím menšia je bázeická skupina (napr. **2** a **3**), tým vyššia je stabilizácia duplexu.[P1]

(5) Optimálna vzdialenosť medzi karboxamidovou skupinou a bázeickou skupinou postranného reťazca sú dva atómy uhlíku.

Na základe testov schopnosti stabilizácie duplexu boli vybrané akridíny (**2, 3** a **4**) vhodné na kovalentnú modifikáciu sond. Z ďalších sérií látok pripravených neskôr boli testované nasledujúce látky: **18, 24, 32** a **41**. Látka **18** (plánovaný prekursor pre látky 3. série) obsahujúca karbonyl v polohe 9 nezvyšovala termálnu stabilitu a ani látka **24** zastupujúca 3. sériu, kde bolo obrátené umiestnenie substituentov na akridínovom jadre, nezvyšovala termálnu stabilitu duplexu, prípadne až pri vysokej koncentrácii a aj to len veľmi mierne. Látka **32** (4. séria) nesúca dve karboxamidové skupiny v polohách 4 a 5 mala v porovnaní s najlepšou látkou 1. a 2. série (**2**) porovnateľnú (iba mierne nižšiu) schopnosť stabilizovať duplex. Látka **41** zastupujúca 5. sériu akridínov, s postranným reťazcom viazaným prostredníctvom väzby C-C v polohe 5, stabilizovala duplex porovnateľne ako látka **2**. Z polyamínov fungoval iba spermín, ostatné syntetické (poly)etylénamíny neboli schopné stabilizovať duplex. Účinnosť spermínu a farbiva Hoechst 33258 bola nižšia než účinnosť najlepších akridínov. Z vyššie uvedeného boli odvodené ďalšie SAR:

(6) Väzba postranného reťazca s bázeickou skupinou do polohy 9 a väzba neutrálneho linkeru nesúceho azidoskupinu do karboxamidu v polohe 4 mali výrazne negatívny vplyv na schopnosť látky **24** zvyšovať termálnu stabilitu duplexu DNA.

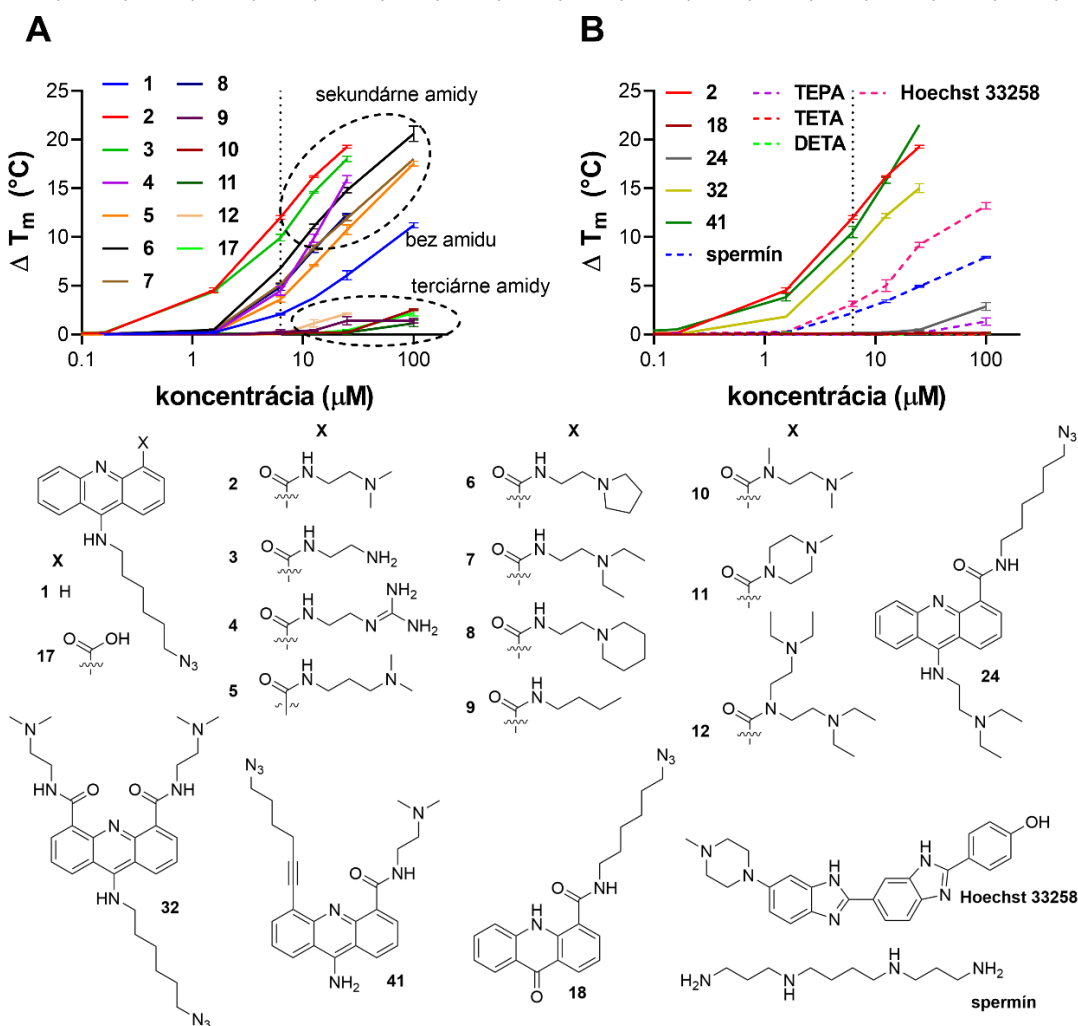
(7) Pridanie ďalšej karboxamidovej skupiny nesúcej bázeický postranný reťazec do polohy 5 nevedlo k výrazne lepším výsledkom, naopak malo skôr mierne negatívny efekt.

(8) Akridíny so sekundárnou karboxamidovou skupinou a bázeickým postranným reťazcom mali všeobecne výrazne lepšie stabilizačné vlastnosti ako látky z iných skupín stabilizátorov (polyamíny, MGB, Obrázok 39B).

(9) Termálnu stabilitu duplexu DNA sú schopné ovplyvniť iba biogénne polyamíny so správnym rozmiestnením aminoskupín v reťazci (napr. spermín). Počet aminoskupín v reťazcoch syntetických polyamínov (DETA, TETA, TEPA) má zanedbateľný vplyv na schopnosť stabilizovať duplex DNA.

Tabuľka 2 Zvýšenie teploty topenia duplexu  $C_1+T_1$  v prítomnosti testovaných akridínov ( $c_{\text{akridínov}} = 6,25 \mu\text{M}$ ).

Látka	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	17	18	24	32	41
$\Delta T_m$ (°C)	2,07	12,00	9,93	4,47	3,60	6,80	5,13	4,87	0,27	0,07	0,07	0,00	0,13	0,07	0,13	8,33	10,5
	± 0,09	± 0,19	± 0,34	± 0,43	± 0,28	± 0,0	± 0,19	± 0,33	± 0,23	± 0,09	± 0,0	± 0,0	± 0,09	± 0,0	± 0,0	± 0,0	± 0,6

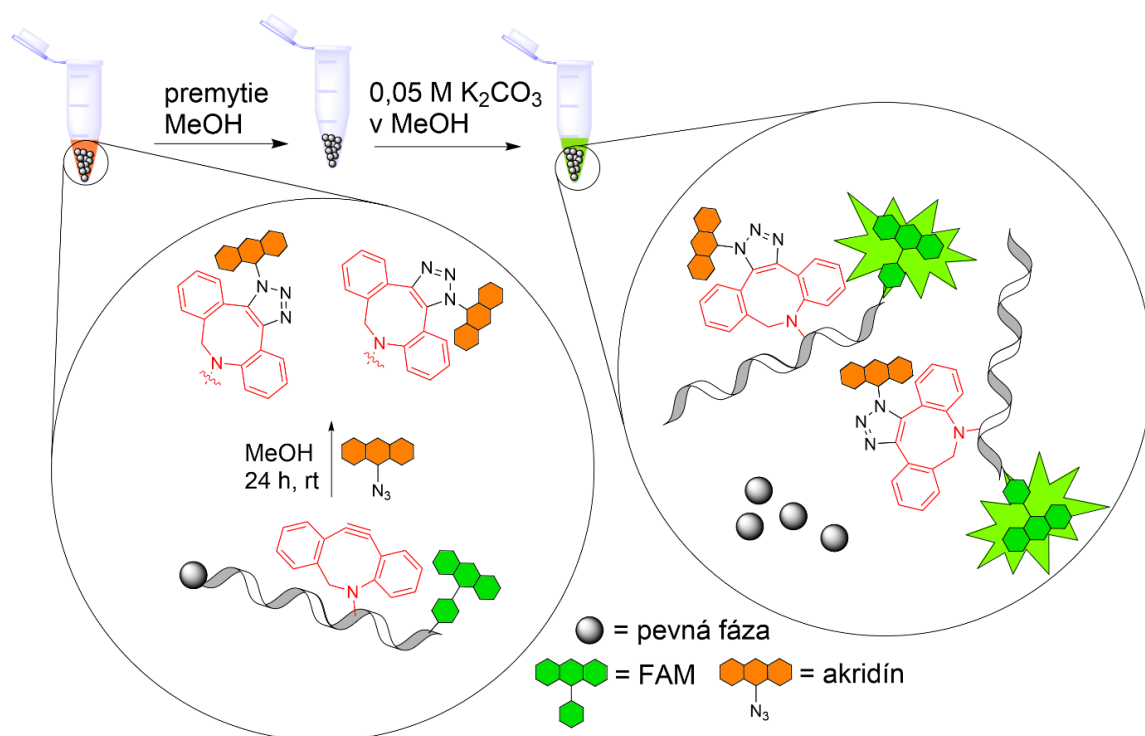


Obrázok 39. Testovanie schopnosti látok zvyšovať termálnu stabilitu (teplotu topenia) duplexu DNA. **A)** porovnanie vlastností akridínov 1. a 2. série (1 - 17); **B)** porovnanie vlastností akridínov 2, 24 (3.séria), 32 (4.séria), 41 (5.séria), sperminu, syntetických polyamínov TEPA, TETA, DETA a Hoechstu 33258. Bodkovaná čiara označuje  $\Delta T_m$  pri koncentrácii  $6,25 \mu\text{M}$ .

### 4.3 Príprava modifikovaných ON sond

#### 4.3.1 Modifikácia ON sond na pevnej fáze

Testované sondy boli za účelom ďalšieho výskumu stabilizácie duplexu konjugované s účinnými akridínmi na pevnej fáze pomocou SPAAC, tj click chémie bez katalýzy meďnými kationmi. Na tento účel boli do ON sond pri ich syntéze inkorporovaní modifikované T bázy nesúce DBCO (štruktúra viz Obrázok 35). Uzavretie lineárnej trojitej väzby do cyklooktýnového kruhu vedie k pnutiu a zvýšeniu reaktivity trojitej väzby. Kondenzáciou dvoch benzénových jadier na cyklooktýn do polôh [a,e] dochádza k ďalšiemu zvýšeniu pnutia trojitej väzby a k ďalšiemu zvýšeniu reaktivity takto substituovaného cyklooktýnu, viz. Obrázok 34



Obrázok 40. Schematické znázornenie princípu click reakcie na pevnej fáze a následného odštiepenia a deprotektie ON sond.

SPAAC prebiehala za miernych reakčných podmienok, tj. laboratórna teplota a trepanie, a poskytla vysoké výťažky. Pri reakcii reaguje azidoskupina použitého akridínu s aktivovanou trojitou väzbou DBCO (Obrázok 40). Priebeh reakcie na pevnej fáze (CPG support) umožňuje jednoduchým premytím pevnej fázy čistým rozpúšťadlom, odstránenie a recykláciu prebytočného akridínu, prípadne inej látky. ON sondy, použité na modifikáciu akridínmi na pevnej fáze, boli navrhnuté ako časť HFE génu obsahujúca dve známe SNVs. Na syntézu samotných ON sond, pomocou RNA/DNA syntetizéru, boli použité UltraMild chránené fosforamiditové monoméry. Sondy boli značené na 5'-konci reportérom FAM, ktorý slúžil k neskorším meltingovým analýzám. Tri sondy, v Tabuľka 3 označené hviezdikou, boli navrhnuté bez značenia FAM, aby bolo možné pomocou fotofyzikálnych meraní študovať interakciu akridínu **2** so samotnou sondou a s duplexom a nedochádzalo k interferencii s absorpciou alebo fluorescenciou fluoresceínu.

ON sondy použité v tejto práci boli navrhnuté s rôznou dĺžkou sekvencie (13 (**S**) a 18 (**L**) báz), umiestnením DBCO v rôznych pozíciách sekvencie (pozície 1, 7 a 13) a s rôznym počtom DBCO v sekvencii. ON sondy majú sense orientáciu odpovedajúcu Wild typu HFE génu. V sekvencii boli vďaka tomu prítomné chybné párované bázy v prípade S65C A>T variantu a H63D C>G variantu. Na základe výsledkov testov schopnosti stabilizácie duplexov v roztoku boli zvolené tri aktívne akridíny (**2**, **3** a **4**) a jeden neaktívny akridín (**11**).[P1] K tejto štvorici akridínov boli neskôr pridané ďalšie akridíny, a to **32** a **41**. Na účel porovnania boli pripravené aj ON sondy modifikované polyamínom **47** a MGB **48**. Modifikácia ON sond pomocou akridínu **3** nebola úspešná ani po niekoľkých opakovaných pokusoch. V HPLC chromatograme neboli viditeľné píky odpovedajúce ON sondám modifikovaným akridínom **3**. Preto tieto ON sondy nie sú uvedené v Tabuľka 3 a ani vo výsledkoch.

Tabuľka 3. Označenie a sekvencie pripravených sond na CPG. S – krátká sonda (13 báz), L – dlhá sonda (18 báz), 1/7/13 – pozície DBCOdT nukleotidu. \* sonda neznačená FAM (fluoresceín).

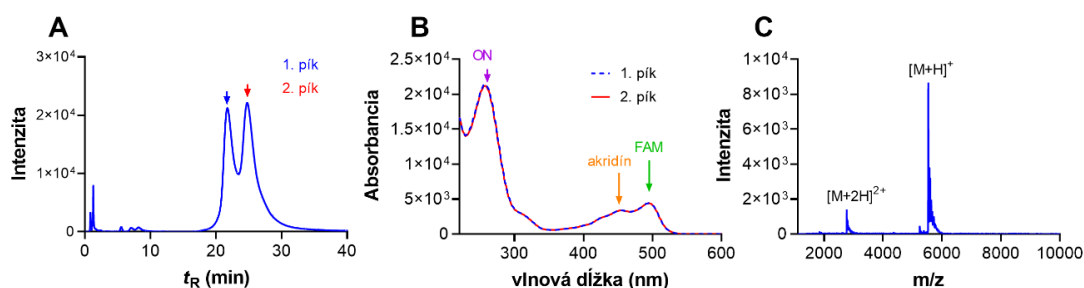
Sonda	Sekvencia sondy
S_1*	5'-[DBCOdT]GA TCA TGA GAG T-3'-Phos
S_7	FAM-5'-TGA TCA [DBCOdT]GA GAG T-3'-Phos
S_13	FAM-5'-TGA TCA TGA GAG [DBCOdT]-3'-Phos
L_1*	5'-[DBCOdT]GA TCA TGA GAG TCG CCG-3'-Phos
L_7	FAM-5'-TGA TCA [DBCOdT]GA GAG TCG CCG-3'-Phos
L_7*	5'-TGA TCA [DBCOdT]GA GAG TCG CCG-3'-Phos
L_13	FAM-5'-TGA TCA TGA GAG [DBCOdT]CG CCG-3'-Phos
L_7,13	FAM-5'-TGA TCA [DBCOdT]GA GAG [DBCOdT]CG CCG-3'-Phos
Kontrola	Sekvencia kontroly
C <sub>S</sub>	FAM-5'-TGA TCA TGA GAG T-3'-Phos
C <sub>L</sub>	FAM-5'-TGA TCA TGA GAG TCG CCG-3'-Phos
Kód cieľa	Sekvencia cieľa
T <sub>S</sub>	5'-ACT CTC ATG ATC A-3'-BHQ1
T <sub>L</sub>	5'-CGG CGA CTC TCA TGA TCA-3'-BHQ1
T <sub>S(A)</sub>	5'-ACA CTC ATG ATC A-3'-BHQ1
T <sub>S(C)</sub>	5'-ACT CTC ATC ATC A-3'-BHQ1
T <sub>L(A)</sub>	5'-CGG CGA CAC TCA TGA TCA-3'-BHQ1
T <sub>L(C)</sub>	5'-CGG CGA CTC TCA TCA TCA-3'-BHQ1

#### 4.3.2 Deprotekcia a čistenie modifikovaných ON sond

UltraMild chránené bázy boli použité z dôvodu známej nestability väzby C-N v polohe 9 akridínov 1. a 2. série v prítomnosti koncentrovaného hydroxidu amónneho, ktorý sa štandardne používa na odštiepenie a deprotekciiu ON. Pri použití tohto činidla dochádza k substitúcii azidoalkylamínového reťazca v polohe 9 za aminoskupinu. Týmto spôsobom dochádza k odstráneniu akridínu z modifikovaných ON sond. Toto deprotektčné činidlo nebolo možné použiť v prípade modifikácie ON sond akridínmi **2**, **4**, **11** a **32**. Vďaka UltraMild chrániacim skupinám bol použitý 0,05 M K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> v MeOH, v prítomnosti ktorého je väzba C-N v polohe 9 stabilná. Samotné odštiepenie a deprotekciiu ON sond prebiehali podľa odporúčaného deprotektčného postupu s predĺžením reakčného času na 8 h.

Po odštiepení z pevnej fázy boli všetky sondy analyzované a purifikované pomocou HPLC na kolóne Luna-PhenylHexyl a s mobilnou fázou TEAA v rôznych pomeroch s ACN (Tabuľka 4). Podmienky separácie boli optimalizované a použité pri semipreparatívnej HPLC purifikácii sond. Absorpčné spektrá (Obrázok 41B) analyzovaných sond mali charakteristické spektrálne rysy pre ON reťazec (pás pri 260 nm), akridín (450 nm) a FAM (495 nm). Zaujímavosťou bola prítomnosť dvoch píkov s približne rovnakou intenzitou (Obrázok 41A). Tieto píky boli pozorované počas analýzy všetkých sond obsahujúcich akridín, MGB či polyamín (viz. Príloha 1 a 2, Obrázok 54, Obrázok 55). U sond modifikovaných akridínom **32** sa píky prekrývali tak, že vyzerajú ako jeden. Pri bližšom skúmaní bolo zistené, že pravdepodobne vplyvom druhej karboxamidovej skupiny v kombinácii so zložením MF boli elučné časy píkov týchto sond veľmi podobné. Z tohto dôvodu sa dva píky týchto sond javia na chromatogramoch ako jeden (viz. Príloha 2, Obrázok 55A-D). Jedinou výnimkou boli sondy modifikované akridínom **41**, ktoré mali iba jeden pík. Píky všetkých sond mali rovnaké absorpčné spektrá (Obrázok 41B). Po purifikácii boli sondy charakterizované pomocou MS MALDI-TOF (Obrázok 41C), ktorá potvrdila správnu hmotu. Možné vysvetlenie pre prítomnosť dvoch píkov na HPLC chromatogramoch je založené na prítomnosti dvoch polohových izomérov vychádzajúcich z click reakcie akridínov, MGB a polyamínu s nesymetrickým DBCO (Obrázok 40) a je ďalej podporené pozorovaním troch píkov (v pomere 1:2:1) v prípade sond **L\_7,13\_2** a **L\_7,13\_4**, ktoré boli značené dvoma molekulami akridínu (Obrázok 54, viz príloha 1). Prítomnosť iba jedného píku u sond modifikovaných akridínom **41** bola pravdepodobne

spôsobená vznikom len jedného polohového izoméru. Vznik jedného polohového izoméru bol pravdepodobne spôsobený sterickým bránením karboxamidovej skupiny v polohe 4 akridínu **41** pri reakcii s DBCO.



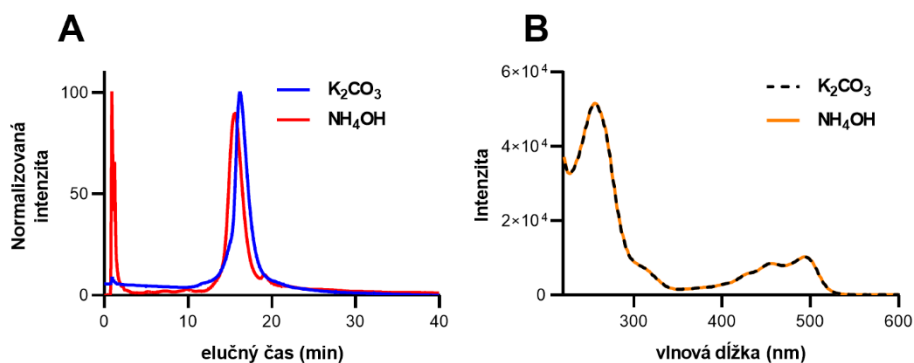
Obrázok 41. (A) Chromatogram sondy **S\_7\_2** ( $\lambda = 260$  nm). (B) Absorpčné spektrá dvoch pík na chromatograme (A). (C) hmotnostné spektrum sondy **S\_7\_2**.

Na zvýšenie stability a možnosti používať akridíny taktiež s ON chránenými bežnými chrániacimi skupinami na fosformamiditoch bol vyvinutý syntetický postup na prípravu akridínu **41**, ktorý má linker pripojený cez C-C väzbu. ON sonda modifikovaná akridínom **41** bola na overenie hypotézy o stabilite väzby akridínu **41** na reťazci ON v prítomnosti koncentrovaného  $\text{NH}_4\text{OH}$  ochránená týmto deprotektčným činidlom. Nukleové bázy ON sondy boli síce chránené UltraMild chrániacimi skupinami, avšak tie je možné ochrániť aj použitím  $\text{NH}_4\text{OH}$  počas dvoch hodín. Hypotéza o stabilite akridínu **41** v prostredí koncentrovaného  $\text{NH}_4\text{OH}$  sa potvrdila prítomnosťou jedného píku na HPLC chromatograme, ktorý svojim absorpčným spektrom odpovedal ON sonde modifikovanej akridínom **41** ochránenej pomocou 0,05 M  $\text{K}_2\text{CO}_3$  v MeOH (Obrázok 42).

Tabuľka 4. Zoznam pripravených sond modifikovaných akridínmi, optimálne zloženie mobilnej fázy pre HPLC analýzu

Názov sondy	Stabilizátor	Mobilná fáza (ACN:TEAA)	Názov sondy	Stabilizátor	Mobilná fáza (ACN:TEAA)
<b>S_7_2</b>	<b>2</b>	18:82	<b>S_7_32</b>	<b>32</b>	18:82
<b>S_13_2</b>	<b>2</b>	18:82	<b>S_13_32</b>	<b>32</b>	18:82
<b>L_7_2</b>	<b>2</b>	18:82	<b>L_7_32</b>	<b>32</b>	17:83
<b>L_13_2</b>	<b>2</b>	18:82	<b>L_13_32</b>	<b>32</b>	17:83
<b>L_7,13_2</b>	<b>2</b>	22:78	<b>S_7_41</b>	<b>41</b>	18:82
<b>S_7_4</b>	<b>4</b>	19:81	<b>S_13_41</b>	<b>41</b>	18:82
<b>S_13_4</b>	<b>4</b>	19:81	<b>L_7_41</b>	<b>41</b>	17:83
<b>L_7_4</b>	<b>4</b>	18:82	<b>L_13_41</b>	<b>41</b>	17:83
<b>L_13_4</b>	<b>4</b>	18:82	<b>L_7,13_41</b>	<b>41</b>	22:78
<b>L_7,13_4</b>	<b>4</b>	22:78	<b>S_7_48</b>	<b>48</b>	17:83
<b>S_1_2*</b>	<b>2</b>	17:83	<b>S_13_48</b>	<b>48</b>	18:82
<b>L_1_2*</b>	<b>2</b>	18:82	<b>L_7_48</b>	<b>48</b>	15:85
<b>L_7_2*</b>	<b>2</b>	17:83	<b>L_13_48</b>	<b>48</b>	17:83
<b>L_7_11</b>	<b>11</b>	18:82	<b>L_7_49</b>	<b>49</b>	22:78



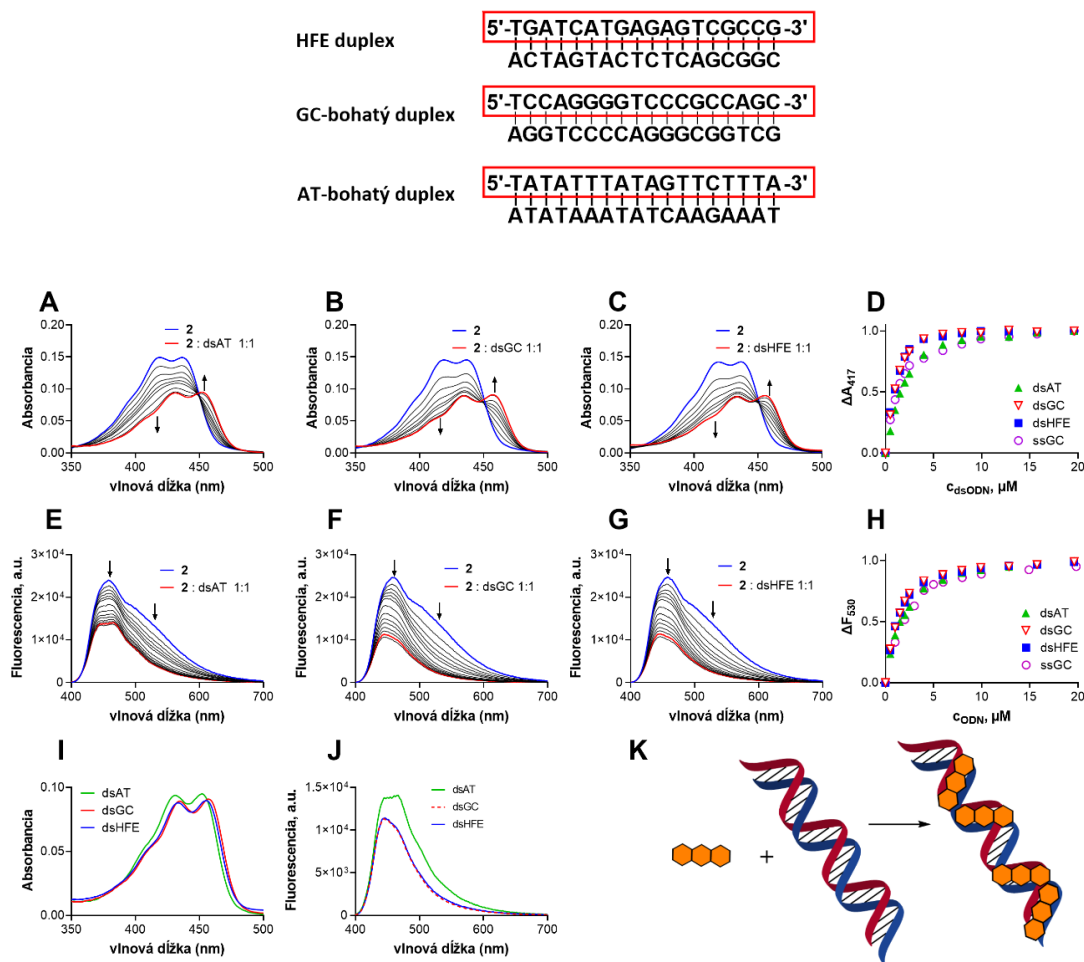


Obrázok 42. (A) HPLC chromatogram sondy **S\_7\_41** odchránenej 0,05 M  $K_2CO_3$  v MeOH (modrá) a koncentrovaným  $NH_4OH$  (červená). (B) Absorpčné spektrum merané v maximách píkov sondy odchránenej 0,05 M  $K_2CO_3$  v MeOH (prerušovaná čierna) a koncentrovaným  $NH_4OH$  (plná oranžová).

#### 4.4 Štúdia interakcie akridínových derivátov s DNA

Akridín **2**, s najvyššou hodnotou  $\Delta T_m$  z látok 1. a 2. série, bol vybraný na štúdium interakcie akridínov s jednovláknovou a dvojitou DNA (ssDNA, dsDNA). Na štúdium interakcie akridínu **2** s DNA pomocou absorpčnej titrácie boli vybrané tri typy DNA, podľa obsahu jednotlivých báz (Tabuľka 5), a to AT-bohatá DNA, GC-bohatá DNA a HFE DNA (vyvážený pomer AT a GC). Po pridaní dsDNA do roztoku akridínu **2** boli pozorované bathochromné a hypochromné posuny v jeho absorpčnom spektre (Obrázok 43A-C). Rovnako bol pozorovaný pokles fluorescence a zmeny v emisnom spektre (Obrázok 43E-G). Zmeny fluorescence a emisného spektra boli výraznejšie po pridaní GC-bohatej a HFE dsDNA. Zmeny v absorpčnom a emisnom spektre naznačujú významné  $\pi$ - $\pi$  interakcie akridínového jadra s nukleovými bázami. Podobné zmeny v absorpčných spektrách boli pozorované aj u 9-aminoakridínu viazaného do poly (dA).poly (dT) duplexu.<sup>231</sup> Rovnako boli popísané podobné zmeny emisného spektra *N*-{[*N*-(2-dimetylamino)etyl]akridín-4-karboxamid}- $\alpha$ -alanínu viazaného do ctDNA (calf thymus DNA).<sup>232</sup> Kvalitatívne zmeny absorpčného a emisného spektra akridínu **2** viazaného do GC-bohatého a AT-bohatého duplexu poukazujú na mierne odlišné interakcie s týmito nukleovými bázami.<sup>231</sup> Absorpčné a emisné spektrum akridínu **2** viazaného do HFE a GC-bohatého duplexu sú takmer zhodné (Obrázok 43I,J). Z vyššie uvedených informácií vyplýva preferencia akridínu **2** k GC-bohatej sekvencii v porovnaní s AT-bohatou sekvenciou. Tieto závery potvrdzujú aj kvantitatívne dáta z titrácie, u ktorých bola pozorovaná strmšia väzbová izoterma u GC-bohatej a HFE dsDNA (Obrázok 43D) v porovnaní s izotermou AT-bohatej dsDNA. Väzbová izoterma z fluorescence (Obrázok 43H) ďalej podporuje preferenciu k GC-bohatej sekvencii, i keď v porovnaní s izotermou z absorpcie nie je rozdiel medzi GC-bohatou a AT-bohatou dsDNA tak viditeľný. Preferenciu akridínu **2** k GC-bohatej dsDNA je možné vysvetliť orientáciou akridínového jadra karboxamidovou skupinou do veľkého žliabku DNA,<sup>226, 233</sup> ktorý je hlbší práve v GC-bohatej časti DNA a poskytuje väčší priestor pre karboxamidovú skupinu. Navyše týmín svojimi metylovými skupinami v AT-bohatej časti pravdepodobne mierne stericky bráni zanoreniu karboxamidovej skupiny do veľkého žliabku.

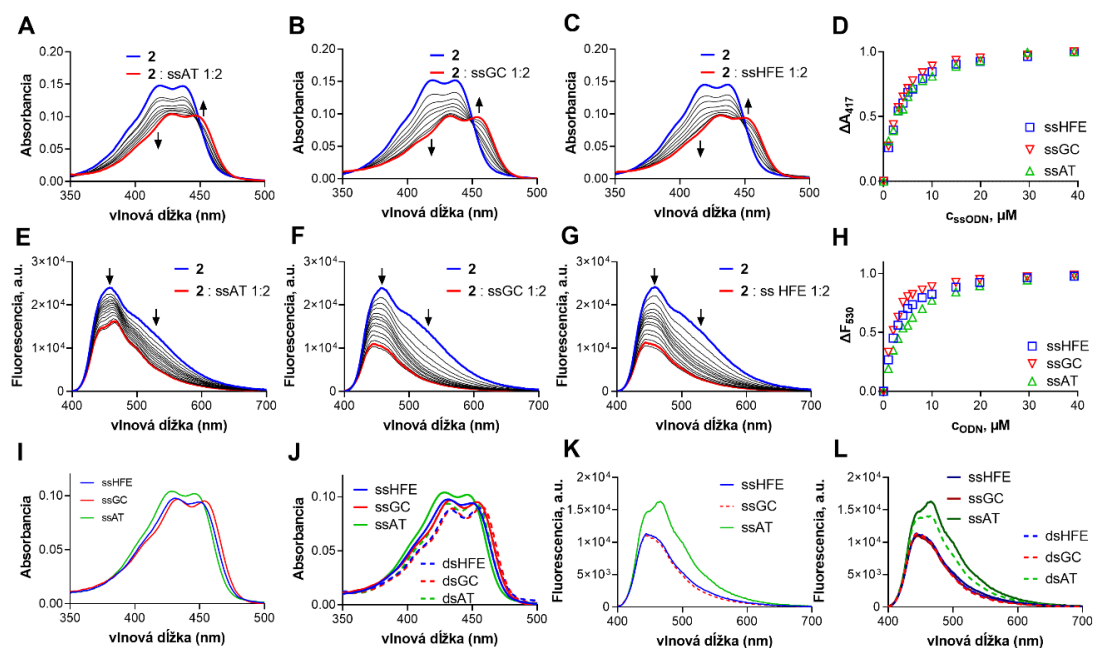
Tabuľka 5. ON duplexy použité na štúdium interakcie akridínu 2 s ONs. Sense vlánka (použité ako ssDNAs v štúdiu) sú vyznačené červeným obdĺžnikom.



Obrázok 43. Zmeny absorpčného spektra (A–C) a emisného spektra (E–G) ( $\lambda_{ex} = 380$  nm) akridínu 2 ( $20 \mu\text{M}$ ) počas titrácie AT-bohatou (A, E), GC-bohatou (B, F), a HFE (C, G) dsDNA v reakčnom pufrí. (D, H) Zmeny absorpcie pri 417 nm (D) a emisie pri 530 nm (H) akridínu 2 počas titrácií dsDNA (AT-bohatá – zelená, GC-bohatá – červená, HFE – modrá), a ssGC-bohatá (fialová). (I, J) Porovnanie absorpčného (I) a emisného (J) spektra akridínu 2 ( $20 \mu\text{M}$ ) viazaného do AT-bohatej (zelená), GC-bohatej (červená) a HFE (modrá) dsDNA ( $20 \mu\text{M}$ ). (K) Schéma princípu experimentu.

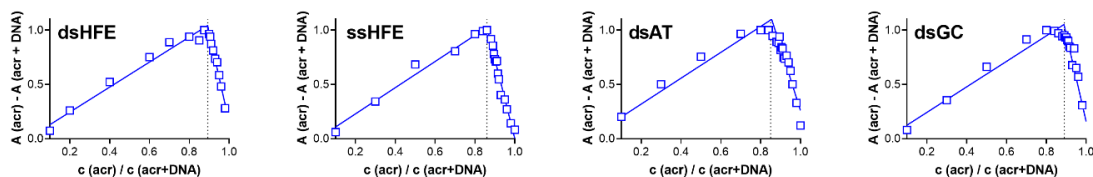
Podobne bola študovaná aj interakcia akridínu 2 so ssDNA. Vzhľadom na náchylnosť tvorby sekundárnych štruktúr u ssDNA bola urobená na absorpcii založená meltingová analýza, počas ktorej neboli pozorované výrazné zmeny absorpčného spektra (Príloha 5, Obrázok 58). Tieto výsledky potvrdzujú, že sekundárne štruktúry u skúmaných ssDNA sú pri teplotách použitých v tejto štúdiu nestabilné, a teda je nepravdepodobné, že boli prítomné. Zmeny absorpčného a emisného spektra pozorované počas titrácie akridínu 2 pomocou ssDNA boli veľmi podobné zmenám pozorovaným pri titrácii pomocou dsDNA. Opäť boli pozorované hypochromné a bathochromné zmeny v absorpčnom spektre pri titrácii všetkými troma typmi ssDNA (Obrázok 44A-C). Boli pozorované mierne odlišné zmeny v absorpčných spektrách pri titrácii AT-bohatou a GC-bohatou sekvenciou. Absorpčné spektrá boli pri titrácii ssDNA v porovnaní so spektrami pri titrácii dsDNA mierne posunuté k nižším vlnovým dĺžkam (Obrázok 44I, J). Zmeny vo väzbových izotermách HFE, GC-bohatej a AT-bohatej sekvencie boli zanedbateľné (Obrázok 44D, H). V porovnaní s izotermami interakcií s dsDNA boli izotermy interakcií so ssDNA podstatne menej strmé, čo naznačuje omnoho slabšie interakcie so ssDNA. Rozdiely vo väzbových izotermách HFE, GC- a AT-bohatej ssDNA získaných z emisných spektier boli výraznejšie (Obrázok 44H) v porovnaní s absorpčnými izotermami ssDNA či väzbovými izotermami s dsDNA (Obrázok 43H). Absorpčné

a emisné spektrum akridínu **2** viazaného na GC-bohatú a HFE ssDNA boli takmer totožné, čo opäť potvrdzuje preferenciu akridínu **2** pre GC-bohatú sekvenciu. Pravdepodobné vysvetlenie interakcie akridínu **2** so ssDNA je založené na stackingu planárneho jadra s nukleovými bázami.<sup>234</sup>



Obrázok 44. Zmeny absorpčného spektra (A–C) a emisného spektra (E–G) ( $\lambda_{ex} = 380$  nm) akridínu **2** ( $20 \mu\text{M}$ ) počas titrácie AT-bohatou (A, E), GC-bohatou (B, F), a HFE (C, G) ssDNA v reakčnom pufri. (D, H) Zmeny absorpcie pri 417 nm (D) a emisie pri 530 nm (H) akridínu **2** počas titrácií ssDNA (AT-bohatá – zelená, GC-bohatá – červená, HFE – modrá). (I) Porovnanie absorpčného spektra akridínu **2** ( $20 \mu\text{M}$ ) viazaného do AT-bohatej (zelená), GC-bohatej (červená) a HFE (modrá) ssDNA ( $20 \mu\text{M}$ ). (J) Porovnanie absorpčného spektra akridínu **2** ( $20 \mu\text{M}$ ) viazaného do AT-bohatej (zelená), GC-bohatej (červená) a HFE (modrá) ssDNA (plné čiary) a dsDNA (prerušované čiary) ( $20 \mu\text{M}$ ). (K) Porovnanie emisných spektier ( $\lambda_{ex} = 380$  nm) akridínu **2** ( $20 \mu\text{M}$ ) viazaného do AT-bohatej (zelená), GC-bohatej (červená) a HFE (modrá) ssDNA ( $20 \mu\text{M}$ ). (L) Porovnanie emisných spektier ( $\lambda_{ex} = 380$  nm) akridínu **2** ( $20 \mu\text{M}$ ) viazaného do AT-bohatej (zelená), GC-bohatej (červená) a HFE (modrá) ssDNA (plné čiary) a dsDNA (prerušované čiary) ( $20 \mu\text{M}$ ).

Na určenie stechiometrie viazania akridínu **2** na ssHFE a všetky typy dsDNA bol urobený Job's plot. Zo zostrojených grafov je zrejmé, že sa na jeden duplex DNA (dsDNA), prípadne na ssDNA, viaže približne 9 molekúl akridínu **2** (Obrázok 45). Tie sú viazané na 18 báz dlhú ssHFE či dsDNA pravdepodobne striedavo, na každý druhý pár báz.

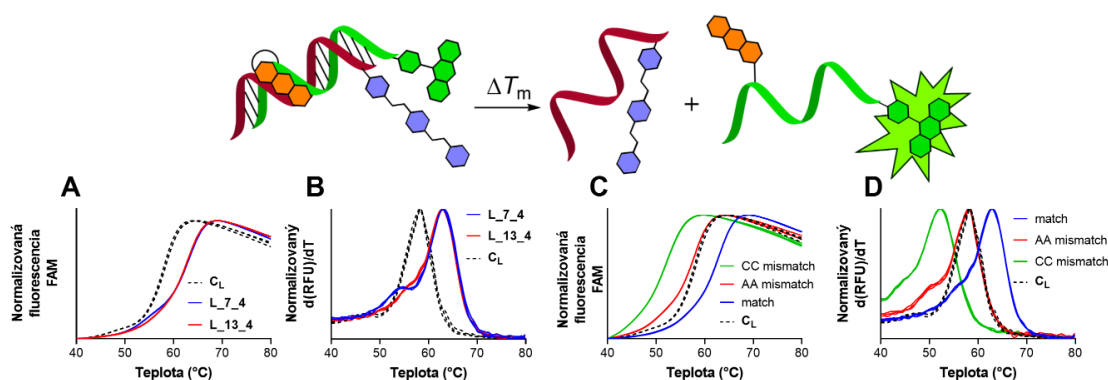


Obrázok 45. Grafy interakcie akridínu **2** (Job's plot) s dsHFE, ssHFE, dsAT, dsGC (merané ako absorpcia akridínu pri 417 nm).

#### 4.5 Štúdie termálnej denaturácie sond značených FAM a stabilizátorom

Ako prvé boli testované sondy konjugované s akridínmi 1. a 2. série (**2**, **4** a **11**, Príloha 6, Obrázok 59). Neskôr boli testované aj sondy konjugované s akridínmi 4. a 5. série (**32** a **41**, Príloha 6, Obrázok 59), ktoré boli doplnené o testy sond modifikovaných polyamínom **48** a MGB **49** (viz. nižšie). Štúdie termálnej denaturácie duplexov sond značených FAM a akridínom nadväzovali na

testovanie vplyvu akridínov na termálnu stabilitu duplexov voľne v roztoku. Sondy použité v týchto štúdiách (Tabuľka 4) sa líšili dĺžkou reťazca (13 bázové (**S**), 18 bázové (**L**)), typom kovalentne viazaného akridínu (**2**, **4**, **11**), počtom akridínov (jeden alebo dva) a pozíciou tejto modifikácie v sekvencii [P1]. Všetky sondy značené FAM a akridínom boli testované v reálnom meltingovom systéme pre HFE gén s cieľovými komplementárnymi sekvenciami značenými zhášačom BHQ1 ( $T_s$  – 13 báz,  $T_L$  – 18 báz) a neskôr aj so sekvenciami obsahujúcimi SNVs. Meltingové krivky (merané ako nárast fluorescence FAM po rozvoľnení duplexu) všetkých sond mali sigmoidný tvar porovnateľný s tvarom meltingovej krivky kontrolných sond (Obrázok 46A). Deriváciou kriviek bolo možné potom získať grafy s tzv. „meltingovými píkmi“ (napr. Obrázok 20B, D), kde bolo možné odčítať  $T_m$  ako maximum krivky a výsledky ľahko medzi sebou porovnať. Na grafoch meltingových kriviek akridínmi modifikovaných sond **L\_7\_4** a **L\_13\_4** sú zdanlivo viditeľné dva prechody (Obrázok 46). Prechod pri nižších teplotách je v meltingových píkoch detekovateľný ako mierna vlna. Pravdepodobnou príčinou výskytu takýchto artefaktov na začiatku meltingových píkov vyššie spomínaných sond je lokálne rozvoľňovanie interakcie medzi akridínom a FAM (tie môžu tvoriť heterodimér), ktoré je závislé na pozícií modifikácie v sekvencii. Pri porovnávaní meltingových píkov sond **L\_7\_4** a **L\_13\_4** je viditeľný väčší vplyv artefaktu na začiatku meltingového píku u sondy **L\_7\_4**, ktorá má akridín viazaný bližšie k FAM na 5'-konci. Je pravdepodobné, že sa kratšia vzdialenosť medzi akridínom a FAM prejavuje výraznejším artefaktom na začiatku meltingového píku sondy **L\_7\_4**. Artefakty na začiatku meltingových píkov však nemali vplyv na analýzu meltingových píkov a určenie  $T_m$  (Obrázok 46).



Obrázok 46. Porovnanie meltingových kriviek(A) a odpovedajúcich meltingových píkov (B) sond **L\_7\_4** (modrá), **L\_13\_4** (červená) v plne komplementárnych duplexoch s  $T_L$  a kontrolného duplexu  $C_L + T_L$  bez akridínu (prerušovaná čierna). (C) Porovnanie meltingových kriviek a odpovedajúcich meltingových píkov (D) duplexov: **L\_13\_4** s  $T_L$  (modrá), **L\_13\_4** s dlhou sekvenciou  $T_{L(A)}$  variantu S65C A>T (červená), **L\_13\_4** s dlhou sekvenciou  $T_{L(A)}$  variantu H63D C>G (zelená), a kontrolného, plne komplementárneho duplexu  $C_L + T_L$  bez akridínu (prerušovaná čierna). Všetky meltingové krivky boli zmerané v kanáli pre FAM ( $\lambda_{em} = 515\text{--}530\text{ nm}$ ). Všetky merania boli robené v triplikáte.

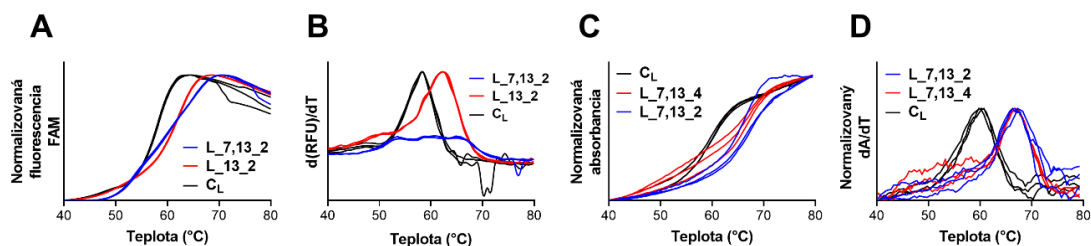
$T_m$  duplexov všetkých akridínom (**2**, **4** alebo **11**) modifikovaných sond bola vyššia ako  $T_m$  duplexov kontrolných nemodifikovaných sond ( $T_{m(0)}$ , Tabuľka 6). Teplota topenia **L** sond bola väčšinou o 4 až 5 °C vyššia ako teplota topenia kontrolných sond. Teplota topenia **S** sond bola vyššia väčšinou o 6 až 7 °C. Najlepší výsledok dosiahla sonda **S\_13\_2** s  $\Delta T_m$  až  $7,8 \pm 0,24$  °C. Toto pozorovanie bolo očakávané, vzhľadom na väčší absolútny príspevok stabilizátoru k väzbovej energii krátkych sond v porovnaní s dlhými sondami. Medzi sondami modifikovanými akridínom **2** a **4** neboli pozorované žiadne jednoznačné rozdiely (Tabuľka 6). Pozícia modifikácie (7 alebo 13) v sekvencii **S** a **L** sond nemala zásadný vplyv na  $\Delta T_{m(0)}$  plne komplementárnych duplexov. Sonda **L\_7\_11**, modifikovaná akridínom **11** (prakticky nefunkčná pri testoch v roztoku – viz Tabuľka 2), slúžila ako negatívna kontrola.  $\Delta T_{m(0)}$  plne komplementárneho duplexu tejto sondy bola zvýšená len veľmi mierne (1,7 °C)[P1].

Tabuľka 6. Teploty topenia modifikovaných ON sond.<sup>a,b</sup>

Kód	$T_{m(0)}$ (°C)	$T_m$ (°C)	$T_{m(A)}$ (°C)	$T_{m(C)}$ (°C)	$\Delta T_{m(0)}$ (°C)	$\Delta T_{m(A)}$ (°C)	$\Delta T_{m(C)}$ (°C)
S_7_2	38,3	44,0	35,5	25,3	5,7	8,5	18,7
S_13_2	38,3	46,2	38,2	21,7	7,8	8,0	24,5
S_7_4	38,3	45,7	37,3	28,0	7,3	8,3	17,7
S_13_4	38,3	45,2	36,2	21,2	6,8	9,0	24,0
S_7_32	-	-	-	-	-	-	-
S_13_32	38,5	43,5	35,5	19,3	5	8	24,2
S_7_41	38,3	46,8	39	29,5	8,5	7,8	17,3
S_13_41	38,3	45	35,5	20,8	6,7	9,5	24,2
L_7_2	58,3	62,0	57,6	53,2	3,7	4,4	8,8
L_13_2	58,3	62,3	57,9	51,2	3,9	4,4	11,1
L_7,13_2 <sup>c</sup>	58,3	-	-	-	-	-	-
L_7_4	58,3	63,2	58,2	54,0	4,9	5,0	9,2
L_13_4	58,3	62,9	58,2	52,1	4,6	4,7	10,9
L_7,13_4 <sup>c</sup>	58,3	-	-	-	-	-	-
L_7_32	58,0	61,5	55,3	52,7	3,5	6,2	8,8
L_13_32	58,0	61,0	55,7	49,2	3	5,3	11,8
L_7_41	58,3	63,9	58,3	54,7	5,5	5,5	9,2
L_13_41	58,3	64,3	58,5	54,3	6	5,9	10,1

<sup>a</sup>  $T_{m(0)}$ , teplota topenia nemodifikovaných kontrolných duplexov ( $C_S+T_S$  alebo  $C_L+T_L$ );  $T_m$ , teplota topenia duplexov modifikovaných ON sond s plne komplementárnym cieľom ( $T_S$  alebo  $T_L$ );  $T_{m(A)}$ , teplota topenia duplexov modifikovaných ON sond so sekvenciou variantu S65C A>T ( $T_{S(A)}$  alebo  $T_{L(A)}$ );  $T_{m(C)}$ , teplota topenia duplexov modifikovaných ON sond so sekvenciou variantu H63D C>G ( $T_{S(C)}$  or  $T_{L(C)}$ );  $\Delta T_{m(0)} = T_m - T_{m(0)}$ ,  $\Delta T_{m(A)} = T_m - T_{m(A)}$ ,  $\Delta T_{m(C)} = T_m - T_{m(C)}$ . <sup>b</sup>Určené fluorescenčnými meraniami na PCR cykléri. <sup>c</sup>Meltingový pík modifikovaných sond z fluorescenčných meraní nemohol byť riadne analyzovaný.  $\Delta T_{m(0)} = 6,6$  °C a  $7,0$  °C pre L\_7,13\_2 a L\_7,13\_4, boli určené pomocou na absorpčných meraní.

Zaujímavé chovanie bolo pozorované u L sond dvakrát značených akridínom (L\_7,13\_2 a L\_7,13\_4). U oboch viedla modifikácia dvoma akridínmi k posunu meltingových kriviek k vyšším teplotám, v porovnaní so sondami modifikovanými jedným akridínom, avšak tvar meltingových kriviek bol pozmenený a neumožňoval jednoznačnú analýzu meltingových píkov po derivácii (Obrázok 47)[P1]. Z tohto dôvodu bola zvolená alternatívna metóda určenia teploty topenia komplementárných duplexov týchto sond založená na meraní absorpcie, kedy pri rozvoľnení duplexu dochádza k zmene absorpcie pri  $\lambda = 260$  nm. Na túto analýzu bolo potrebné zvýšiť koncentráciu sond v testovanom roztoku na  $1 \mu\text{M}$ , pretože absorpčné merania sú menej citlivé ako fluorescenčné merania (fluorescenčné merania prebiehali s koncentráciou  $0,3 \mu\text{M}$ ). Zvýšená koncentrácia sond zvýšila teplotu topenia aj kontrolných sond približne o  $1,6$  °C. V prvom kroku boli porovnané dáta získané z fluorescenčných a absorpčných meraní teplôt topenia dvoch sond (L\_13\_2 a L\_7\_4). Hodnoty získané absorpčným meraním boli porovnateľné s hodnotami získanými fluorescenčným meraním a teda bolo možné použiť na absorpcii-založené meranie teploty topenia duplexov na určenie teplôt topenia sond dvakrát značených akridínom. Absorpčné meranie  $T_m$  poskytlo meltingové krivky, z ktorých boli deriváciou získané jednoznačné meltingové píky. Teploty topenia duplexov sond dvakrát značených akridínom s  $T_L$  boli zvýšené o  $6,6$  °C u L\_7,13\_2 a  $7,0$  °C u L\_7,13\_4 (Obrázok 47)[P1]. Toto zvýšenie teploty topenia je ešte vyššie ako u odpovedajúcich sond značených jedným akridínom a naznačuje väčší stabilizačný efekt dvoch akridínov na duplexy sond. Napriek tomu je využitie dodatočného stabilizačného efektu druhého akridínu obmedzené, vzhľadom na nemožnosť jednoznačnej analýzy fluorescenčných meltingových kriviek. Z tohto dôvodu neboli sondy dvakrát značené akridínom ďalej študované.

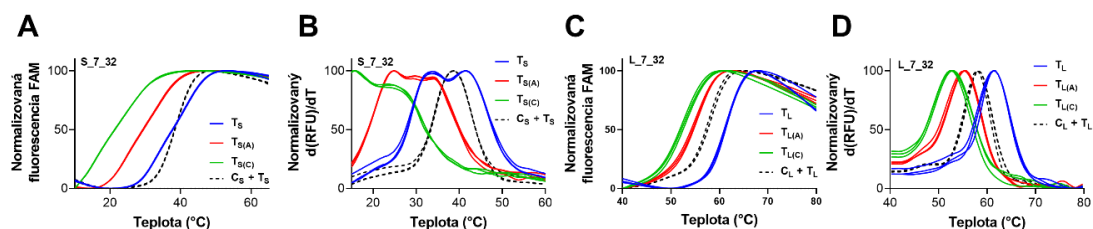


Obrázok 47. (A) Na fluorescencii-založené porovnanie normalizovaných meltingových kriviek a (B) meltingových píkox duplexov akridínom modifikovaných sond  $L_{7,13\_2}$ ,  $L_{13\_2}$ , a nemodifikovanej sondy  $C_L$  s plne komplementárnou sekvenciou  $T_L$ . (C) Na absorpcii-založené porovnanie normalizovaných meltingových kriviek a (D) normalizovaných meltingových píkox duplexov akridínom modifikovaných sond  $L_{7,13\_2}$ ,  $L_{7,13\_4}$ , a nemodifikovanej sondy  $C_L$  s plne komplementárnou sekvenciou  $T_L$ .

Na základe vyššie spomínaných povzbudivých výsledkov sond značených jedným akridínom bola ako ďalšia testovaná schopnosť týchto sond diskriminovať SNVs. Na tieto experimenty boli zvolené dve sekvencie HFE génu obsahujúce chybné párované bázy (jednonukleotidové varianty, SNVs), konkrétne H63D C>G (rs1799945, c.187, dochádza k chybnému párovaniu báz CC, sekvencie  $T_{S(C)}$  a  $T_{L(C)}$ ) a S65C A>T (rs1800730, c.193, dochádza k chybnému párovaniu báz AA, sekvencie  $T_{S(A)}$  a  $T_{L(A)}$ ) (Tabuľka 3). Obe variácie sú spojené s dedičnou hemochromatózou 1. typu.<sup>235, 236</sup> Teploty topenia duplexov akridínom značených sond so sekvenciami  $T_{S(A)}$ ,  $T_{S(C)}$ ,  $T_{L(A)}$  a  $T_{L(C)}$  (Tabuľka 3) boli porovnané s teplotami topenia plne komplementárnych duplexov. Vo všetkých prípadoch boli teploty topenia duplexov s SNVs (obsahujúcich chybné párované bázy) a akridínom značených sond výrazne nižšie ako teploty topenia plne komplementárnych duplexov týchto sond.  $\Delta T_{m(A)}$  hodnoty u duplexov sond so sekvenciami variantu S65C A>T boli v prípade krátkych sond 8 – 9 °C a v prípade dlhých sond 4 – 5 °C a neboli pozorované žiadne výrazné rozdiely medzi sondami berúc do úvahy pozíciu akridínu v sekvencii a typ použitého akridínu (**2** alebo **4**).  $\Delta T_{m(C)}$  hodnoty u duplexov sond so sekvenciami variantu H63D C>G dosahovali omnoho výraznejšie rozdiely v porovnaní s plne komplementárnymi duplexmi ( $\Delta T_{m(C)}$  až 24,3 °C, Tabuľka 6). Tieto rozdiely boli jasne závislé na pozícií akridínu v sekvencii, nie však na jeho type (akridín **2** alebo **4**). Stabilizácia duplexu s chybné párovanými bázami bola v prípade akridínu v pozícii 13 vždy nižšia, čo viedlo k nižším teplotám topenia a teda k vyšším hodnotám  $\Delta T_{m(C)}$  umožňujúcim lepšiu diskrimináciu chybného párovania báz. Aj v prípade duplexov s variantom H63D C>G boli teploty topenia dlhých sond v porovnaní s krátkymi sondami vyššie, a teda hodnoty  $\Delta T_{m(C)}$  nižšie, a to o viac ako polovicu. Z vyššie uvedeného môžeme konštatovať, že pripravené, akridínom modifikované sondy majú vynikajúce diskriminačné vlastnosti, ktoré boli potvrdené na HFE systéme.

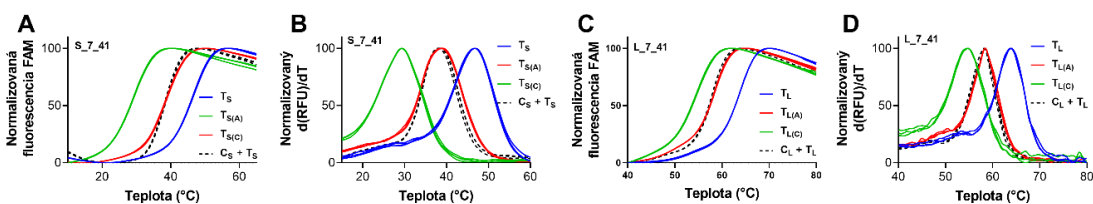
Neskôr pripravené sondy značené akridínmi **32** a **41** boli, podobne ako sondy spomínané vyššie, testované v reálnom meltingovom systéme pre HFE gén s cieľovými komplementárnymi sekvenciami ( $T_S$  – 13 báz,  $T_L$  – 18 báz) a neskôr aj so sekvenciami obsahujúcimi SNVs. Z meltingových kriviek duplexov sond značených akridínom **32** bolo možné jasne určiť teploty topenia u nasledujúcich sond  $S_{13\_32}$ ,  $L_{7\_32}$  a  $L_{13\_32}$ . Tieto duplexy poskytovali meltingové krivky sigmoidného tvaru, porovnateľné s kontrolným duplexom sond  $C_{S/L}$  (Obrázok 48C). Duplex sondy  $S_{7\_32}$  neposkytol, v porovnaní s kontrolným duplexom sondy  $C_S$ , meltingovú krivku posunutú k vyšším teplotám (Obrázok 48A). Meltingová krivka tohto duplexu bola pozmenená, a nebolo z nej možné po derivácii jasne určiť teplotu topenia (Obrázok 48B). Všetky ostatné sondy značené akridínom **32** boli schopné diskriminovať sekvenčné varianty HFE génu. Sondy značené týmto akridínom však neposkytovali lepšie výsledky  $\Delta T_m$  ako sondy značené akridínmi **2** a **4**. Druhá

karboxamidová skupina v polohe 5 akridínu **32** nezvyšuje účinnosť stabilizácie a schopnosť diskriminácie.



Obrázok 48. (A) Meltingové krivky a odpovedajúce meltingové píky (B) duplexov sondy **S\_7\_32** s plne komplementárnou sekvenciou  $T_S$  (modrá), **S\_7\_32** s krátkou sekvenciou  $T_{S(A)}$  variantu S65C A>T (červená), **S\_7\_32** s krátkou sekvenciou  $T_{S(C)}$  variantu H63D C>G (zelená) a kontrolného duplexu  $C_S + T_S$ . (C) Meltingové krivky a odpovedajúce meltingové píky (D) duplexov sondy **L\_7\_32** s plne komplementárnou sekvenciou  $T_L$  (modrá), **L\_7\_32** s dlhou sekvenciou  $T_{L(A)}$  variantu S65C A>T (červená), **L\_7\_32** s dlhou sekvenciou  $T_{L(C)}$  variantu H63D C>G (zelená) a kontrolného duplexu  $C_L + T_L$ .

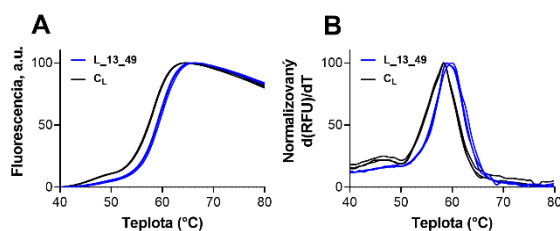
Duplexy sond značených akridínom **41** poskytovali meltingové krivky sigmoidného tvaru, porovnateľné s duplexmi kontrolných sond  $C_{S/L}$  (Obrázok 49).  $\Delta T_m$  duplexov sond značených akridínom **41** boli vo všeobecnosti väčšie ako u sond značených akridíni **2**, **4** a **32** (Tabuľka 6). Všetky sondy značené akridínom **41** boli schopné veľmi dobre diskriminovať medzi WT a sekvenčnými variantmi S65C A>T a H63D C>G HFE génu. Meltingové píky obsahovali len veľmi mierne artefakty, ktoré boli predtým pozorované u sond značených akridínom **4** (Obrázok 49). Zmenšenie týchto artefaktov má potenciálne vysvetlenie v znížení schopnosti interakcie akridínu s FAM zo sterických dôvodov. Modifikácia štruktúry akridínu **41** (zmena spôsobu a polohy naviazania linkeru nesúceho azidoskupinu) mali pozitívny vplyv na schopnosť stabilizovať duplex DNA, a to voľne v roztoku a aj po konjugácii s ON sondami. Táto modifikácia priniesla lepšie výsledky pri testovaní schopnosti stabilizácie duplexu akridínom **41**, a taktiež do budúca umožní používanie štandardne chránených báz pri syntéze ON sond na pevnej fáze, čo bude mať za následok zlacnenie výroby ON sond modifikovaných týmto akridínom. Do budúca má preto tento akridín (prípadne jeho redukovaná forma – **44**, ktorý nebol testovaný z časových dôvodov) najväčší potenciál pro praktické využitie.



Obrázok 49. (A) Meltingové krivky a odpovedajúce meltingové píky (B) duplexov sondy **S\_7\_41** s plne komplementárnou sekvenciou  $T_S$  (modrá), **S\_7\_41** s krátkou sekvenciou  $T_{S(A)}$  variantu S65C A>T (červená), **S\_7\_41** s krátkou sekvenciou  $T_{S(C)}$  variantu H63D C>G (zelená) a kontrolného duplexu  $C_S + T_S$ . (C) Meltingové krivky a odpovedajúce meltingové píky (D) duplexov sondy **L\_7\_41** s plne komplementárnou sekvenciou  $T_L$  (modrá), **L\_7\_41** s dlhou sekvenciou  $T_{L(A)}$  variantu S65C A>T (červená), **L\_7\_41** s dlhou sekvenciou  $T_{L(C)}$  variantu H63D C>G (zelená) a kontrolného duplexu  $C_L + T_L$ .

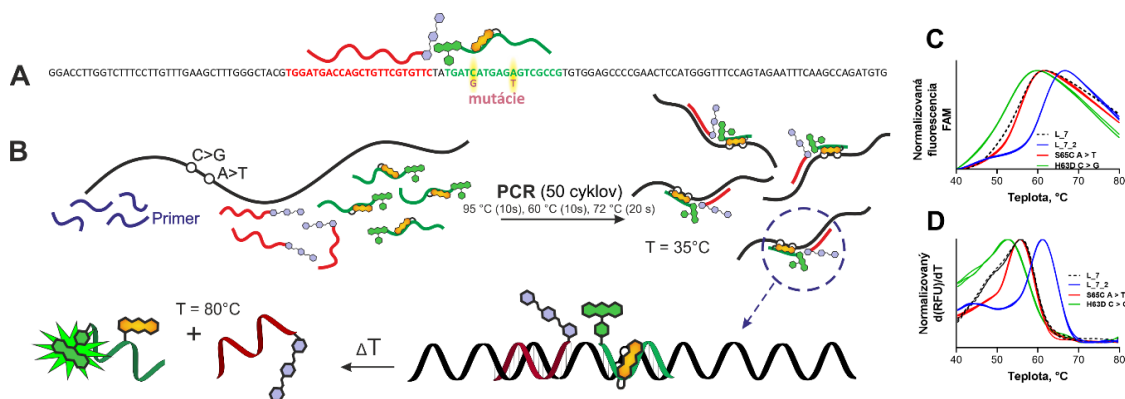
Na účel porovnania účinnosti stabilizácie duplexov sond konjugovaných s akridíni boli do testovania zaradené aj sondy konjugované s modifikovaným spermínom (**48**) a modifikovaným farbivom Hoechst (**49**). Pri testovaní sond značených azidoderivátom biogénneho polyamínu spermínu (**48**) bolo pozorované neobvyklé chovanie týchto sond. Pri zvyšovaní teploty nedochádzalo k nárastom fluorescence typickým pre FAM značené sondy, dokonca nedochádzalo k žiadnemu nárastu fluorescence. Preto nebolo vôbec možné určiť  $T_m$  týchto sond. U sondy

modifikovanej MGB 49 dochádzalo len k veľmi miernemu zvýšeniu  $T_m$  jej duplexu s  $T_L$  (len 0,9 °C, Obrázok 50).



Obrázok 50. (A) na fluorescencii založené porovnanie normalizovaných meltingových kriviek a (B) normalizovaných meltingových pík duplexov MGB modifikovanej sondy  $L_{13\_49}$ , a kontrolného duplexu nemodifikovanej sondy  $C_L + T_L$ .

Akridínom modifikované sondy boli následne použité na určenie SNVs HFE génu v systéme Quenched FRET sond na modeli reálnych vzoriek. Na určenie prítomnosti variantov boli ako templáty použité plazmidy (pred PCR linearizované) s naklonovaným prirodzene sa vyskytujúcim variantom (wild-type – WT) alebo sekvenčnými variantmi HFE génu. Fluorescenčná sonda  $L_{7\_2}$  diskriminovala WT od oboch variantov S65C A>T či H63D C>G. Templát ( $1 \times 10^5$  kópií) bol amplifikovaný pomocou PCR s následnou meltingovou analýzou so sekvenciou nesúcou BHQ1 zhášač hybridizovanou v tesnej blízkosti reportérovej sondy. Bola pozorovaná dobrá diskriminácia medzi WT a sekvenčnými variantmi, podobne ako vo vyššie popísaných experimentoch (Obrázok 51).



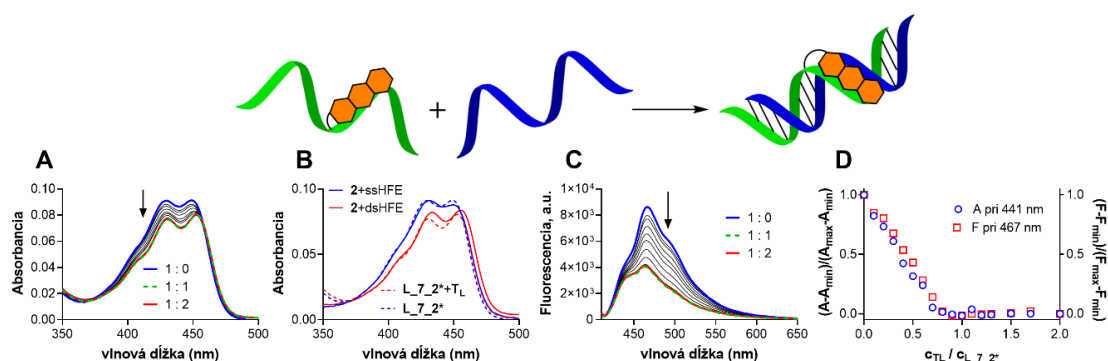
Obrázok 51. Diskriminácia sekvenčných variantov HFE génu na modeli reálnych vzoriek. (A) Templát obsahujúci sekvenciu HFE génu. (B) Princíp diskriminácie. (C) Meltingové krivky a meltingové píky (D) WT variantu HFE (modrá), jeho sekvenčného variantu S65C A>T (červená), a H63D C>G (zelená), diskriminované pomocou sondy  $L_{7\_2}$ . Výsledok kontrolného experimentu so sondou  $L_7$  (bez konjugácie s akridínom) a WT variantom HFE je znázornený prerušovanou čiernou čiarou.

#### 4.6 Štúdium interkalácie akridínu 2 viazaného na ON pomocou absorpčných a fluorescenčných meraní

Na štúdium interkalácie akridínu 2 konjugovaného na ON sondu bolo potrebné pripraviť sondu  $L_{7\_2}^*$ , ktorá nie je značená FAM, kvôli interferencii jeho absorpčného a emisného spektra so spektrami akridínu 2. Fluorescencia akridínu 2 umožnila sledovať zmeny jeho interakcie s DNA pomocou jeho emisného spektra ( $\lambda_{em} = 520$  nm,  $\Phi_F = 0,49$  pre akridín 2 (v MeOH)). Roztok sondy  $L_{7\_2}^*$  bol titrovaný sekvenciou  $T_L$  (bez BHQ1) a absorpčné a emisné spektrum roztoku (Obrázok 52A, C) bolo zmerané po každom prídavku a hybridizácii. Absorpčné spektrum samotnej sondy pred titráciou pripomínalo absorpčné spektrum akridínu 2 viazaného na ssON HFE sense (Obrázok 52B). Podobnosť absorpčných spektier akridínu 2 kovalentne viazaného na ON sondu a akridínu voľne interkalovaného do ssHFE naznačuje, že akridín 2 v rámci  $L_{7\_2}^*$  interaguje s nukleovými

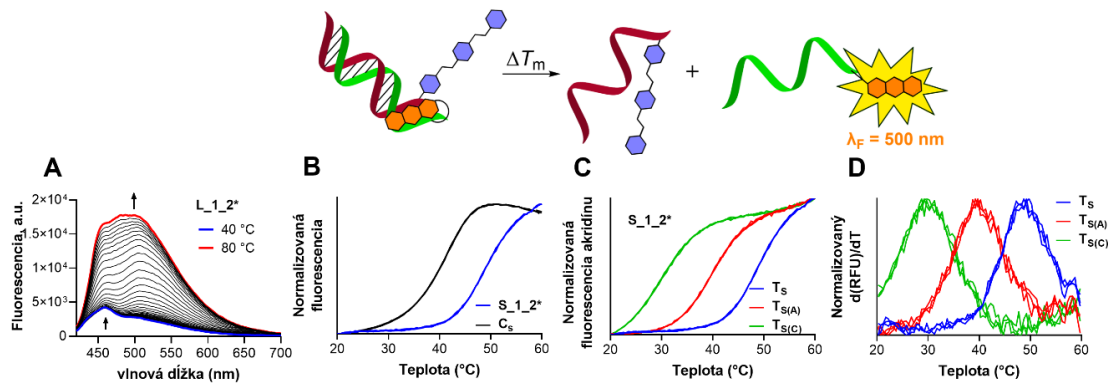


bázami už v samotnej (jednovláknovej) sonde. Zmeny absorpčného spektra boli po postupnom pridávaní a hybridizácii s  $T_L$  minimálne (bathochromné a hypochromné), napriek tomu dobre pozorovateľné (Obrázok 26A). Tieto malé zmeny naznačovali interakciu s novo vznikajúcim duplexom, čo potvrdzovala podobnosť absorpčného spektra pri pomere  $L_{7\_2^*}$  a  $T_L$  1:1 so spektrom akridínu **2** nekonjugovaného so sondou a interkalovaného do dsHFE (Obrázok 52B). Merania emisného spektra odhalili zníženie intenzity fluorescence o 53 % (tvar spektra zostal rovnaký) po hybridizácii s  $T_L$  (Obrázok 52C). Zmeny pri meraní absorpcie a fluorescence postupovali až do očakávaného pomeru  $L_{7\_2^*}$  a  $T_L$  1:1, kedy s pridávaním ďalšieho množstva  $T_L$  už k ďalším zmenám nedochádzalo (Obrázok 52A, C, D). Pozorované zmeny v absorpčnom a emisnom spektre sú pravdepodobne spôsobené prechodom zo stavu interkalácie v ssON do interkalácie v dsON, kde je zvýšené zhášanie fluorescence akridínu nukleovými bázami.



Obrázok 52. (A, C) Zmeny absorpčného (A) a emisného (C) spektra sondy  $L_{7\_2^*}$  titrovanej  $T_L$ ; (B) Porovnanie absorpčných spektier roztoku akridínu **2** (plné čiary) viazaného na ssHFE (modrá) alebo dsHFE (červená). Prerušované čiary patria absorpčným spektrám sondy  $L_{7\_2^*}$  s (červená) alebo bez (modrá) komplementárnej sekvencie  $T_L$ ; (D) normalizované zmeny absorpcie (modrá) a fluorescence (červená) sondy  $L_{7\_2^*}$  počas titrácií  $T_L$  (z dát grafov A a C). koncentrácia sondy  $L_{7\_2^*}$  bola  $10 \mu\text{M}$ .  $T = 23 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Akridín samotný môže byť potenciálne využitý aj ako reportér, a to vďaka vlastnej fluorescence akridínového jadra. Táto možnosť bola overená pomocou troch sond modifikovaných akridínom **2** (bez FAM) –  $S_{1\_2^*}$ ,  $L_{1\_2^*}$  a  $L_{7\_2^*}$ . Dodatočná pozícia 1 (na 5'-konci) bola zvolená vzhľadom na pôvodnú pozíciu 1 s reportérom (FAM), kedy by mal akridín slúžiť v tejto pozícii aj ako reportér. Duplexy sond s odpovedajúcimi antisense sekvenciami ( $T_L$  a  $T_S$ ) mali nízku fluorescence vďaka jej zhášaniu nukleovými bázami a zhášačom BHQ1 (Obrázok 53). So zvyšovaním teploty sa zvyšovala aj fluorescence roztoku, kde prebiehalo topenie duplexu a vzdalovanie akridínu od zhášača (Obrázok 53). Meltingové krivky vynesené do grafu ako zmeny fluorescence akridínu ( $\lambda_{\text{ex}} = 400 \text{ nm}$ ) pri  $\lambda_{\text{em}} = 500 \text{ nm}$  (najväčšia zmena emisie) mali sigmoidný tvar porovnateľný s nemodifikovanou kontrolnou sondou  $C_S$  (Obrázok 53B, Príloha 7, Obrázok 60). Takto získané meltingové krivky duplexov sond  $S_{1\_2^*}$  ( $\Delta T_{m(0)} = 7,9 \text{ }^\circ\text{C}$ ),  $L_{1\_2^*}$  ( $\Delta T_{m(0)} = 6,1 \text{ }^\circ\text{C}$ ) a  $L_{7\_2^*}$  ( $\Delta T_{m(0)} = 4,3 \text{ }^\circ\text{C}$ ) boli vďaka stabilizáciám posunuté k vyšším teplotám. Tieto sondy boli testované v modifikovanom HFE meltingovom systéme (termálna denaturácia) s komplementárnymi sekvenciami ( $T_S$  a  $T_L$ , Obrázok 53) a so sekvenciami variantov S65C A>T a H63D C>G (Obrázok 53C,D). Aj v tomto prípade bola pozorovaná dobrá diskriminácia sekvenčných variantov HFE génu (Tabuľka 7) najmä u sondy  $S_{1\_2^*}$  (Obrázok 53C, D). Na základe vyššie uvedených výsledkov je možné akridín použiť súčasne ako stabilizátor a vďaka jeho fluorescence aj ako fluorescenčný reportér.



Obrázok 53. (A) Teplotne závislé zmeny emisného spektra ( $\lambda_{ex} = 400 \text{ nm}$ ) duplexu sondy  $L_1_2^*$  s  $T_L$ . (B) Porovnanie meltingových kriviek duplexov sond  $S_1_2^*$  (modrá) a  $C_S$  (čierna) s plne komplementárnou  $T_S$ . (C) Porovnanie meltingových kriviek a meltingových pík duplexov (D) sond  $S_1_2^*$  s plne komplementárnou  $T_S$  (modrá),  $S_1_2^*$  s krátkou sekvenciou  $T_{S(A)}$  variantu S65C A>T (červená), a  $S_1_2^*$  s krátkou sekvenciou  $T_{S(C)}$  variantu H63D C>G (zelená).

Tabuľka 7 Teploty topenia sond modifikovaných iba akridínom získané z fluorescenčných meraní.<sup>a</sup>

Kód	$T_{m(0)}$ (°C)	$T_m$ (°C)	$T_{m(A)}$ (°C)	$T_{m(C)}$ (°C)	$\Delta T_{m(0)}$ (°C)	$\Delta T_{m(A)}$ (°C)	$\Delta T_{m(C)}$ (°C)
$S_1_2^*$	41,30	49,00	39,30	25,90	7,70	9,70	19,50
$L_1_2^*$	61,00	67,20	61,80	58,70	6,20	5,40	8,50
$L_7_2^*$	61,00	65,60	58,70	58,10	4,60	6,90	7,50

<sup>a</sup>  $T_{m(0)}$ , teplota topenia nemodifikovaných kontrolných duplexov ( $C_S+T_S$  alebo  $C_L+T_L$ );  $T_m$ , teplota topenia duplexov modifikovaných ON sond s plne komplementárnym cieľom ( $T_S$  alebo  $T_L$ );  $T_{m(A)}$ , teplota topenia duplexov modifikovaných ON sond so sekvenciou variantu S65C A>T ( $T_{S(A)}$  alebo  $T_{L(A)}$ );  $T_{m(C)}$ , teplota topenia duplexov modifikovaných ON sond so sekvenciou variantu H63D C>G ( $T_{S(C)}$  or  $T_{L(C)}$ );  $\Delta T_{m(0)} = T_m - T_{m(0)}$ ,  $\Delta T_{m(A)} = T_m - T_{m(A)}$ ,  $\Delta T_{m(C)} = T_m - T_{m(C)}$ .

## 5 Záver

Táto dizertačná práca bola venovaná hlavne syntéze akridínov, potenciálne schopných zvýšiť termálnu stabilitu duplexov DNA a duplexov ON sond konjugovaných s týmito akridínmi. Nadväzujúca časť dizertačnej práce bola venovaná modifikácii ON sond na pevnej fáze s následným odštiepením, deprotekciovou a purifikáciou pomocou HPLC. Tretia časť dizertačnej práce bola venovaná extenzívnemu testovaniu a vyhodnocovaniu modifikovaných sond v spolupráci s kolegami z firmy Generi Biotech. Posledná, štvrtá časť dizertačnej práce bola venovaná štúdiu interakcie akridínov s DNA (jedno, či dvojvláknovou). Syntetická časť priniesla niekoľko zaujímavých štruktúr akridínov, ktoré majú potenciál uplatnenia v praxi (2, 4, 41). Boli stanovené základné vzťahy medzi štruktúrou a aktivitou, ktoré odhalili dôležité štruktúrne rysy, kde najdôležitejším rysom je prítomnosť sekundárnej karboxamidovej skupiny v polohe 4 a dvojuhlíkatý linker k bázičkej skupine, ktorá by mala byť podľa možností čo najmenšia (dimetylamino-, či aminoskupina). Duplexy sond značených FAM a konjugovaných s týmito akridínmi mali zvýšenú termálnu stabilitu a niekoľkonásobne prekonávali výsledky sond konjugovaných s polyamínom či MGB. SONDY konjugované s akridínmi výborne diskriminovali SNVs (S65C A>T, H63D C>G) použitej sekvencie HFE génu. Iba plne komplementárne duplexy týchto sond mali v porovnaní s kontrolnými duplexmi nemodifikovaných sond zvýšenú teplotu topenia. Testy sond v reálnom PCR systéme pre HFE gén poskytli veľmi dobré výsledky diskriminácie variantov sekvencie HFE génu podobné tým z meltingových štúdií. Zmeny tvarov absorpčných a intenzity emisných spektier akridínov poukazujú na interakciu akridínov s DNA formou interkalácie. Bolo preukázané, že vďaka vlastnej fluorescencii akridínového jadra je možné použiť akridín ako fluorescenčný reportér a zároveň stabilizátor duplexu DNA. Vybrané akridínové deriváty môžu slúžiť ako vhodné stabilizátory duplexov DNA a súčasne ako fluorofory pre DNA duplexy, hlavne pre krátke sondy schopné diskriminácie jednonukleotidových variantov. Na použitie akridínov ako stabilizátorov a súčasne ako fluoroforov je ale potrebná ďalšia optimalizácia fotofyzikálnych vlastností akridínov.

## 6 Experimentálna časť

Použité organické rozpúšťadlá boli v analytickej kvalite. Chemikálie použité na syntézu zlúčenín boli komerčne dostupné u zavedených dodávateľov (Sigma-Aldrich, Acros, Merck, Fluorochem, VWR a TCI Europe) a boli použité v stave, v akom boli dodané.

Na tenkovrstvovú chromatografiu boli použité dosky Silica gel 60 F254 (Merck, Darmstadt, Nemecko). Čistenie produktov prebiehalo pomocou preparatívnej stĺpcovej chromatografie na stacionárnej fáze Merck Kieselgel 60 (0,040-0,063 mm). Teploty topenia (t.t.) boli stanovené na prístroji Electrothermal IA9200 Series Digital Melting Point apparatus (Electrothermal Engineering Ltd., Southend-on-Sea, Essex, Veľká Británie).  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR spektrá boli zmerané na prístroji Varian Mercury Vx BB 300 alebo VNMR S500 a na prístroji Jeol JNM-ECZ600R spectrometer (Jeol, Peabody, MA, USA) na Katedre organické a bioorganické chemie. Chemické posuny sú vzťahované relatívne k vnútornému štandardu  $\text{Si}(\text{CH}_3)_4$ . IČ spektrá boli zmerané v peletách KBr na IČ spektrofotometri Nicolet 6700 v ATR móde na Katedre organické a bioorganické chemie. UV/Vis spektrá boli merané pomocou prístroja Shimadzu UV-2600 spectrophotometer. Fluorescenčné spektrá boli merané pomocou prístroja FLS1000 spectrofluorometer (Edinburgh Instruments Ltd, Edinburgh, UK) alebo FS5 fluorescence spectrophotometer (Edinburgh Instruments Ltd, UK). HRMS spektrá boli merané na prístroji UHPLC system Acquity UPLC I-class (Waters, Millford, USA) spojenom s hmotnostným spektrometrom s vysokým rozlíšením (high resolution mass spectrometer - HRMS) Synapt G2Si (Waters, Manchester, UK) založenom na Q-TOF. Chromatografická separácia prebiehala na prístroji Shimadzu LC20 chromatograph (Kyoto, Japan), zloženom z DGU-20A3 solvent degasser, dvoch LC-20AD binárnych gradientových púmp, SIL-20AC autosamplera s 100- $\mu\text{L}$  slučkou na vzorku, CTO-20AC termostatu, SPD-M20A photodiode array detector (PDA) a CBM-20A system controller. Chromatografické dáta boli zaznamenané a analyzované pomocou LabSolutions software 5.3 (Shimadzu, Kyoto, Japan). Semipreparatívna HPLC separácia bola použitá na čistenie pripravených oligodeoxynukleotidových sond pomocou Phenomenex Luna 5u Phenyl-Hexyl (150 $\times$ 3,0 mm; veľkosť častíc 5  $\mu\text{m}$ ) kolóny za použitia izokratickej elúcie a mobilnej fázy acetonitril (ACN) a 50 mmol trietylamónium acetátový pufor, prietoku 1 ml/min a teploty termostatu 40°C. Hmotnostné spektrá oligodeoxynukleotidových sond boli zmerané pomocou prístroja MALDI-TOF Bruker Daltonics Autoflex II mass spectrometer (Bruker, Bellerica, MA, USA) s 3-hydroxypikolínovou kyselinou a citrátom amónnym v 50% acetonitrile ako matrix.

Nasledujúce látky boli pripravené podľa publikovaných postupov: *tert*-butyl (2-aminoetyl)karbamát,<sup>237</sup> 1-azido-6-brómhexán,<sup>238</sup> 1,6-diazidohexán,<sup>238</sup> 6-azidohexán-1-amín,<sup>238</sup> *bis*(2-metyl-2-propanyl) biskarbamát,<sup>239</sup> *tert*-butyl (6-aminohexyl)karbamát, 2-chlór-*N*-(2-jódfenyl)acetamid,<sup>240</sup> (*E*)-2-(hydroxyimino)-*N*-(2-jódfenyl)acetamid,<sup>241</sup> 7-jódindolín-2,3-dión,<sup>242</sup> 2-amino-3-jódbenzoová kyselina<sup>243</sup> a hex-5-ýn-1-yl metánsulfonát (HMS).<sup>244</sup>

### 6.1 Syntéza

#### 6.1.1 2-(fenylamino)benzoová kyselina (13)

K bezvodému  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (36,11 g) bola pridaná kyselina 2-chlórbenzoová (20,46 g, 131 mmol), izoamylalkohol (120 ml) a katalytické množstvo práškovej medi (0,05 ekviv.). Za stáleho miešania bol do zmesi pridaný anilín (12,24 g, 131 mmol) a zmes bola miešaná a zahrievaná 24 h. Následne bol zo zmesi za zníženého tlaku oddestilovaný izoamylalkohol. Surový produkt bol rozpustený v 1M NaOH (150 ml) a naliaty do horúcej vody (1 l). Do roztoku bola pridaná koncentrovaná kyselina chlorovodíková do kyslej reakcie. Vzniknutá zrazenina bola odsatá a premytá horúcou vodou (0,5 l). Vysušená zrazenina bola rozpustená za tepla v 96 % EtOH (350 ml). Do miešajúcej sa zmesi bola pridávaná destilovaná voda do stáleho zakalenia. Zmes bola ponechaná 20 h pri

laboratórnej teplote. Produkt bol vyčistený stĺpcovou chromatografiou na silikageli (1. CHCl<sub>3</sub>, 2. CHCl<sub>3</sub>:MeOH 4:1). Bolo získaných 11,96 g bledožltého prášku. Výťažok 43 %.

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*D*<sub>6</sub>) δ 13,07 (s, 1H); 9,63 (s, 1H); 7,90 (dd; *J* = 8,0; 1,7 Hz; 1H); 7,42 – 7,31 (m; 3H); 7,27 – 7,19 (m; 3H); 7,07 (tt; *J* = 7,6; 1,3 Hz; 1H); 6,77 (ddd; *J* = 8,1; 7,0; 1,1 Hz; 1H). <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, DMSO-*D*<sub>6</sub>) δ 170,41; 147,46; 140,96; 134,63; 132,34; 129,95; 123,55; 121,85; 117,87; 114,20; 113,01.

### 6.1.2 2,2'-iminodibenzoová kyselina (14)

K bezvodému K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (5 g) bola pridaná kyselina antranilová (6,8 g) a kyselina 2-chlórbenzoová (7,8 g). Do zmesi bol pridaný izoamylalkohol (70 ml) a katalytické množstvo práškovej medi. Zmes bola miešaná 24 h pri teplote 140 °C. Následne bol zo zmesi za zníženého tlaku oddestilovaný izoamylalkohol a surový produkt bol prenesený do horúcej vody (1 l). Zmes bola miešaná a zahrievaná do rozpustenia produktu. Následne bola do zmesi pridaná koncentrovaná kyselina chlorovodíková, do kyslej reakcie. Vzniknutá zrazenina bola odsatá a premytá horúcou vodou (0,5 l). Zrazenina bola rozpustená v 1M NaOH a za miešania a zahrievania bolo pridané aktívne uhlie (0,5 g). Zmes bola prefiltrovaná a k filtrátu bola pridaná koncentrovaná kyselina chlorovodíková do kyslej reakcie. Zrazenina bola odsatá a premytá horúcou vodou (0,5 l) a vysušená. Vysušená zrazenina bola rozpustená za tepla v 96 % EtOH (1 l). Do miešajúcej sa zmesi bola pridaná destilovaná voda do stáleho zakalenia. Zmes bola ponechaná 20 h pri laboratórnej teplote. Vzniknutá zrazenina bola odsatá a vysušená. Bolo pripravených 5,14 g jemne žltej, pevnej kryštalickej látky. Výťažok 32 %.

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*D*<sub>6</sub>) δ 13,01 (s; 2H); 10,83 (s; 1H); 7,91 (dd; *J* = 8,0; 1,6 Hz; 2H); 7,48 – 7,38 (m; 4H); 6,94 (ddd; *J* = 8,1; 6,7; 1,5 Hz; 2H). <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, DMSO-*D*<sub>6</sub>) δ 168,56; 143,76; 133,52; 131,97; 120,15; 117,77; 117,74.

### 6.1.3 metyl 9-oxo-9,10-dihydroakridín-4-karboxylát (15)

K látke **14** (7,78 g, 30,24 mmol) bol pridaný POCl<sub>3</sub> (90 ml) a zmes bola miešaná 1 h pri teplote 140 °C. Do zmesi ochladenej na 50 °C bol postupne po kvapkách pridávaný bezvodý MeOH (100 ml) po dobu 2 h. Následne bol do zmesi za stáleho miešania pridávaný ďalší POCl<sub>3</sub> do rozpustenia zrazeniny a zmes bola miešaná 12 h pri teplote 50 °C. Prebytočný MeOH bol zo zmesi oddestilovaný za zníženého tlaku a vzniknuté kryštály boli odsaté a prekryštalizované z horúceho MeOH. Kryštály boli odsaté, premyté ľadovým MeOH a vysušené. Bolo získaných 6,11 g hnedožltej kryštalickej látky. Výťažok 79 %.

T.t. 170,8 -172,1 °C. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, Chloroform-*D*) δ 11,70 (s; 1H); 8,70 (m; 1H); 8,41 (m; 2H); 7,67 (m; 1H); 7,37 (m; 1H); 7,33 – 7,18 (m; 2H); 4,00 (s; 3H). <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, Chloroform-*D*) δ 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. IČ (ATR)  $\nu_{\max}$  = 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 cm<sup>-1</sup>. HRMS (*m/z*): [M+H]<sup>+</sup> vypočítané pre C<sub>15</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>3</sub>, 254,0812; namerané: 254,0818.

### 6.1.4 metyl 9-[(6-azidohexyl)amino]akridín-4-karboxylát (16)

K látke **15** (2,06 g, 8,13 mmol) bol pridaný SOCl<sub>2</sub> (8 ml) a katalytické množstvo DMF a zmes bola miešaná pri teplote 80 °C. Potom bol zo zmesi za zníženého tlaku oddestilovaný SOCl<sub>2</sub>. Do surového produktu bol pridaný suchý fenol (7,75 g, 82,35 mmol) a zmes bola zahriata na 110 °C a miešaná po dobu 15 minút. Potom bola teplota znížená na 55 °C a do zmesi bol pridaný 6-azidohexyl-1-amin (2,95 g, 20,74 mmol). Zmes bola miešaná pri teplote 55 °C 24 hodín. Po

ukončení reakcie bola zmes rozpustená v chloroforme a vytrepaná 2M roztokom NaOH (1 × 85 ml). Organická vrstva bola vysušená Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a odparená za zníženého tlaku. Produkt bol prečistený stĺpcovou chromatografiou na silikageli s etylacetátom (EAC) ako mobilnou fázou. Frakcie s čistým produktom boli odparené. Bolo získaných 2,42 g hnedooranžovej olejovitej látky. Výťažok 94 %.

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, Chloroform-*D*) δ 11,08 (bs; 1H); 8,99 – 7,81 (m; 3H); 7,48 (s; 1H); 7,32 – 6,98 (m; 3H); 4,05 – 3,84 (m; 5H); 3,27 (t; J = 7,0 Hz; 2H); 2,01 – 1,81 (m; 2H); 1,65 (p; J = 7,0 Hz; 2H); 1,59 – 1,42 (m; 4H). <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, Chloroform-*D*) δ 168,56; 140,51; 133,35; 132,66; 131,26; 129,26; 128,90; 120,35; 117,25; 115,53; 52,71; 52,22; 51,40; 32,30; 28,79; 26,99; 26,57. IČ (ATR) ν<sub>max</sub> = 3280, 2935, 2847, 2818, 2091, 1689, 1608, 1573, 1519, 1487, 1465, 1446, 1436, 1415, 1370, 1321, 1279, 1269, 1254, 1195, 1161, 1141, 1124, 1079, 1068, 1019, 995, 941, 908, 891, 854, 829, 780, 766, 754, 746, 731, 684, 665, 657, 612 cm<sup>-1</sup>.

#### 6.1.5 9-[(6-azidohexyl)amino]akridín-4-karboxylová kyselina (17)

K roztoku látky **16** (2 g, 5,30 mmol) v THF bol pridaný nadbytok nasýteného roztoku NaOH v zmesi MeOH/H<sub>2</sub>O 5:1. Zmes bola miešaná 1 h pri laboratórnej teplote. Potom boli zo zmesi oddestilované organické rozpúšťadlá za zníženého tlaku. Zmes bola rozpustená vo vode (100 ml) a vytrepaná CHCl<sub>3</sub> (3 × 80 ml). Organická vrstva bola vysušená Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a zmes bola zahustená za zníženého tlaku. Potom bola zmes vytrepaná 10% HCl a organická vrstva bola vysušená Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a odparená za zníženého tlaku. Produkt bol prečistený stĺpcovou chromatografiou na silikageli (chloroform/MeOH 4:1). Bolo získaných 1,44 g žltlooranžovej kryštalickej látky. Výťažok 74 %.

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, Chloroform-*D*) δ 11,21 (s; 1H); 8,81 (t; J = 6,5 Hz; 2H); 8,71 (d; J = 8,7 Hz; 1H); 7,74 (t; J = 7,6 Hz; 1H); 7,67 (d; J = 8,4 Hz; 1H); 7,44 (t; J = 7,9 Hz; 1H); 7,38 (t; J = 7,9 Hz; 1H); 4,19 (t; J = 7,5 Hz; 2H); 3,16 (t; J = 6,8 Hz; 2H); 2,13 (p; J = 7,5 Hz; 2H); 1,59 – 1,46 (m; 4H); 1,46 – 1,36 (m; 2H). <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, Chloroform-*D*) δ 170,69; 158,10; 141,50; 139,48; 137,48; 134,16; 128,46; 126,19; 123,91; 123,05; 122,23; 119,70; 113,45; 112,87; 51,19; 49,20; 29,61; 28,60; 26,49; 26,30. IČ (ATR) ν<sub>max</sub> = 2936, 2859, 2095, 1622, 1584, 1553, 1532, 1479, 1441, 1382, 1337, 1277, 1236, 1171, 1085, 1070, 1041, 972, 935, 889, 780, 750, 663, 642, 632, 619 cm<sup>-1</sup>. HRMS (m/z): [M+H]<sup>+</sup> vypočítané pre C<sub>20</sub>H<sub>21</sub>N<sub>5</sub>O<sub>2</sub>, 364,1768, zmerané: 364,1780.

#### 6.1.6 N-(6-azidohexyl)akridín-9-amín (1)

Zmes látky **13** (1,00 g, 4,7 mmol) a POCl<sub>3</sub> (10 ml) bola miešaná a zahrievaná 1 h pri 140 °C. Následne bol zo zmesi za zníženého tlaku oddestilovaný POCl<sub>3</sub>. Rezíduum bolo použité bez ďalšieho čistenia v nasledujúcej reakcii. K rezídiu bol pridaný suchý fenol (4,42 g, 47 mmol) a zmes bola miešaná 15 minút pri teplote 110 °C. Reakčná zmes bola následne ochladená na 55 °C a do zmesi bol pridaný 6-azidohexán-1-amín (1,34 g, 9,41 mmol) a zmes bola ďalej miešaná 24 h pri teplote 55 °C. Reakčná zmes bola rozpustená v chloroforme a vytrepaná 2M NaOH (1 × 50 ml). Organická vrstva bola oddelená a vysušená bezvodým síranom sodným. Prebytočný chloroform bol zo zmesi oddestilovaný za zníženého tlaku. Produkt bol prečistený stĺpcovou chromatografiou na silikageli (EAC). Čisté frakcie boli spojené a EAC bol oddestilovaný. Bolo získaných 282 mg žltej amorfnej látky. Výťažok 19 %.

T.t.: 100.6 – 102.2 °C. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, Chloroform-*D*) δ 10,21 (bs; 1H); 8,45 (d; J = 8,6 Hz; 2H); 8,07 (d; J = 8,5 Hz; 2H); 7,48 (t; J = 7,7 Hz; 2H); 7,21 (t; J = 7,8 Hz; 2H); 4,06 (t; J = 7,5 Hz; 2H); 3,18 (t; J = 6,8 Hz; 2H); 2,04 (p; J = 7,5 Hz; 2H); 1,56 – 1,33 (m; 6H). <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, Chloroform-*D*) δ 156,62; 140,30; 138,58; 125,22; 122,93; 119,68; 112,49; 51,07; 48,58; 29,81; 28,51; 26,29; 26,19. IČ (ATR) ν<sub>max</sub> = 3188, 3030, 2934, 2859, 2788, 2094, 1635, 1588, 1569, 1535, 1473, 1362, 1340, 1272, 1191, 1170, 1143, 1115, 1091, 1036, 953, 869, 748, 733, 698, 661, 640, 632 cm<sup>-1</sup>. HRMS (m/z): [M+H]<sup>+</sup> vypočítané pre C<sub>19</sub>H<sub>22</sub>N<sub>5</sub>, 320.1870, nájdené, 320.1879.

### 6.1.7 Obecný postup 1

Zmes látky **17** (200 mg; 0,55 mmol), HBTU (420 mg; 1,11 mmol), a trietylamínu (112 mg; 1,11 mmol) v DCM bola mikrosuspendovaná 15 minút v ultrazvukovom kúpeli. Do miešanej zmesi vychladenej na -10 °C bol pridaný odpovedajúci amín alebo derivát amínu (0,55 mmol). Zmes bola ďalej miešaná v ľadovom kúpeli po dobu 30 minút. Následne bol za zníženého tlaku zo zmesi oddestilovaný DCM. Produkt bol prečistený stĺpcovou chromatografiou na silikageli.

### 6.1.8 Obecný postup 2

Látka **17** (200 mg, 0.55 mmol) bola rozpustená v SOCl<sub>2</sub> (2 ml) a zmes bola miešaná pri laboratórnej teplote 1 h. SOCl<sub>2</sub> bol za zníženého tlaku zo zmesi oddestilovaný. Rezíduum bolo rozpustené v bezvodom DCM a po kvapkách pridávané do miešajúcej sa zmesi odpovedajúceho amínu (1 ekvivalent) a trietylamínu (4 ekvivalenty) v bezvodom DCM pri 0 °C. Reakčná zmes bola miešaná 30 minút. DCM bol zo zmesi oddestilovaný za zníženého tlaku. Produkt bol prečistený stĺpcovou chromatografiou na silikageli.

### 6.1.9 9-[(6-azidohehyl)amino]-N-[2-(dimetylamino)etyl]akridín-4-karboxamid (2)

MF - EAC:MeOH:TEA 95:5:1, R<sub>f</sub> = 0,19. Žltý olej, výťažok 60 %. <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, acetón-d<sub>6</sub>) δ 12,43 (s; 1H); 8,72 (s; 1H); 8,50 (d; J = 8,7; 1,6 Hz; 1H); 8,38 (d; J = 8,6 Hz; 1H); 8,04 (s; 1H); 7,71 (t; J = 7,0 Hz; 1H); 7,47 – 7,30 (m; 2H); 6,81 (bs; 1H); 3,91 (t; J = 7,2 Hz; 2H); 3,65 (q; J = 5,8 Hz; 2H); 3,22 (t; J = 6,9 Hz; 2H); 2,61 (t; J = 6,1 Hz; 2H); 2,36 (s; 6H); 1,84 (p; J = 7,4 Hz; 2H); 1,50 (p; J = 7,0 Hz; 2H); 1,45 – 1,30 (m; 4H). <sup>13</sup>C NMR (151 MHz, acetón-d<sub>6</sub>) δ 165,66; 153,42; 148,12; 147,29; 133,98; 130,64; 129,15; 128,45; 127,64; 123,73; 122,87; 121,19; 116,54; 115,63; 58,44; 51,03; 50,53; 44,83; 37,53; 30,87; 28,54; 26,28; 26,25. IČ (ATR) ν<sub>max</sub> = 3369, 2940, 2860, 2817, 2767, 2086, 1748, 1714, 1680, 1643, 1617, 1594, 1558, 1532, 1503, 1475, 1457, 1441, 1429, 1373, 1355, 1326, 1292, 1272, 1255, 1212, 1187, 1149, 1130, 1072, 1057, 1042, 941, 918, 884, 849, 780, 763, 748, 736, 681, 656,643, 632, 617 cm<sup>-1</sup>. HRMS (m/z): [M+H]<sup>+</sup> vypočítané pre C<sub>21</sub>H<sub>31</sub>N<sub>7</sub>O, 434,2663, zmerané, 434,2670.

### 6.1.10 *terc*-butyl (2-{9-[(6-azidohehyl)amino]akridín-4-karboxamido}etyl)karbamát (3-Boc)

MF - EAC:MeOH:TEA 96:2:2, R<sub>f</sub> = 0,46. Žltý olej, výťažok 63 %, <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, Chloroform-*D*) δ 12,51 (s; 1H); 8,80 (s; 1H); 8,17 (d; J = 8,7 Hz; 1H); 8,06 (d; J = 8,7 Hz; 1H); 7,97 (s; 1H); 7,67 (t; J = 7,8 Hz; 1H); 7,37 (s; 2H); 5,51 – 5,14 (m; 2H); 3,85 – 3,69 (m; 4H); 3,49 (q; J = 5,8 Hz; 2H); 3,21 (t; J = 6,8 Hz; 2H); 1,77 (p; J = 7,2 Hz; 2H); 1,55 (p; J = 7,0 Hz; 2H); 1,49 – 1,35 (m; 13H). <sup>13</sup>C NMR (151 MHz, Chloroform-*D*) δ 167,34; 156,30; 152,74; 147,89; 147,25; 134,80; 130,83; 129,63; 127,99; 126,86; 123,66; 122,49; 122,07; 116,54; 115,76; 79,32; 51,31; 51,04; 41,29; 39,63; 31,69; 28,76; 28,55; 26,50. IČ (ATR) ν<sub>max</sub> = 3370, 2932, 2860, 2098, 1678, 1639, 1620, 1557, 1524, 1459, 1435, 1391, 1364, 1351, 1270, 1252, 1166, 1147, 1129, 1093, 1064, 1046, 1022, 847, 749, 730, 716, 683, 653, 642, 635, 627, 621, 609, 605 cm<sup>-1</sup>. HRMS (m/z): [M+H]<sup>+</sup> vypočítané pre C<sub>27</sub>H<sub>35</sub>N<sub>7</sub>O<sub>3</sub>: 506,2874; zmerané: 506,2873.

### 6.1.11 bis(2-metyl-2-propanyl) {[2-9-[(6-azidohehyl)amino]akridín-4-karboxamido}etyl)amino]metylylidén}biskarbamat (4-Boc)

MF: EAC:MeOH:TEA 100:1:0,5. R<sub>f</sub> = 0,47. Žltý olej, výťažok 88 %. <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, acetón-d<sub>6</sub>) δ 12,23 (s; 1H); 8,74 (s; 1H); 8,50 (d; J = 8,7 Hz; 1H); 8,39 (d; J = 8,8 Hz; 1H); 7,95 (d; J = 8,5 Hz; 1H); 7,72 (t; J = 7,6 Hz; 1H); 7,39 (p; J = 6,1 Hz; 2H); 6,80 (s; 1H); 3,93 (t; J = 7,0 Hz; 2H); 3,57 (q; J = 6,5 Hz; 2H); 3,23 (t; J = 7,0 Hz; 2H); 1,86 (p; J = 7,4 Hz; 2H); 1,72 (p; J = 7,0 Hz; 2H); 1,61 – 1,47 (m; 4H); 1,47 – 1,31 (m; 4H); 1,00 (t; J = 7,4 Hz; 3H). <sup>13</sup>C NMR (151 MHz, acetón-d<sub>6</sub>) δ 165,5; 153,63; 148,16; 147,49; 134,24; 130,87; 128,93; 128,56; 127,52; 123,75; 122,93; 121,27; 116,44; 115,52;

51,01; 50,51; 38,93; 31,83; 30,81; 28,52; 26,23; 20,40; 13,33. IČ (ATR)  $\nu_{\max}$  = 3358, 2932, 2861, 2095, 1639, 1617, 1593, 1560, 1532, 1503, 1476, 1435, 1423, 1371, 1357, 1328, 1273, 1254, 1211, 1187, 1149, 1127, 1094, 1027, 956, 918, 848, 822, 763, 746, 736, 680, 657, 630, 617  $\text{cm}^{-1}$ . HRMS (m/z):  $[\text{M}+\text{H}]^+$  vypočítané pre  $\text{C}_{33}\text{H}_{45}\text{N}_9\text{O}_5$ : 648,3616; zmerané: 648,3622.

#### 6.1.12 N-(2-aminoetyl)-9-[(6-azidohexyl)amino]akridín-4-karboxamid dihydrochlorid (3)

Látka **3-Boc** (202 mg, 0,4 mmol) bola rozpustená v DCM (3 ml) a do roztoku bola pridaná TFA (2,98 g, 26 mmol) za stáleho miešania. Reakčná zmes bola miešaná 1 h pri laboratórnej teplote. Prebytočné rozpúšťadlá boli následne z reakcie oddestilované za zníženého tlaku. Produkt bol prečistený stĺpcovou chromatografiou na silikageli ( $\text{CHCl}_3$ :MeOH 4:1),  $R_f$  = 0,21. Frakcie s čistým produktom boli zlúčené a odparené za zníženého tlaku. Produkt bol rozpustený v  $\text{CHCl}_3$  (25 ml) a vytrepáný 1M NaOH (3 × 25 ml). Organická vrstva bola oddelená, vysušená bezvodým  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  a za zníženého tlaku oddestilovaná. Produkt bol rozpustený v DEE (15 ml) a prevedený na hydrochlorid pomocou plynného HCl pripraveného z NaCl pridávaním  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Bolo získaných 80 mg tmavožltej olejovitej látky. Výťažok 42 %.

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz, MeOH- $D_4$ )  $\delta$  8,69 (bs; 1H); 8,55 (d;  $J$  = 7,4 Hz; 1H); 8,52 – 8,40 (bs; 1H); 7,98 (t;  $J$  = 7,7 Hz; 1H); 7,84 (d;  $J$  = 8,4 Hz; 1H); 7,67 – 7,52 (m; 2H); 4,14 (t;  $J$  = 7,5 Hz; 2H); 3,83 (t;  $J$  = 5,8 Hz; 2H); 3,33 – 3,25 (m; 2H); 2,02 (p;  $J$  = 7,1 Hz; 2H); 1,61 (p;  $J$  = 6,7 Hz; 2H); 1,57 – 1,42 (m; 4H).  $^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz, MeOH- $D_4$ )  $\delta$  170,39; 159,92; 136,95; 136,23; 128,76; 126,08; 120,43; 119,68; 114,99; 52,29; 50,67; 40,92; 38,74; 30,33; 29,69; 27,34; 27,32. IR (ATR)  $\nu_{\max}$  = 2930, 2861, 2095, 1643, 1621, 1590, 1566, 1535, 1478, 1443, 1351, 1310, 1273, 1251, 1178, 1132, 1073, 1037, 898, 842, 823, 755,659, 649,640, 633, 626, 614, 602  $\text{cm}^{-1}$ . HRMS (m/z):  $[\text{M}+\text{H}]^+$  vypočítané pre  $\text{C}_{22}\text{H}_{27}\text{N}_7\text{O}$ : 406,2350; zmerané: 406,2354.

#### 6.1.13 9-[(6-azidohexyl)amino]-N-(2-guanidinoetyl)akridín-4-karboxamid dihydrochlorid (4)

Látka **4-Boc** (150 mg, 0,23 mmol) bola rozpustená v DCM (3 ml) a do roztoku bola pridaná TFA (2,98 g, 26 mmol) za stáleho miešania. Reakčná zmes bola miešaná 2 h pri laboratórnej teplote. Prebytočné rozpúšťadlá boli následne z reakcie oddestilované za zníženého tlaku. Produkt bol prečistený stĺpcovou chromatografiou na silikageli ( $\text{CHCl}_3$ :MeOH 4:1),  $R_f$  = 0,20. Frakcie s čistým produktom boli zlúčené a odparené za zníženého tlaku. Produkt bol rozpustený v  $\text{CHCl}_3$  (25 ml) a vytrepáný 1M NaOH (3 × 25 ml). Organická vrstva bola oddelená, vysušená bezvodým  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  a odparená. Produkt bol rozpustený v DEE (15 ml) a prevedený na hydrochlorid pomocou plynného HCl pripraveného z NaCl pridávaním  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Bolo získaných 62 mg tmavožltej olejovitej látky. Výťažok 48 %.

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz, MeOH- $D_4$ )  $\delta$  8,46 – 8,27 (m; 2H); 8,19 (bs; 1H); 7,87 – 7,55 (m; 2H); 7,36 (bs; 2H); 3,84 (bs; 2H); 3,66 (t;  $J$  = 6,4 Hz; 2H); 3,53 (t;  $J$  = 6,4 Hz; 2H); 3,21 (t;  $J$  = 6,8 Hz; 2H); 1,83 (bs; 2H); 1,53 (p;  $J$  = 6,8 Hz; 2H); 1,37 (bs; 4H).  $^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz, MeOH- $D_4$ )  $\delta$  168,37, 157,72, 134,41, 129,02, 123,61, 121,51, 51,02, 49,43, 48,58, 40,75, 38,62, 29,58, 28,43, 26,07. IR (ATR)  $\nu_{\max}$  = 3129, 2928, 2857, 2095, 1668, 1642, 1620, 1563, 1462, 1352, 1308, 1273, 1252, 1178, 1129, 900, 858, 757,728, 677, 659, 631, 621, 609. HRMS (m/z):  $[\text{M}+\text{H}]^+$  vypočítané pre  $\text{C}_{23}\text{H}_{30}\text{N}_9\text{O}$ : 448,2568; zmerané: 448,2572.

#### 6.1.14 9-[(6-azidohexyl)amino]-N-[3-(dimetylamino)propyl]akridín-4-karboxamid (5)

MF – EAC:MeOH:TEA 95:5:1.  $R_f$  = 0,1.  $^1\text{H}$  NMR (600 MHz, Acetón- $D_6$ )  $\delta$  12,32 (s; 1H); 8,74 (s; 1H); 8,48 (d;  $J$  = 8,6 Hz; 1H); 8,36 (d;  $J$  = 8,7 Hz; 1H); 7,95 (bs; 1H); 7,75 – 7,61 (m; 1H); 7,46 – 7,25 (m; 2H); 6,85 (bs; 1H); 3,88 (t;  $J$  = 7,2 Hz; 2H); 3,61 (q;  $J$  = 6,6 Hz; 2H); 3,19 (t;  $J$  = 6,9 Hz; 2H); 2,43 (t;  $J$  = 7,1 Hz; 2H); 2,18 (s; 6H); 1,87 (p;  $J$  = 6,9 Hz; 2H); 1,81 (p;  $J$  = 7,2 Hz; 2H); 1,47 (p;  $J$  = 7,0



Hz; 2H); 1,41 – 1,27 (m; 4H).  $^{13}\text{C}$  NMR (151 MHz; Acetón- $D_6$ )  $\delta$  165,84; 153,52; 148,12; 147,43; 134,19; 130,77; 128,98; 128,38; 127,72; 123,85; 122,84; 121,14; 116,46; 115,54; 57,53; 51,03; 50,53; 45,05; 37,57; 30,90; 28,56; 27,84; 26,31; 26,27. IČ (ATR)  $\nu_{\text{max}}$  3228, 2938, 2686, 2096, 1621, 158, 1567, 1537, 1476, 1443, 1349, 1311, 1273, 1248, 1177, 1133, 1091, 1035, 1004, 979, 753, 659, 643, 633, 609  $\text{cm}^{-1}$ . HRMS (m/z):  $[\text{M}+\text{H}]^+$  vypočítané pre  $\text{C}_{25}\text{H}_{33}\text{N}_7\text{O}$ : 448,2819; zmerané: 448,2828.

#### 6.1.15 9-[(6-azidohehyl)amino]-N-[2-(pyrrolidin-1-yl)etyl]akridín-4-karboxamid (6)

MF – EAC:MeOH:TEA 95:5:1  $R_f = 0,08$ ,  $^1\text{H}$  NMR (600 MHz, Acetón- $D_6$ )  $\delta$  12,47 (s; 1H); 8,74 (d;  $J = 7,0$  Hz; 1H); 8,50 (d;  $J = 8,8$  Hz; 1H); 8,38 (d;  $J = 8,9$  Hz; 1H); 8,09 (d;  $J = 8,6$  Hz; 1H); 7,71 (t;  $J = 7,6$  Hz; 1H); 7,54 (s; 0H); 7,46 – 7,30 (m; 2H); 6,76 (s; 1H); 3,97 – 3,88 (m; 2H); 3,66 (q;  $J = 5,7$  Hz; 2H); 3,23 (t;  $J = 6,9$  Hz; 2H); 2,77 (t;  $J = 6,0$  Hz; 2H); 2,69 – 2,59 (m; 4H); 1,90 – 1,78 (m; 6H); 1,52 (p;  $J = 7,0$  Hz; 2H); 1,47 – 1,30 (m; 4H).  $^{13}\text{C}$  NMR (151 MHz; Acetón- $D_6$ )  $\delta$  165,50; 153,43; 148,28; 147,41; 134,10; 130,41; 129,31; 128,72; 127,45; 123,63; 122,95; 121,31; 116,48; 115,54; 55,27; 54,13; 53,86; 51,02; 50,49; 38,72; 30,83; 29,52; 28,53; 26,25; 23,53. IČ (ATR)  $\nu_{\text{max}}$  3391, 3230, 2938, 2614, 2095, 1644, 1622, 1590, 1568, 1537, 1475, 1445, 1401, 1350, 1311, 1272, 1250, 1193, 1178, 1120, 1080, 1015, 899, 821, 755, 659, 641, 633, 625, 617, 610  $\text{cm}^{-1}$ . HRMS (m/z):  $[\text{M}+\text{H}]^+$  vypočítané pre  $\text{C}_{26}\text{H}_{33}\text{N}_7\text{O}$ : 460,2819; zmerané: 460,2823.

#### 6.1.16 9-[(6-azidohehyl)amino]-N-[2-(dietylamo)etyl]akridín-4-karboxamid (7)

MF – EAC:MeOH:TEA 95:5:1  $R_f = 0,12$ .  $^1\text{H}$  NMR (600 MHz, Acetón- $D_6$ )  $\delta$  12,36 – 12,29 (m; 1H); 8,79 – 8,71 (m; 1H); 8,43 – 8,38 (m; 1H); 8,30 – 8,25 (m; 1H); 8,12 – 8,07 (m; 1H); 7,75 – 7,66 (m; 1H); 7,43 – 7,33 (m; 2H); 7,25 – 7,17 (m; 1H); 3,99 – 3,88 (m; 2H); 3,63 (q;  $J = 6,0$  Hz; 2H); 2,80 (t;  $J = 6,0$  Hz; 2H); 2,72 (t;  $J = 6,2$  Hz; 2H); 2,67 (q;  $J = 7,0$  Hz; 1H); 2,62 (q;  $J = 7,0$  Hz; 1H); 1,10 – 0,98 (m; 12H).  $^{13}\text{C}$  NMR (151 MHz; Acetón- $D_6$ )  $\delta$  165,51; 153,11; 148,22; 147,46; 134,15; 130,47; 129,39; 128,74; 127,19; 123,36; 122,81; 121,14; 116,09; 115,17; 52,38; 52,31; 51,02; 50,51; 46,97; 46,55; 46,11; 37,81; 30,85; 26,26; 11,58; 11,50. IČ (ATR)  $\nu_{\text{max}}$  3391, 3233, 2980, 2649, 2486, 2097, 1622, 1588, 1569, 1537, 1474, 1397, 1352, 1313, 1273, 1247, 1180, 1141, 1015, 968, 755, 660, 651, 633, 606  $\text{cm}^{-1}$ . HRMS (m/z):  $[\text{M}+\text{H}]^+$  vypočítané pre  $\text{C}_{26}\text{H}_{35}\text{N}_7\text{O}$ : 462,2976; zmerané: 462,2977.

#### 6.1.17 9-[(6-azidohehyl)amino]-N-[2-(piperidín-1-yl)etyl]akridín-4-karboxamid (8)

MF – EAC:MeOH:TEA 95:5:1  $R_f = 0,2$ .  $^1\text{H}$  NMR (600 MHz, Acetón- $D_6$ )  $\delta$  12,30 (s; 1H); 8,74 (d;  $J = 7,4$  Hz; 1H); 8,51 (d;  $J = 8,8$  Hz; 1H); 8,39 (d;  $J = 8,8$  Hz; 1H); 8,19 (d;  $J = 8,7$  Hz; 1H); 7,72 (t;  $J = 7,6$  Hz; 1H); 7,47 – 7,32 (m; 2H); 6,76 (s; 1H); 3,94 (q;  $J = 6,9$  Hz; 2H); 3,66 (q;  $J = 5,8$  Hz; 2H); 3,24 (t;  $J = 6,9$  Hz; 2H); 2,62 (t;  $J = 6,2$  Hz; 2H); 2,51 (bs; 4H); 1,86 (p;  $J = 7,3$  Hz; 2H); 1,64 (p;  $J = 5,7$  Hz; 4H); 1,53 (p;  $J = 7,0$  Hz; 2H); 1,50 – 1,41 (m; 4H); 1,41 – 1,32 (m; 2H).  $^{13}\text{C}$  NMR (151 MHz; Acetón- $D_6$ )  $\delta$  165,50; 153,46; 148,24; 147,44; 134,16; 130,43; 129,56; 128,68; 127,47; 123,64; 122,97; 121,31; 116,47; 115,54; 58,42; 54,61; 51,02; 50,50; 50,38; 36,96; 36,85; 30,80; 28,52; 26,24; 26,03; 24,53. IČ (ATR)  $\nu_{\text{max}}$  3226,2941, 2862, 2648, 2541, 2095, 1622, 1590, 1568, 1537, 1474, 1443, 1350, 1310, 1272, 1179, 1134, 1099, 1037, 1007, 949, 897, 856, 755, 659, 632, 624, 609  $\text{cm}^{-1}$ . HRMS (m/z):  $[\text{M}+\text{H}]^+$  vypočítané pre  $\text{C}_{27}\text{H}_{33}\text{N}_7\text{O}$ : 474,2976; zmerané: 474,2977.

#### 6.1.18 9-[(6-azidohehyl)amino]-N-butylakridín-4-karboxamid (9)

MF: EAC:MeOH:TEA 96:2:2.  $R_f = 0,54$ . Žltý olej, 59 %.  $^1\text{H}$  NMR (600 MHz, acetón- $D_6$ )  $\delta$  12,23 (s; 1H); 8,74 (s; 1H); 8,50 (d;  $J = 8,7$  Hz; 1H); 8,39 (d;  $J = 8,8$  Hz; 1H); 7,95 (d;  $J = 8,5$  Hz; 1H); 7,72 (t;  $J = 7,6$  Hz; 1H); 7,39 (p;  $J = 6,1$  Hz; 2H); 6,80 (s; 1H); 3,93 (t;  $J = 7,0$  Hz; 2H); 3,57 (q;  $J = 6,5$  Hz; 2H); 3,23 (t;  $J = 7,0$  Hz; 2H); 1,86 (p;  $J = 7,4$  Hz; 2H); 1,72 (p;  $J = 7,0$  Hz; 2H); 1,61 – 1,47 (m; 4H); 1,47 – 1,31 (m; 4H); 1,00 (t;  $J = 7,4$  Hz; 3H).  $^{13}\text{C}$  NMR (151 MHz; Acetón- $D_6$ )  $\delta$  165,5; 153,63; 148,16; 147,49; 134,24; 130,87; 128,93; 128,56; 127,52; 123,75; 122,93; 121,27; 116,44; 115,52; 51,01;

50,51; 38,93; 31,83; 30,81; 28,52; 26,23; 20,40; 13,33. IČ (ATR)  $\nu_{\max}$  = 3358, 2932, 2861, 2095, 1639, 1617, 1593, 1560, 1532, 1503, 1476, 1435, 1423, 1371, 1357, 1328, 1273, 1254, 1211, 1187, 1149, 1127, 1094, 1027, 956, 918, 848, 822, 763, 746, 736, 680, 657, 630, 617  $\text{cm}^{-1}$ . HRMS (m/z):  $[\text{M}+\text{H}]^+$  vypočítané pre  $\text{C}_{24}\text{H}_{30}\text{N}_6\text{O}$ : 419,2562; zmerané: 419,2554.

#### 6.1.19 9-[(6-azidohexyl)amino]-N-[2-(dimetylamino)etyl]-N-metylakridín-4-karboxamid (10)

MF – EAC:MeOH:TEA 95:5:1 Rf = 0,1.  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz, MeOH- $D_4$ )  $\delta$  8,36 (t;  $J$  = 10,0 Hz; 1H); 8,28 (t;  $J$  = 9,0 Hz; 1H); 7,99 (d;  $J$  = 8,9 Hz; 1H); 7,94 (d;  $J$  = 8,8 Hz; 1H); 7,69 – 7,60 (m; 2H); 7,36 (p;  $J$  = 8,3 Hz; 2H); 3,87 (bs; 1H); 3,83 (q;  $J$  = 6,8 Hz; 2H); 3,27 (s; 1,5H); 3,23 (t;  $J$  = 7,7 Hz; 1H); 3,22 – 3,14 (m; 2H); 2,85 – 2,77 (m; 2,5H); 2,54 (t;  $J$  = 7,7 Hz; 1H); 2,42 (s; 3H); 1,84 (s; 3H); 1,76 (p;  $J$  = 7,3 Hz; 2H); 1,54 – 1,44 (m; 2H); 1,37 – 1,29 (m; 4H).  $^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz; MeOH- $D_4$ )  $\delta$  172,24; 152,76; 152,63; 130,19; 130,01; 128,14; 127,83; 125,00; 123,45; 122,55; 121,17; 121,07; 116,25; 56,50; 55,48; 50,88; 49,89; 44,88; 44,41; 43,92; 36,21; 32,12; 30,59; 30,54; 28,34; 26,06; 26,04. IČ (ATR)  $\nu_{\max}$  2936, 2095, 1629, 1592, 1573, 1538, 1446, 1404, 1351, 1293, 1269, 1168, 1149, 1104, 1088, 1041, 976, 898, 857, 817, 759, 687, 656, 647, 637, 605  $\text{cm}^{-1}$ . HRMS (m/z):  $[\text{M}+\text{H}]^+$  vypočítané pre  $\text{C}_{25}\text{H}_{33}\text{N}_7\text{O}$ : 448,2819; zmerané: 448,2824.

#### 6.1.20 {9-[(6-azidohexyl)amino]akridín-4-yl}{4-metylpiperazín-1-yl}metanón (11)

MF – EAC:MeOH:TEA 95:5:1 Rf = 0,1.  $^1\text{H}$  NMR (600 MHz, Acetón- $D_6$ )  $\delta$  8,40 – 8,31 (m; 2H); 7,93 – 7,89 (m; 1H); 7,67 – 7,61 (m; 1H); 7,56 – 7,52 (m; 1H); 7,37 – 7,31 (m; 2H); 6,47 – 6,38 (m; 1H); 3,95 – 3,85 (m; 3H); 3,75 (m; 1H); 3,25 (t;  $J$  = 6,9 Hz; 2H); 3,16 – 3,10 (m; 1H); 3,07 – 3,01 (m; 1H); 2,59 – 2,53 (m; 1H); 2,43 – 2,33 (m; 2H); 2,20 (s; 3H); 2,08 – 2,03 (m; 1H); 1,84 (p;  $J$  = 7,3 Hz; 2H); 1,53 (p;  $J$  = 7,9 Hz; 2H); 1,46 – 1,40 (m; 2H); 1,40 – 1,33 (m; 2H).  $^{13}\text{C}$  NMR (151 MHz; Acetón- $D_6$ )  $\delta$  168,57; 151,88; 149,59; 146,46; 137,61; 130,04; 129,74; 127,47; 124,23; 123,60; 122,83; 121,87; 116,61; 116,23; 55,09; 54,84; 51,03; 50,41; 50,30; 46,78; 45,65; 41,29; 30,96; 28,54; 26,28. IČ (ATR)  $\nu_{\max}$  2936,2602, 2095, 1629, 1592, 1573, 1538, 1445, 1351, 1269, 1198, 1165, 1131, 1090, 1023, 974, 902, 860, 816, 758, 681, 656, 647, 628, 613  $\text{cm}^{-1}$ . HRMS (m/z):  $[\text{M}+\text{H}]^+$  vypočítané pre  $\text{C}_{25}\text{H}_{31}\text{N}_7\text{O}$ : 446,2663; zmerané: 446,2671.

#### 6.1.21 9-[(6-azidohexyl)amino]-N,N-bis[2-(dietylamino)etyl]akridín-4-karboxamid (12)

MF - EAC:MeOH:TEA 95:5:1. Rf = 0,07.  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz, MeOH- $D_4$ )  $\delta$  8,39 (d;  $J$  = 8,7 Hz; 1H); 8,31 (d;  $J$  = 7,7 Hz; 1H); 7,96 (d;  $J$  = 8,7 Hz; 1H); 7,71 – 7,64 (m; 1H); 7,64 – 7,60 (m; 1H); 7,43 – 7,35 (m; 2H); 3,86 (t;  $J$  = 7,2 Hz; 3H); 3,81 (bs; 2H); 3,27 – 3,18 (m; 4H); 3,08 – 2,92 (bs; 2H); 2,74 (q;  $J$  = 7,2 Hz; 4H); 2,78 – 2,70 (bs; 2H); 2,11 (q;  $J$  = 7,2 Hz; 4H); 1,78 (p;  $J$  = 7,3 Hz; 2H); 1,52 (p;  $J$  = 6,9 Hz; 2H); 1,43 – 1,30 (m; 4H); 1,19 (t;  $J$  = 7,2 Hz; 6H); 0,61 (t;  $J$  = 7,2 Hz; 6H).  $^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz, MeOH- $D_4$ )  $\delta$  172,40; 152,54; 134,06; 132,15; 130,02; 128,84; 127,80; 127,66; 125,97; 124,92; 123,33; 122,62; 121,96; 121,12; 120,57; 117,31; 116,38; 50,89; 50,53; 49,90; 49,55; 47,38; 47,10; 46,71; 43,49; 30,56; 28,36; 26,09; 26,06; 10,62; 9,94. IR (ATR)  $\nu_{\max}$  3411, 2942, 2650, 2482, 2096, 1629, 1593, 1574, 1537, 1464, 1445, 1397, 1352, 1327, 1268, 1197, 1169, 1125, 1070, 1038, 969, 895, 817, 763, 678, 660, 652, 641, 606  $\text{cm}^{-1}$ . HRMS (m/z):  $[\text{M}+\text{H}]^+$  vypočítané pre  $\text{C}_{32}\text{H}_{48}\text{N}_8\text{O}$ : 561,4024; zmerané: 561,4032.

#### 6.1.22 N-(6-azidohexyl)-9-oxo-9,10-dihydroakridín-4-karboxamid (18)

9-oxo-9,10-dihydroakridín-4-karboxylová kyselina (1 g, 4,18 mmol), HBTU (3,17 g, 8,36 mmol) a TEA (850 mg, 8,39 mmol) boli pridané do bezvodého THF (25 ml) a reakčná zmes bola ponechaná v ultrazvukovom kúpeli 15 minút. Do zmesi bol pridaný 6-azidohexán-1-amín (800 mg, 5,63 mmol) a zmes bola miešaná 2 h v argónovej atmosfére pri laboratórnej teplote. Následne bol zo zmesi za zníženého tlaku oddestilovaný THF. Rezíduum bolo rozpustené v dietyléteri (DEE, 50

ml) a vytrepané vodou (3 × 50 ml). DEE vrstva bola oddelená a vysušená bezvodým Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Produkt bol prečistený stĺpcovou chromatografiou na silikageli (HEX:EAC:MeOH 7:3:0,5). Bolo získaných 1,03 g žltej olejovitej látky. Výťažok 68 %.

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, Chloroform-*d*) δ 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); 1,69 (p; 2H); 1,56 (p; *J* = 6,9 Hz; 2H); 1,47 – 1,33 (m; 4H). <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, Chloroform-*d*) δ 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. IČ (ATR)  $\nu_{\max}$  3333, 2936, 2859, 2098, 1644, 1616, 1597, 1582, 1572, 1544, 1523, 1479, 1434, 1402, 1310, 1272, 1249, 1184, 1160, 963, 858, 833, 793, 754 681 cm<sup>-1</sup>. HRMS (*m/z*): [M+H]<sup>+</sup> vypočítané pre C<sub>20</sub>H<sub>22</sub>N<sub>5</sub>O<sub>2</sub>: 364,1768; zmerané: 364,1777.

### 6.1.23 metyl 9-[[2-(dimetylamino)etyl]amino]akridín-4-karboxylát (19)

Látka **15** (118 mg, 0,466 mmol) bola rozpustená v SOCl<sub>2</sub> (1 ml) a zmes bola miešaná 1 h pri teplote 80 °C. Zo zmesi bol následne za zníženého tlaku oddestilovaný SOCl<sub>2</sub>. K rezíduu bol pridaný fenol (10 ekvivalentov) a zmes bola miešaná 15 minút pri teplote 110 °C. Po ochladení zmesi na 55 °C bol do zmesi pridaný *N,N*-dimetyletán-1,2-diamín (127 μl) a reakčná zmes bola miešaná 24 h pri teplote 55 °C. Následne bola reakčná zmes rozpustená v chloroforme a vytrepaná 2M NaOH (3 × 30 ml). Organická vrstva bola oddelená, vysušená Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a odparená za zníženého tlaku. Produkt bol prečistený stĺpcovou chromatografiou na silikageli (1. HEX:EAC 1:1, 2. DCM:MeOH 9:1). Bolo získaných 63 mg žltoranžovej olejovitej látky. Výťažok 41 %.

<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, MeOH-*D*<sub>4</sub>) δ 8,21 (s; 1H); 8,01 (dd; *J* = 7,8; 1,5 Hz; 1H); 7,90 (s; 1H); 7,39 (ddd; *J* = 8,2; 6,9; 1,5 Hz; 1H); 7,15 – 7,10 (m; 1H); 7,06 (t; *J* = 7,6 Hz; 1H); 6,96 (t; *J* = 7,8 Hz; 1H); 3,94 (t; *J* = 7,0 Hz; 2H); 3,89 (s; 3H); 2,75 (t; *J* = 6,9 Hz; 2H); 2,30 (s; 6H). <sup>13</sup>C NMR (151 MHz, MeOH-*D*<sub>4</sub>) δ 168,29; 153,99; 136,61 132,86; 130,89; 128,56; 125,92; 120,67; 116,89; 61,17; 51,41; 50,92; 44,55. IČ (ATR)  $\nu_{\max}$  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 cm<sup>-1</sup>. HRMS (*m/z*): [M+H]<sup>+</sup> vypočítané pre C<sub>19</sub>H<sub>21</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>: 324,1707; zmerané: 324,1716.

### 6.1.24 9-[[2-(dimetylamino)etyl]amino]akridín-4-karboxylát sodný (20)

Látka **19** (214 mg, 0,66 mmol) bola rozpustená v THF (4 ml). Do reakčnej zmesi bol pridávaný nasýtený roztok hydroxidu sodného v zmesi MeOH/H<sub>2</sub>O 5:1 (0,4 ml) do sýteho oranžovo-červeného sfarbenia roztoku. Zmes bola miešaná 5 min pri laboratórnej teplote. Prebytočný THF bol za zníženého tlaku z reakčnej zmesi oddestilovaný. Surový produkt bol prečistený stĺpcovou chromatografiou na silikageli (CHCl<sub>3</sub>:MeOH, 4:1) R<sub>f</sub> = 0,18. Bolo získaných 182 mg oranžového oleja. Výťažok 89 %.

<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, MeOH-*D*<sub>4</sub>) δ 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, MeOH-*D*<sub>4</sub>) δ 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. IČ (ATR)  $\nu_{\max}$  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 cm<sup>-1</sup>. HRMS (*m/z*): [M+H]<sup>+</sup> vypočítané pre C<sub>18</sub>H<sub>18</sub>N<sub>3</sub>NaO<sub>2</sub>: 332,1369; zmerané: 332,1371.

#### 6.1.25 N-(6-azidohexyl)-9-[[2-(dimethylamino)etyl]amino]akridín-4-karboxamid (21)

Látka **20** (147 mg, 0,48 mmol) bola rozpustená v bezvodom THF a do zmesi bol pridaný HBTU (90,1 mg, 0,24 mmol) a TEA (70  $\mu$ l). Zmes bola ponechaná 15 minút v ultrazvukovom kúpeli. Následne bol do reakčnej zmesi pridaný 6-azidohexán-1-amín (68 mg, 0,48 mmol) a zmes bola miešaná 24 h pri laboratórnej teplote. Prebytočný THF bol zo zmesi oddestilovaný za zníženého tlaku. Rezíduum bolo rozpustené v dietyléri (20 ml) a vytrepané vodou (3  $\times$  20 ml). Organická vrstva bola vysušená bezvodým Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a organické rozpúšťadlo bolo oddestilované za zníženého tlaku. Produkt bol prečistený stĺpcovou chromatografiou na silikageli (EAC:MeOH:TEA, 9:0,5:0,5)  $R_f$  = 0,28. Bola získaná žltá olejovitá látka (67 mg). Výťažok 32 %.

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, Chloroform-*d*)  $\delta$  12,46 (s; 1H); 8,89 (d;  $J$  = 7,4 Hz; 1H); 8,30 (dd;  $J$  = 8,7; 1,5 Hz; 1H); 8,19 (dt;  $J$  = 8,7; 0,8 Hz; 1H); 7,96 (d;  $J$  = 8,6 Hz; 1H); 7,76 – 7,69 (m; 1H); 7,48 – 7,37 (m; 2H); 6,88 (s; 1H); 3,92 (t;  $J$  = 5,4 Hz; 2H); 3,68 (q;  $J$  = 6,9; 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). <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, Chloroform-*d*)  $\delta$  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. IČ (ATR)  $\nu_{\max}$  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  $\text{cm}^{-1}$ . HRMS ( $m/z$ ): [M+H]<sup>+</sup> vypočítané pre C<sub>24</sub>H<sub>31</sub>N<sub>7</sub>O: 434,2663; zmerané: 434,2668.

#### 6.1.26 metyl 9-[[2-(dietylamo)etyl]amino]akridín-4-karboxylát (22)

Látka **15** (115 mg, 0,454 mmol) bola rozpustená v SOCl<sub>2</sub> (1 ml) a zmes bola miešaná 1 h pri teplote 80 °C. Zo zmesi bol následne za zníženého tlaku oddestilovaný tionylchlorid. K rezíduu bol pridaný fenol (10 ekvivalentov) a zmes bola miešaná 10 minút pri teplote 110 °C. Po ochladení zmesi na 55 °C bol do zmesi pridaný *N,N*-dietyletán-1,2-diamín (58 mg, 0,5 mmol) a reakčná zmes bola miešaná 24 h pri teplote 55 °C. Následne bola reakčná zmes rozpustená v chloroforme a vytrepaná 2M hydroxidom sodným (3  $\times$  30 ml). Organická vrstva bola oddelená, vysušená síranom sodným a odparená za zníženého tlaku. Produkt bol prečistený stĺpcovou chromatografiou na silikageli (1. HEX:EAC 1:1, 2. DCM:MeOH 9:1). Bolo získaných 111 mg žltlooranžovej olejovitej látky. Výťažok 72 %.

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, MeOH-*D*<sub>4</sub>)  $\delta$  8,23 (d;  $J$  = 8,0 Hz; 1H); 8,10 (d; 1H); 7,99 (d;  $J$  = 8,2 Hz; 1H); 7,49 (ddd;  $J$  = 8,4; 7,1; 1,4 Hz; 1H); 7,23 (d; 1H); 7,15 (t; 1H); 7,06 (t;  $J$  = 7,9 Hz; 1H); 4,02 (t;  $J$  = 6,7 Hz; 2H); 3,95 (s; 2H); 3,02 (t;  $J$  = 6,8 Hz; 2H); 2,80 (q;  $J$  = 7,2 Hz; 4H); 1,14 (t;  $J$  = 7,2 Hz; 6H). <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, MeOH-*D*<sub>4</sub>)  $\delta$  168,10; 154,34; 133,39; 131,36; 121,12; 119,10; 117,14; 53,91; 51,48; 49,54; 47,05; 9,69. MS (ESI)  $m/z$ : 352,4.

#### 6.1.27 9-[[2-(dietylamo)etyl]amino]akridín-4-karboxylát sodný (23)

Látka **22** (111 mg, 0,33 mmol) bola rozpustená v THF (2 ml). Do reakčnej zmesi bol pridávaný nasýtený roztok hydroxidu sodného v zmesi MeOH/H<sub>2</sub>O 5:1 do sýteho oranžovo-červeného sfarbenia roztoku. Zmes bola miešaná 5 min pri laboratórnej teplote. Prebytočný THF bol za zníženého tlaku z reakčnej zmesi oddestilovaný. Surový produkt bol bez ďalšieho čistenia použitý v ďalšej reakcii.

#### 6.1.28 N-(6-azidohexyl)-9-[[2-(dietylamo)etyl]amino]akridín-4-karboxamid (24)

Látka **23** (bez čistenia) bola rozpustená v THF (2 ml) a do zmesi bol pridaný HBTU (250 mg, 0,658 mmol) a TEA (67 mg, 0,658 mmol). Zmes bola ponechaná v ultrazvukovom kúpeli 15 minút. Do zmesi bol za pridaný 6-azidohexán-1-amín (52 mg, 0,37 mmol) a zmes bola miešaná 2 h pri laboratórnej teplote. Zo zmesi boli následne za zníženého tlaku oddestilované rozpúšťadlá

a produkt bol prečistený stĺpcovou chromatografiou na silikageli (EAC:MeOH:TEA 99:1:1). Bolo získaných 22 mg žltej olejovitej látky. Výťažok 13 %.

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz, Chloroform- $D$ )  $\delta$  12,51 (s; 1H); 8,87 (dd;  $J = 7,1; 1,4$  Hz; 1H); 8,29 (dd;  $J = 8,7; 1,5$  Hz; 1H); 8,18 (dt;  $J = 8,8; 0,9$  Hz; 1H); 7,93 (dd;  $J = 8,7; 1,3$  Hz; 1H); 7,71 (ddd;  $J = 8,3; 6,6; 1,3$  Hz; 1H); 7,45 – 7,34 (m; 2H); 7,14 (s; 1H); 3,91 (t;  $J = 5,8$  Hz; 2H); 3,68 (td;  $J = 6,9; 5,3$  Hz; 2H); 3,28 (t;  $J = 7,0$  Hz; 2H); 2,82 – 2,76 (m; 2H); 2,69 (q;  $J = 7,1$  Hz; 4H); 1,83 (p;  $J = 7,0$  Hz; 2H); 1,72 – 1,57 (m; 4H); 1,57 – 1,47 (m; 2H); 1,13 (t;  $J = 7,1$  Hz; 6H).  $^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz, Chloroform- $D$ )  $\delta$  166,54; 152,92; 147,87; 147,44; 134,59; 130,57; 128,98; 127,91; 126,81; 123,03; 122,80; 121,51; 116,13; 115,26; 77,20; 52,19; 51,40; 46,37; 46,07; 39,55; 29,66; 29,50; 28,81; 27,01; 26,54; 11,87. HRMS (m/z):  $[\text{M}+\text{H}]^+$  vypočítané pre  $\text{C}_{26}\text{H}_{35}\text{N}_7\text{O}$ : 462,2976; zmerané: 462,2980. Vzhľadom na výsledky testov na schopnosť stabilizácie duplexu látka nebola ďalej charakterizovaná.

#### 6.1.29 2-[(2-karboxyfenyl)amino]jizoftalová kyselina (25)

Do zmesi 2-brómizoftalovej kyseliny (1,721g, 7,02 mmol), antranilovej kyseliny (0,964 g, 7,03 mmol), bezvodého  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (3,15 g, 22,80 mmol), katalytického množstva práškovej medi a katalytického množstva  $\text{CuI}$  bol pridaný izoamylalkohol (10 ml). Reakčná zmes bola miešaná a zahrievaná 1 h pri 140 °C. Následne bol zo zmesi oddestilovaný izoamylalkohol za zníženého tlaku. Rezíduum bolo rozpustené v 1M NaOH a vzniknutý roztok bol prefiltrovaný. Zo zmesi bola za zníženého tlaku odparená voda. K rezíduu bola pridaná koncentrovaná kyselina chlorovodíková a vzniknutá zrazenina bola odsatá a premytá vodou. Produkt bol prečistený stĺpcovou chromatografiou na silikageli (EAC:HEX:AA 6:3:1). Bolo získaných 1,702 g bledožltej kryštalickej látky. Výťažok 80 %.

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{DMSO}-D_6$ )  $\delta$  12,39 (s; 3H); 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).  $^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz,  $\text{DMSO}-D_6$ )  $\delta$  168,98; 168,10; 146,96; 140,75; 134,45; 133,53; 131,70; 125,70; 121,90; 118,79; 115,70; 113,83.

#### 6.1.30 9-oxo-9,10-dihydroakridín-4,5-dikarboxylová kyselina (26)

Látka **25** (1,01 g, 3,36 mmol) bola rozpustená v koncentrovanej kyseline sírovej (6 ml). Zmes bola miešaná 1 h pri 105 °C. Zmes ochladená na laboratórnu teplotu bola po malých častiach a za miešania pridávaná do vychladenej destilovanej vody (150 ml). Vzniknutá zrazenina bola odsatá a premytá vodou (5×50 ml). Produkt bol vysušený v exsíkátore. Výťažok 95 %.

T.t. >390 °C.  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{DMSO}-D_6$ )  $\delta$  13,89 (s; 1H); 8,46 (ddd;  $J = 21,2; 7,7; 1,8$  Hz; 4H); 7,37 (t;  $J = 7,7$  Hz; 2H),  $^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz,  $\text{DMSO}-D_6$ )  $\delta$  176,42; 168,12; 140,75; 137,50; 132,22; 121,85; 121,18; 116,50. IČ (ATR)  $\nu_{\text{max}}$  = 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  $\text{cm}^{-1}$ . HRMS (m/z):  $[\text{M}+\text{H}]^+$  vypočítané pre  $\text{C}_{15}\text{H}_9\text{NO}_5$ : 284,0553; zmerané: 284,0563.

#### 6.1.31 dimetyl 9-oxo-9,10-dihydroakridín-4,5-dikarboxylát (27)

K látke **26** (2,42 g, 8,55 mmol) bol pridaný  $\text{POCl}_3$  (20 ml) a zmes bola miešaná 1 h pri teplote 140 °C. Do zmesi ochladenej na 50 °C bol po kvapkách pridávaný bezvodý MeOH (20 ml). Do miešajúcej sa zmesi bol po kvapkách pridávaný  $\text{POCl}_3$  do rozpustenia zrazeniny a zmes bola miešaná 12 h pri 50 °C. Zo zmesi bol následne za zníženého tlaku oddestilovaný MeOH a vzniknutá zrazenina bola odsatá. Zrazenina bola rozpustená v chloroforme (50 ml) a vytrepaná 10 %  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (3 × 50 ml). Chloroformová vrstva bola oddelená, vysušená pomocou bezvodého  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  a odparená za zníženého tlaku. Produkt bol prečistený stĺpcovou chromatografiou na silikageli ( $\text{CHCl}_3$ ). Bolo získaných 2,1 g hnedej amorfnej látky. Výťažok 79 %.

#### Alternatívny postup syntézy:

K látke **25** (1,79 g 5,94 mmol) bol pridaný POCl<sub>3</sub> (20 ml) a zmes bola miešaná 1 h pri teplote 140 °C. Do zmesi ochladenej na 50 °C bol po kvapkách pridávaný bezvodý MeOH (20 ml). Do miešajúcej sa zmesi bol po kvapkách pridávaný POCl<sub>3</sub> do rozpustenia zrazeniny a zmes bola miešaná 12 h pri 50 °C. Zo zmesi bol následne za zníženého tlaku oddestilovaný MeOH a vzniknutá zrazenina bola odsatá. Zrazenina bola rozpustená v chloroforme (50 ml) a vytrepaná 10% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (3 × 50 ml). Chloroformová vrstva bola oddelená, vysušená pomocou bezvodého Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a odparená za zníženého tlaku. Produkt bol prečistený stĺpcovou chromatografiou na silikageli (CHCl<sub>3</sub>). Bolo získaných 1,48 g hnedej amorfnej látky. Výťažok 80 %.

T.t. >230 °C za rozkladu. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, Chloroform-*D*) δ 13,65 (s; 1H); 8,62 (ddd; *J* = 7,9; 1,8; 0,7 Hz; 2H); 8,42 – 8,39 (dd; 2H); 7,26 – 7,22 (t; 2H); 4,03 (d; *J* = 0,8 Hz; 6H). <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, Chloroform-*D*) δ 177,10; 166,96; 140,80; 137,09; 133,18; 122,22; 120,61; 120,58; 115,10; 52,54. IČ(ATR)  $\nu_{\max}$  = 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 cm<sup>-1</sup>. MS (ESI) *m/z*: 312,20 [M+H]<sup>+</sup>

#### 6.1.32 dimetyl 9-aminoakridín-4,5-dikarboxylát (28)

Látka **27** (820 mg, 2,634 mmol) bola rozpustená v POCl<sub>3</sub> (5 ml) a zmes bola miešaná pri teplote 140 °C po dobu 1 h. Následne bol zo zmesi za zníženého tlaku oddestilovaný prebytočný POCl<sub>3</sub>. K rezíduu bol pridaný fenol (10 ekviv.) a zmes bola miešaná pri teplote 110 °C po dobu 15 min. Po uplynutí 15 minút bola zmes ochladená na teplotu 55 °C a do zmesi bol pridaný (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (506 mg, 5,266 mmol). Zmes bola miešaná pri tejto teplote 1 h. Následne bola zmes rozpustená v CHCl<sub>3</sub> (50 ml) a vytrepaná 1M NaOH (3 × 50 ml). Organická vrstva bola oddelená, vysušená pomocou Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a odparená za zníženého tlaku. Produkt bol prečistený pomocou stĺpcovej chromatografie na silikageli (EAC:MeOH:TEA 9:1:0,5). R<sub>f</sub> = 0,2. Bolo získaných 639 mg žltej práškovitej látky. Výťažok 78 %.

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, Chloroform-*d*) δ 8,27 (dd; *J* = 8,0; 1,6 Hz; 2H); 8,20 (ddd; *J* = 7,6; 1,6; 0,5 Hz; 2H); 7,15 – 7,06 (m; 2H); 4,70 (s; 2H); 4,00 (d; *J* = 0,5 Hz; 6H). <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, Chloroform-*d*) δ 167,46; 161,85; 139,47; 136,20; 131,15; 121,16; 119,71; 115,24; 52,72. IČ (ATR)  $\nu_{\max}$  3183, 2953, 2097, 1708, 1606, 1557, 1521, 1450, 1429, 1406, 1360, 1279, 1262, 1218, 1187, 1131, 1078, 1003, 993, 925, 887, 859, 832, 817, 780, 748, 710, 684, 663, 650, 624 cm<sup>-1</sup>. HRMS (*m/z*): [M+H]<sup>+</sup> vypočítané pre C<sub>31</sub>H<sub>35</sub>N<sub>9</sub>O: 311,1026; zmerané: 311,1040. Látka nebola ďalej charakterizovaná.

#### 6.1.33 dimetyl 9-[(6-azidohexyl)amino]akridín-4,5-dikarboxylát (29)

Látka **27** (220 mg, 0,708 mmol) bola rozpustená v POCl<sub>3</sub> (2 ml). Reakčná zmes bola miešaná 1,5 h pri teplote 140 °C. Prebytočný POCl<sub>3</sub> bol z reakčnej zmesi oddestilovaný za zníženého tlaku. K rezíduu bol pridaný fenol (708 mg, 7,52 mmol) a zmes bola miešaná 15 min pri 110 °C. Následne bola zmes ochladená na 55 °C a do zmesi bol pridaný 6-azidohexán-1-amín (302 mg, 2,214 mmol). Zmes bola miešaná pri 16 h pri teplote 55 °C. Následne bola zmes rozpustená v EAC (30 ml) a vytrepaná 1M hydroxidom sodným (4 × 25 ml). Organická vrstva bola vysušená bezvodým síranom sodným. Zo zmesi boli následne za zníženého tlaku oddestilované rozpúšťadlá. Produkt bol prečistený stĺpcovou chromatografiou na silikageli (1. EAC:AA, 9:1, R<sub>f</sub> = 0,06; 2. EAC:MeOH, 4:1). Bola získaná žltá olejovitá látka (154 mg). Výťažok 50 %.

$^1\text{H}$  NMR (600 MHz, CHLOROFORM-*D*)  $\delta$  13,11 (s; 1H); 8,45 (s; 1H); 8,21 (dd;  $J = 16,8$ ; 7,7 Hz; 2H); 7,99 (d;  $J = 7,9$  Hz; 1H); 7,14 (t;  $J = 7,7$  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); 1,83 (q;  $J = 7,2$  Hz; 2H); 1,62 (p;  $J = 7,1$  Hz; 2H); 1,54 – 1,39 (m; 4H).  $^{13}\text{C}$  NMR (151 MHz, CHLOROFORM-*D*)  $\delta$  167,68; 167,49; 152,69; 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; 14,44. IČ (ATR)  $\nu_{\text{max}}$  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  $\text{cm}^{-1}$ . MS (ESI)  $m/z$ : 436,6  $[\text{M}+\text{H}]^+$

#### 6.1.34 9-[(6-azidohexyl)amino]akridín-4,5-dikarboxylát sodný (30)

Látka **29** (47 mg, 0,11 mmol) bola rozpustená v THF (3 ml). Do reakčnej zmesi bol pridávaný nasýtený roztok hydroxidu sodného v zmesi MeOH/H<sub>2</sub>O 5:1 (0,5 ml) do zmeny sfarbenia roztoku. Prebytočný THF bol za zníženého tlaku z reakčnej zmesi oddestilovaný. Surový produkt bol rozpustený vo vode a k zmesi bola pridaná HCl do kyslej reakcie. Zmes bola vytrepaná do EAC (4 × 10 ml). EAC bol následne vysušený bezvodým Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> oddestilovaný za zníženého tlaku. Produkt nebol pri čistení pomocou stĺpcovej chromatografie stabilný a dochádzalo k jeho rozkladu. Produkt sa nepodarilo získať.

#### 6.1.35 *N*<sup>4</sup>,*N*<sup>5</sup>-bis[2-(dimetylamino)etyl]-9-oxo-4a,9,9a,10-tetrahydroakridín-4,5-dikarboxamid (31)

Látka **27** (680,2 mg, 0,185 mmol) bola rozpustená v *N,N*-dimetyletán-1,2-diamíne (21 ml). Zmes bola zahrievaná pri 108 °C po dobu 24 h. Prebytočný *N,N*-dimetyletán-1,2-diamín bol oddestilovaný za zníženého tlaku. Produkt bol prečistený stĺpcovou chromatografiou na silikageli (1. CHCl<sub>3</sub>:MeOH:TEA, 10:1:1,  $R_f = 0,16$  a 2. MeOH:TEA 3:2,  $R_f = 0,92$ ). Bola získaná žltá olejovitá látka (523,6 mg). Výťažok 57 %.

T.t. 250,5 – 252,5 °C za rozkladu.  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz, DMSO-*D*<sub>6</sub>)  $\delta$  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).  $^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz, DMSO-*D*<sub>6</sub>)  $\delta$  176,53; 167,08; 139,54; 133,52; 129,65; 121,52; 121,11; 120,75; 58,01; 45,29; 37,45. IČ (ATR)  $\nu_{\text{max}}$  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  $\text{cm}^{-1}$ . HRMS ( $m/z$ ):  $[\text{M}+\text{H}]^+$  vypočítané pre C<sub>23</sub>H<sub>29</sub>N<sub>5</sub>O<sub>3</sub>: 424,2343; zmerané: 424,2349.

#### 6.1.36 9-[(6-azidohexyl)amino]-*N*<sup>4</sup>,*N*<sup>5</sup>-bis[(2-dimetylamino)etyl]akridín-4,5-dikarboxamid (32)

Látka **31** (82 mg, 0,194 mmol) bola rozpustená v SOCl<sub>2</sub> (1,5 ml) a zmes bola miešaná pri teplote 85 °C po dobu 30 minút. Prebytočný SOCl<sub>2</sub> bol oddestilovaný za zníženého tlaku. K rezíduu bol pridaný fenol (182 mg, 1,94 mmol) a reakčná zmes bola miešaná pri teplote 110 °C po dobu 15 minút. Následne bola reakčná zmes ochladená na teplotu 55 °C a do zmesi bol pridaný 6-azidohexán-1-amín (41,2 mg, 0,290 mmol). Zmes bola miešaná pri teplote 55 °C po dobu 24 h. Po ochladení na laboratórnu teplotu bola reakčná zmes rozpustená v EAC (20 ml) a vytrepaná 1M NaOH (5 × 50 ml). Organická vrstva bola vysušená bezvodým Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Organická vrstva bola oddelená a za zníženého tlaku oddestilovaná. Produkt bol prečistený stĺpcovou chromatografiou na silikageli (EAC:MeOH:TEA, 7:3:0,1;  $R_f = 0,4$ ) a následne na oxide hlinitom (HEX:DCM:MeOH, 10:5:0,5;  $R_f = 0,24$ ). Bola získaných 46,7 mg žltej olejovitej látky. Výťažok 44 %.

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz, Acetón- $D_6$ )  $\delta$  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; 5H); 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; 3H).  $^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz, Acetón- $D_6$ )  $\delta$  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. IČ (ATR)  $\nu_{\text{max}}$  = 3198, 2942, 2095, 1705, 1686, 1637, 1608, 1589, 1558, 1518, 1431, 1400, 1312, 1280, 1233, 1192, 1171, 1142, 1120, 1092, 1078, 1067, 1007, 942, 888, 833, 805, 751, 722, 700, 691, 985, 658, 654, 645, 641, 634, 622, 616, 611, 607  $\text{cm}^{-1}$ . HRMS ( $m/z$ ):  $[\text{M}+\text{H}]^+$  vypočítané pre  $\text{C}_{29}\text{H}_{41}\text{N}_9\text{O}_2$ : 548,3456; zmerané: 548,3466.

### 6.1.37 2-[(2-karboxyfenyl)amino]-3-jódbenzoová kyselina (33)

Do zmesi 2-amino-3-jódbenzoovej kyseliny (662 mg, 2,52 mmol), 2-jódbenzoovej kyseliny (812 mg, 3,27 mmol), bezvodého  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (1,65 g, 11,94 mmol), katalytického množstva práškovej medi a katalytického množstva  $\text{Cu}_2\text{O}$  bol pridaný izoamylalkohol (10 ml). Reakčná zmes bola miešaná 30 minút pri 140 °C. Následne bol zo zmesi za zníženého tlaku oddestilovaný izoamylalkohol. Rezíduum bolo rozpustené v 1M NaOH a vzniknutý roztok bol prefiltrovaný. K filtrátu bola pridaná koncentrovaná HCl a vzniknutá zrazenina bola odsatá a prekryštalizovaná z MeOH. Vzniknuté kryštály boli odsaté a vysušené. Bolo získaných 697 mg hnedožltých kryštálov. Výťažok 72 %.

T.t. 240,2 -242,1 °C za rozkladu.  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz, DMSO- $D_6$ )  $\delta$  12,85 (s; 2H); 9,89 (s; 1H); 8,13 (dd;  $J = 7,9; 1,5$  Hz; 1H); 7,93 – 7,78 (m; 2H); 7,26 (ddd;  $J = 8,6; 7,1; 1,7$  Hz; 1H); 7,11 (t;  $J = 7,8$  Hz; 1H); 6,74 (ddd;  $J = 8,0; 7,1; 1,1$  Hz; 1H); 6,25 (dd;  $J = 8,6; 1,0$  Hz; 1H).  $^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz, DMSO- $D_6$ )  $\delta$  169,65; 167,31; 147,71; 143,24; 141,37; 133,87; 131,70; 131,02; 130,62; 127,46; 117,50; 113,93; 113,00; 101,89. HRMS ( $m/z$ ):  $[\text{M}+\text{H}]^+$  vypočítané pre  $\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{INO}_4$  383,9727, zmerané: 383,9727. IČ (ATR)  $\nu_{\text{max}}$  = 3314, 2976, 2639, 1675, 1605, 1587, 1573, 1554, 1502, 1432, 1297, 1242, 1205, 1159, 1087, 1049, 924, 891, 828, 812, 747, 722, 698, 685, 657, 649, 638, 632, 628, 611  $\text{cm}^{-1}$ .

### 6.1.38 metyl 5-jód-9-oxo-9,10-dihydroakridín-4-karboxylát (34)

K látke **33** (3,48 g, 9,1 mmol) bol pridaný  $\text{POCl}_3$  (20 ml) a zmes bola miešaná 1 h pri teplote 100 °C. Do zmesi ochladenej na 50 °C bol postupne po kvapkách pridávaný bezvodý MeOH (100 ml). Do zmesi bol za stáleho miešania pridávaný ďalší  $\text{POCl}_3$  do rozpustenia zrazeniny a zmes bola miešaná 12 h pri teplote 50 °C. Prebytočný MeOH bol zo zmesi oddestilovaný za zníženého tlaku. Vzniknutá zrazenina bola odsatá, premytá vodou a vysušená. Bolo získaných 2,97 g žltých kryštálov. Výťažok 78 %.

T.t.: 189,8 – 191,4 °C.  $^1\text{H}$  NMR (600 MHz, Chloroform- $D$ )  $\delta$  11,85 (s; 1H); 8,53 (dd;  $J = 7,9; 1,6$  Hz; 1H); 8,34 – 8,27 (m; 2H); 8,06 (dd;  $J = 7,4; 1,6$  Hz; 1H); 7,16 (t;  $J = 7,8$  Hz; 1H); 6,96 (t;  $J = 7,7$  Hz; 1H); 3,97 (s; 3H).  $^{13}\text{C}$  NMR (151 MHz, Chloroform- $D$ )  $\delta$  177,26; 167,77; 143,85; 141,31; 140,57; 136,83; 133,72; 127,62; 123,47; 122,36; 121,73; 120,63; 114,10; 86,21; 52,79. HRMS ( $m/z$ ):  $[\text{M}+\text{H}]^+$  vypočítané pre  $\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{INO}_4$ , 379,9778, zmerané, 379,9783. IČ (ATR)  $\nu_{\text{max}}$  = 3197, 2952, 1704, 1686, 1636, 1607, 1588, 1555, 1517, 1430, 1401, 1312, 1279, 1232, 1190, 1171, 1141, 1119, 1091, 1077, 1067, 1006, 942, 887, 832, 805, 751, 722, 700, 690, 685, 633  $\text{cm}^{-1}$ .

### 6.1.39 metyl 5-(6-hydroxyhex-1-ýn-1-yl)-9-oxo-9,10-dihydroakridín-4-karboxylát (35)

K zmesi látky **34** (100 mg, 0,264 mmol) a hex-5-ýn-1-olu (52 mg, 0,530 mmol) bol pridaný  $\text{CHCl}_3$  (3 ml) a TEA (1 ml). Do reakčnej zmesi bol za stáleho miešania pridaný CuI (10 mg) a  $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$  (10 mg). Reakčná zmes bola miešaná 30 minút pri 60 °C. Následne boli z reakčnej zmesi za



zniženeho tlaku oddestilované rozpúšťadlá. Produkt bol prečistený stĺpcovou chromatografiou na silikageli ( $\text{CHCl}_3$ )  $R_f = 0,14$ . Bolo získaných 70 mg žltej amorfnej látky. Výťažok 75 %.

T.t. 150,2-152,0 °C.  $^1\text{H}$  NMR (600 MHz, Chloroform-*D*)  $\delta$  12,09 (d;  $J = 7,1$  Hz; 1H); 8,64 – 8,59 (m; 1H); 8,31 – 8,24 (m; 2H); 7,68 – 7,61 (m; 1H); 7,16 (tq;  $J = 7,8; 2,9; 1,8$  Hz; 2H); 3,94 (d;  $J = 2,4$  Hz; 3H); 3,76 (t;  $J = 6,1$  Hz; 2H); 2,69 (td;  $J = 6,8; 2,0$  Hz; 2H); 1,95 – 1,80 (m; 4H).  $^{13}\text{C}$  NMR (151 MHz, Chloroform-*D*)  $\delta$  177,87; 167,87; 141,18; 141,10; 136,57; 136,11; 133,70; 126,44; 122,28; 121,60; 121,14; 120,21; 114,07; 112,83; 99,43; 75,02; 62,60; 52,43; 32,10; 24,93; 19,67. IČ (ATR)  $\nu_{\text{max}} = 3397, 3238, 2949, 1743, 1702, 1699, 1684, 1654, 1647, 1637, 1622, 1610, 1584, 1559, 1550, 1544, 1524, 1507, 1490, 1468, 1458, 1435, 1417, 1401, 1374, 1362, 1330, 1313, 1283, 1273, 1226, 1191, 1141, 1053, 1042, 1025, 1008, 971, 931, 888, 834, 811, 775, 752, 722, 694, 657, 650, 646, 640, 632, 626, 608$   $\text{cm}^{-1}$ . HRMS ( $m/z$ ):  $[\text{M}+\text{H}]^+$  vypočítané pre  $\text{C}_{21}\text{H}_{19}\text{NO}_4$ : 350,1387; zmerané: 350,1387.

#### 6.1.40 metyl 5-(6-azidohex-1-ýn-1-yl)-9-oxo-9,10-dihydroakridín-4-karboxylát (36)

Látka **35** (250 mg; 0,72 mmol) bola rozpustená v zmesi DCM (6 ml) a TEA (200  $\mu\text{l}$ ). Do reakčnej zmesi bol pridaný metánsulfonylchlorid ( $\text{MsCl}$ , 67  $\mu\text{l}$ ) a reakčná zmes bola miešaná 30 minút pri laboratórnej teplote. Následne bola reakčná zmes vytrepaná soľankou ( $3 \times 15$  ml). Organická vrstva bola oddelená, vysušená  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  a odparená za zníženeho tlaku. Rezíduum bolo rozpustené v DMF (5 ml) a do zmesi bol pridaný  $\text{NaN}_3$  (140 mg; 2,14 mmol). Reakčná zmes bola miešaná 3 h pri 60 °C. Následne bol zo zmesi za zníženeho tlaku oddestilovaný DMF. Rezíduum bolo rozpustené v  $\text{CHCl}_3$  a vytrepané vodou ( $3 \times 50$  ml). Organická vrstva bola oddelená, vysušená bezvodým  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  a odparená za zníženeho tlaku. Produkt bol prečistený stĺpcovou chromatografiou na silikageli ( $\text{CHCl}_3$ ).  $R_f = 0,16$ . Bolo získaných 236 mg žltej amorfnej látky. Výťažok 88 %.

T.t. 54,0 – 56,1 °C.  $^1\text{H}$  NMR (600 MHz, Chloroform-*D*)  $\delta$  12,29 (s; 1H); 8,69 (ddd;  $J = 8,0; 1,6; 0,8$  Hz; 1H); 8,42 (ddd;  $J = 7,5; 1,7; 0,7$  Hz; 1H); 8,35 (ddt;  $J = 8,1; 1,4; 0,7$  Hz; 1H); 7,73 (dt;  $J = 7,3; 1,0$  Hz; 1H); 7,28 – 7,18 (m; 2H); 3,99 (d;  $J = 0,7$  Hz; 3H); 3,42 – 3,36 (m; 2H); 2,76 – 2,69 (m; 2H); 1,93 – 1,83 (m; 4H).  $^{13}\text{C}$  NMR (151 MHz, Chloroform-*D*)  $\delta$  177,96; 167,99; 141,39; 141,29; 136,68; 136,11; 133,83; 126,70; 122,48; 121,63; 121,31; 120,28; 114,23; 112,66; 98,70; 75,46; 52,37; 51,14; 28,21; 25,61; 19,43. IČ: 3248, 2955, 2094, 1698, 1632, 1608, 1586, 1520, 1438, 1402, 1356, 1312, 1281, 1225, 1195, 1170, 1134, 1068, 1052, 1003, 942, 885, 837, 811, 757, 737, 717, 696, 646, 640, 626  $\text{cm}^{-1}$ . HRMS ( $m/z$ ):  $[\text{M}+\text{H}]^+$  vypočítané pre  $\text{C}_{21}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{O}_3$ : 375,1452; zmerané: 375,1465.

#### 6.1.41 metyl 9-amino-5-(6-azidohex-1-ýn-1-yl)akridín-4-karboxylát (37)

K látke **39** (100 mg, 0,264 mmol) a hex-5-ýn-1-yl metánsulfonátu (95 mg, 0,539 mmol) bol pridaný TEA (2 ml) a DCM (2 ml). Do reakčnej zmesi bol za stáleho miešania pridaný  $\text{CuI}$  (10 mg) a  $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$  (10 mg). Reakčná zmes bola miešaná 2 h pri 45 °C. Rozpúšťadlá boli za zníženeho tlaku oddestilované z reakčnej zmesi. Rezíduum bolo rozpustené v DMF (3 ml) a do zmesi bol za stáleho miešania pridaný  $\text{NaN}_3$  (175 mg, 2,69 mmol) a reakčná zmes bola zahrievaná 1 h pri 60 °C. DMF bol z reakčnej zmesi oddestilovaný za zníženeho tlaku a produkt bol prečistený stĺpcovou chromatografiou na silikageli (EAC:MeOH:TEA 95:5:5). Bolo získaných 40 mg žltó-červenej pevnej látky. Látka sa pri oddestilovaní rozpúšťadiel rozkladala a nebolo možné získať NMR čistej látky.

#### 6.1.42 metyl 9-amino-5-(4,5,6,7-tetrahydro-[1,2,3]triazolo[1,5-a]pyridín-3-yl)akridín-4-karboxylát (37-1)

K látke **36** (100 mg, 0,267 mmol) bol pridaný  $\text{POCl}_3$  (2 ml) a reakčná zmes bola miešaná 1 h pri 140 °C. Následne bol  $\text{POCl}_3$  z reakčnej zmesi oddestilovaný za zníženeho tlaku a k rezíduu bol

pridaný fenol (600 mg) a zmes bola miešaná 15 minút pri 110 °C. Následne bola reakčná zmes ochladená na 55 °C a do reakčnej zmesi bol pridaný (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> a reakčná zmes bola miešaná ešte 24 h pri 55 °C. Potom bola reakčná zmes rozpustená v CHCl<sub>3</sub> (20 ml) a vytrepaná 2 M NaOH (3 × 25 ml). Organická vrstva bola oddelená, vysušená bezvodým Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a odparená za zníženého tlaku. Produkt bol prečistený stĺpcovou chromatografiou na silikageli (EAC:MeOH:TEA 95:5:5, R<sub>f</sub> = 0,05). Výťažok 64 %.

<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CHLOROFORM-*D*) δ 11,62 (s; 1H); 8,46 – 8,42 (m; 1H); 8,16 (dd; *J* = 7,7; 1,6 Hz; 1H); 7,97 (d; *J* = 8,0 Hz; 1H); 7,68 – 7,61 (m; 1H); 7,50 (dt; *J* = 7,4; 1,9 Hz; 1H); 7,43 (td; *J* = 7,7; 2,8 Hz; 1H); 7,04 (td; *J* = 7,8; 4,9 Hz; 2H); 3,91 (s; 3H); 3,39 – 3,32 (m; 2H); 2,71 – 2,63 (m; 2H); 1,88 – 1,78 (m; 4H). <sup>13</sup>C NMR (151 MHz, CHLOROFORM-*D*) δ 167,98; 161,45; 140,18; 139,27; 134,68 (d; *J* = 16,5 Hz); 134,27 (d; *J* = 11,2 Hz); 132,23 (d; *J* = 19,6 Hz); 131,44 (d; *J* = 24,8 Hz); 128,59; 124,26; 121,23 (d; *J* = 24,3 Hz); 120,54; 119,81 (d; *J* = 25,5 Hz); 118,72; 113,32; 112,14; 98,21; 75,80; 52,14; 51,14; 28,20; 25,61; 19,58 – 19,19 (m). IČ (ATR)  $\nu_{\max}$  = 3258, 2950, 1748, 1702, 1694, 1654, 1647, 1637, 1604, 1559, 1540, 1520, 1490, 1451, 1436, 1411, 1355, 1269, 1192, 1138, 1071, 999, 921, 884, 823, 796, 763, 748, 721, 695, 670, 660, 653, 650, 643, 637, 631, 625, 621, 616 cm<sup>-1</sup>.

#### 6.1.43 5-(6-azidoheks-1-ýn-1-yl)-*N*-[2-(dimetylamino)etyl]-9-oxo-9,10-dihydroakridín-4-karboxamid (38)

Látka **36** (100 mg, 0,267 mmol) bola rozpustená v *N,N*-dimetyletán-1,2-diamíne (2 ml) a reakčná zmes bola miešaná pri 108 °C 1 h. Následne bol z reakcie za zníženého tlaku oddestilovaný prebytočný *N,N*-dimetyletán-1,2-diamín. Surový produkt bol prečistený stĺpcovou chromatografiou na silikageli (CHCl<sub>3</sub>:MeOH 4:1, R<sub>f</sub> = 0,38). Bolo získaných 40 mg žltej amorfnej látky. Výťažok 35 %.

T.t. 232,7 – 234,9 °C. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, Chloroform-*D*) δ 12,90 (s; 1H); 8,58 (dd; *J* = 8,0; 1,4 Hz; 1H); 8,35 (dd; *J* = 8,1; 1,5 Hz; 1H); 7,98 (dd; *J* = 7,5; 1,5 Hz; 1H); 7,72 (dd; *J* = 7,2; 1,5 Hz; 1H); 7,47 (d; *J* = 5,4 Hz; 1H); 7,18 (t; *J* = 7,7 Hz; 2H); 3,61 (q; *J* = 5,4 Hz; 2H); 3,40 (t; *J* = 6,3 Hz; 2H); 2,74 (t; *J* = 6,5 Hz; 2H); 2,66 (t; *J* = 5,9 Hz; 2H); 2,36 (s; 6H); 1,90 (dddd; *J* = 10,5; 8,9; 6,8; 4,6; 2,1 Hz; 4H). <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, Chloroform-*D*) δ 177,98; 167,95; 141,37; 140,63; 135,79; 131,80; 131,43; 126,36; 122,46; 121,06; 120,90; 119,92; 118,04; 112,63; 98,39; 75,49; 57,51; 51,01; 44,96; 36,83; 28,06; 25,42; 19,29. IČ (ATR)  $\nu_{\max}$  3293, 3073, 2941, 2822, 2773, 2098, 1644, 1611, 1573, 1525, 1457, 1436, 1393, 1328, 1305, 1268, 1246, 1229, 1189, 1157, 1086, 1061, 1042, 962, 945, 885, 836, 810, 787, 755, 710, 664, 626 cm<sup>-1</sup>. HRMS (*m/z*): [M+H]<sup>+</sup> vypočítané pre C<sub>24</sub>H<sub>26</sub>N<sub>6</sub>O<sub>2</sub>: 431,2190; zmerané: 431,2191.

#### 6.1.44 metyl 9-amino-5-jódakridín-4-karboxylát (39)

K látke **34** (1,7 g, 4,48 mmol) bol pridaný SOCl<sub>2</sub> (10 ml) a zmes bola miešaná 1 h pri 80 °C. Následne bol z reakčnej zmesi za zníženého tlaku oddestilovaný SOCl<sub>2</sub>. K rezíduu bol pridaný fenol (8,8 g, 93,5 mmol) a reakčná zmes bola miešaná 15 minút pri 110 °C. Do reakčnej zmesi bol po jej ochladení na 65 °C pridaný (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1,117 g, 11,62 mmol) a reakčná zmes bola pri tejto teplote miešaná 1 h. Potom bola reakčná zmes rozpustená v CHCl<sub>3</sub> (50 ml) a vytrepaná 2 M NaOH (3 × 75 ml). Organická vrstva bola oddelená, vysušená bezvodým Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a odparená za zníženého tlaku. Produkt bol prečistený stĺpcovou chromatografiou na silikageli (CHCl<sub>3</sub>:MeOH 9:1, R<sub>f</sub> = 0,25). Výťažok 87 %.

T.t. 205 - 209 °C za rozkladu. <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-*D*<sub>6</sub>) δ 8,51 – 8,48 (m; 1H); 8,41 (d; *J* = 8,4 Hz; 1H); 8,31 (d; *J* = 7,0 Hz; 1H); 8,06 (s; 2H); 7,78 (s; 1H); 7,35 (t; *J* = 7,7 Hz; 1H); 7,05 (t; *J* = 8,0 Hz; 1H); 3,95 (s; 3H). <sup>13</sup>C NMR (151 MHz, DMSO-*D*<sub>6</sub>) δ 170,09; 151,81; 146,85; 146,38; 141,35;

133,39; 129,67; 126,16; 124,80; 123,64; 121,68; 113,74; 113,15; 105,29; 52,88. IČ (ATR)  $\nu_{\max}$  = 3240, 3013, 2947, 1687, 1606, 1564, 1547, 1517, 1456, 1438, 1408, 1352, 1314, 1274, 1216, 1195, 1139, 1120, 1094, 1079, 1012, 976, 922, 885, 859, 825, 792, 766, 750, 746, 717, 680, 670, 657, 641, 628, 612  $\text{cm}^{-1}$ . HRMS (m/z):  $[\text{M}+\text{H}]^+$  vypočítané pre  $\text{C}_{25}\text{H}_{33}\text{N}_7\text{O}$ : 378,9938; zmerané: 378,9947.

#### 6.1.45 9-amino-N-[2-(dimetylamino)etyl]-5-jódakridín-4-karboxamid (40)

Látka **39** (0,5 g, 1,322 mmol) bola rozpustená v *N,N*-dimetyletán-1,2-diamíne (5 ml). Reakčná zmes bola miešaná 1 h pri teplote 60 °C. Následne bol z reakčnej zmesi za zníženého tlaku oddestilovaný prebytočný *N,N*-dimetyletán-1,2-diamín. Produkt bol prečistený stĺpcovou chromatografiou na silikageli (EAC:MeOH:TEA 9:1:1).  $R_f$  = 0,1. Bolo získaných 521 mg žltoranžového prášku. Výťažok 91 %.

T.t. 214,0 -215,8 °C za rozkladu.  $^1\text{H}$  NMR (600 MHz,  $\text{DMSO-}D_6$ )  $\delta$  12,25 (t;  $J$  = 6,1 Hz; 1H); 8,66 (dd;  $J$  = 7,1; 1,5 Hz; 1H); 8,59 (dd;  $J$  = 8,6; 1,6 Hz; 1H); 8,46 (dd;  $J$  = 8,6; 1,2 Hz; 1H); 8,38 (dd;  $J$  = 7,1; 1,2 Hz; 1H); 8,34 (s; 2H); 7,45 (dd;  $J$  = 8,5; 7,1 Hz; 1H); 7,11 (dd;  $J$  = 8,5; 7,1 Hz; 1H); 3,64 (q;  $J$  = 6,7 Hz; 2H); 2,54 (t;  $J$  = 7,0 Hz; 2H); 2,18 (s; 6H).  $^{13}\text{C}$  NMR (151 MHz,  $\text{DMSO-}D_6$ )  $\delta$  165,64; 153,58; 147,18; 146,59; 142,31; 135,62; 127,99; 127,69; 124,87; 123,87; 121,94; 114,17; 112,99; 103,17; 59,55; 45,92; 38,33. IČ (ATR)  $\nu_{\max}$  3368, 3245, 2980, 2918, 2850, 2809, 2778, 2763, 2606, 2498, 1671, 1640, 1604, 1551, 1536, 1519, 1477, 1442, 1399, 1383, 1360, 1350, 1289, 1248, 1194, 1172, 1156, 1117, 1062, 1036, 965, 935, 902, 877, 852, 834, 808, 792, 778, 746, 719, 678, 661, 640, 633, 617  $\text{cm}^{-1}$ . HRMS (m/z):  $[\text{M}+\text{H}]^+$  vypočítané pre  $\text{C}_{18}\text{H}_{19}\text{I}\text{N}_4\text{O}$ : 435,0676; zmerané: 435,0686.

#### 6.1.46 9-amino-5-(6-azidohex-1-ýn-1-yl)-N-[2-(dimetylamino)etyl]akridín-4-karboxamid (41)

K zmesi látky **40** (101 mg, 0,233 mmol) a hex-5-ýn-1-yl metánsulfonátu (108 mg, 0,613 mmol) bol pridaný  $\text{CHCl}_3$  (3 ml) a TEA (1 ml). Do reakčnej zmesi bol za stáleho miešania pridaný  $\text{CuI}$  (10 mg) a  $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$  (10 mg). Reakčná zmes bola zahriata na 60 °C, reakcia bola ukončená a rozpúšťadlá boli za zníženého tlaku oddestilované z reakčnej zmesi. Rezíduum bolo použité v ďalšej reakcii bez čistenia. Rezíduum bolo rozpustené v DMF (3 ml) a do reakčnej zmesi bol pridaný  $\text{NaN}_3$  (148 mg, 2,28 mmol). Reakčná zmes bola miešaná 1 h pri 60 °C. Následne bol z reakčnej zmesi za zníženého tlaku oddestilovaný DMF. Produkt bol prečistený stĺpcovou chromatografiou na silikageli (1.  $\text{CHCl}_3$ :MeOH 3:2, 2. EAC:MeOH:TEA 95:5:5;  $R_f$  = 0,14.). Bolo získaných 46 mg oranžového prášku.

T.t. 158,9 – 161,2 °C.  $^1\text{H}$  NMR (600 MHz,  $\text{DMSO-}D_6$ )  $\delta$  12,64 (t;  $J$  = 6,1 Hz; 1H); 8,64 (dd;  $J$  = 7,1; 1,5 Hz; 1H); 8,58 (dd;  $J$  = 8,6; 1,6 Hz; 1H); 8,39 (dd;  $J$  = 8,7; 1,4 Hz; 1H); 8,25 (s; 2H); 7,86 (dd;  $J$  = 7,0; 1,3 Hz; 1H); 7,42 (dd;  $J$  = 8,5; 7,1 Hz; 1H); 7,30 (dd;  $J$  = 8,6; 6,9 Hz; 1H); 3,60 – 3,54 (m; 2H); 3,39 (t;  $J$  = 6,4 Hz; 2H); 2,64 (t;  $J$  = 6,7 Hz; 2H); 2,47 – 2,42 (m; 2H); 2,16 (s; 6H); 1,77 – 1,65 (m; 4H).  $^{13}\text{C}$  NMR (151 MHz,  $\text{DMSO-}D_6$ )  $\delta$  165,93; 153,26; 147,62; 146,75; 136,51; 135,26; 127,95; 127,49; 124,05; 122,21; 121,97; 121,63; 113,90; 112,82; 95,61; 80,54; 59,60; 50,78; 45,98; 40,61; 38,27; 28,23; 26,45; 19,38. IČ (ATR)  $\nu_{\max}$  = 3156, 2931, 2827, 2775, 2082, 1691, 1630, 1567, 1549, 1530, 1494, 1466, 1440, 1386, 1353, 1281, 1258, 1237, 1190, 1173, 1086, 1056, 1013, 974, 904, 849, 802, 759, 752, 679, 650, 646, 637. HRMS (m/z):  $[\text{M}+\text{H}]^+$  vypočítané pre  $\text{C}_{25}\text{H}_{33}\text{N}_7\text{O}$ : 430,2350; zmerané: 430,2359.

#### 6.1.47 9-amino-N-[2-(dimetylamino)etyl]-5-(6-hydroxyhex-1-ýn-1-yl)akridín-4-karboxamid (42)

K látke **40** (128 mg, 0,295 mmol) a hex-5-ýn-1-olu (58 mg, 0,59 mmol) bol pridaný  $\text{CHCl}_3$  (3 ml) a TEA (1 ml). Do reakčnej zmesi bol za stáleho miešania pridaný  $\text{CuI}$  (10 mg) a tetrakis(trifenylfosfín)paládium (10 mg) a reakčná zmes bola miešaná 3 h pri 60 °C. Následne boli

z reakčnej zmesi za zníženého tlaku oddestilované rozpúšťadlá a surový produkt bol prečistený stĺpcovou chromatografiou na silikageli (EAC:MeOH:TEA 9:1:0,5;  $R_f = 0,16$ ). Bolo získaných 104 mg oranžového prášku. Výťažok 87 %.

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz; DMSO- $D_6$ )  $\delta$  12,71 (t;  $J = 6,1$  Hz; 1H); 8,64 (ddd;  $J = 22,2; 7,9; 1,6$  Hz; 2H); 8,43 (dd;  $J = 8,7; 1,4$  Hz; 1H); 8,31 (s; 2H); 7,89 (dd;  $J = 7,1; 1,2$  Hz; 1H); 7,46 (dd;  $J = 8,5; 7,1$  Hz; 1H); 7,34 (dd;  $J = 8,7; 6,9$  Hz; 1H); 3,62 (q;  $J = 6,8$  Hz; 2H); 3,47 (t;  $J = 6,3$  Hz; 2H); 2,64 (t;  $J = 7,0$  Hz; 2H); 2,54 (t;  $J = 7,3$  Hz; 2H); 2,24 (s; 5H); 1,74 – 1,59 (m; 4H).  $^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz; dms)  $\delta$  165,96; 153,19; 147,53; 146,64; 136,42; 135,18; 127,95; 127,31; 123,91; 122,16; 121,99; 121,53; 113,81; 112,73; 96,13; 80,19; 60,69; 59,33; 45,71; 37,94; 32,34; 25,90; 19,58. MS (ESI)  $m/z$ : 405,3.

#### 6.1.48 9-amino-*N*-[2-(dimetylamino)etyl]-5-(6-hydroxyhexyl)akridín-4-karboxamid (43)

Látka **42** (102 mg, 0,252 mmol) bola rozpustená v MeOH (25 ml). Roztok bol použitý na redukciiu trojitej väzby alkýnu v polohe 5 akridínového jadra. Na redukciiu bol použitý prístroj H-Cube Mini Plus™ (ThalesNano Nanotechnology Inc., Budapest, Hungary). Boli testované nasledujúce podmienky redukcie: 1. Pd/C,  $t = 45$  °C,  $p = 10$  bar, prietok 1 ml/min; 2. Pd/C,  $t = 45$  °C,  $p = 30$  bar, prietok 1 ml/min; 3. Pd/C,  $t = 45$  °C,  $p = 50$  bar, prietok 0,5 ml/min; 4. Pd/C,  $t = 45$  °C,  $p = 70$  bar, prietok 0,5 ml/min. Najlepšie výsledky podľa TLC-MS analýzy boli dosiahnuté za podmienok č. 3, kedy podľa TLC a TLC-MS došlo k redukciiu trojitej väzby na väzbu jednoduchú. V zmesi boli prítomné aj degradačné produkty. Bolo získaných 38 mg látky. Výťažok 37 %.

Látka bola charakterizovaná iba MS (ESI)  $m/z$ : 409,3.

Látka **43** (38 mg, 0,093 mmol) bola použitá v ďalšej reakcii na prípravu látky **44**. K roztoku látky **43** v zmesi DCM (6 ml) a TEA (2 ml) bol pridaný MsCl a zmes bola miešaná pri 0 °C po dobu 30 minút. Zo zmesi sa nepodarilo izolovať požadovaný produkt, a preto bola táto syntetická cesta opustená. Iný syntetický postup prípravy látky **44** bude popísaný nižšie.

#### 6.1.49 metyl 5-(6-hydroxyhexyl)-9-oxo-9,10-dihydroakridín-4-karboxylát (45)

Látka **35** (99 mg, 0,283 mmol) bola rozpustená v MeOH (25 ml). Roztok bol použitý na redukciiu trojitej väzby alkýnu v polohe 5 dihydroakridónového jadra. Na redukciiu bol použitý prístroj H-Cube Mini Plus™ (ThalesNano Nanotechnology Inc., Budapest, Hungary) za nasledujúcich podmienok: katalyzátor Pd/C,  $t = 45$  °C,  $p = 30$  bar, prietok 0,5 ml/min. Na redukciiu trojitej väzby stačil 1 cyklus a produkt bol potvrdený pomocou TLC/MS analýzy. Produkt bol prečistený pomocou stĺpcovej chromatografie na silikageli (CHF:MeOH 99:1,  $R_f = 0,45$ ). Bolo získaných 88 mg (0,249 mmol) žltkastej amorfnej látky. Výťažok 85 %.

T.t. 106,3 – 108,8 °C.  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz, Chloroform- $d$ )  $\delta$  12,00 (s; 1H); 8,73 (dd;  $J = 8,0; 1,7$  Hz; 1H); 8,44 (dd;  $J = 7,6; 1,7$  Hz; 1H); 8,35 (dd;  $J = 8,0; 1,5$  Hz; 1H); 7,54 (dd;  $J = 7,1; 1,5$  Hz; 1H); 7,29 – 7,22 (m; 3H); 4,04 (s; 3H); 3,68 (t;  $J = 6,5$  Hz; 2H); 2,96 (t; 2H); 1,88 – 1,77 (m; 3H); 1,66 – 1,57 (m; 3H); 1,60 – 1,47 (m; 5H).  $^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz, Chloroform- $d$ )  $\delta$  178,23; 168,59; 141,46; 138,39; 136,47; 133,88; 133,70; 129,28; 124,97; 122,00; 121,92; 121,66; 119,82; 113,68; 62,90; 52,53; 32,57; 30,96; 29,19; 28,97; 25,49. IČ (ATR)  $\nu_{\text{max}}$  = 3271, 2929, 2857, 1690, 1613, 1594, 1525, 1438, 1412, 1278, 1194, 1173, 1059, 1009, 889, 836, 808, 755, 722, 690, 650, 645, 637, 626, 618, 611  $\text{cm}^{-1}$ . HRMS ( $m/z$ ):  $[\text{M}+\text{H}]^+$  vypočítané pre  $\text{C}_{21}\text{H}_{23}\text{NO}_4$ : 354,1700; zmerané: 354,1709.

#### 6.1.50 metyl 5-(6-azidohexyl)-9-oxo-9,10-dihydroakridín-4-karboxylát (46)

Látka **45** (80 mg, 0,226 mmol) bola rozpustená v DCM (1 ml). Do roztoku bol pridaný TEA (46 mg, 0,458 mmol) a za stáleho miešania bol do reakčnej zmesi pridaný MsCl (31 mg, 0,271 mmol). Zmes bola miešaná 30 minút pri laboratórnej teplote. Následne bola reakčná zmes prenesená do deliaceho lieviku a bol pridaný DCM (19 ml). Zmes bola vytrepaná soľankou (3 × 30

ml) a organická vrstva bola oddelená, vysušená Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a odparená za zníženého tlaku. Rezíduum bolo rozpustené v DMF (2 ml) a do zmesi bol za stáleho miešania pridaný NaN<sub>3</sub> (50 mg, 0,769 mmol). Reakčná zmes bola miešaná 3 h pri 60 °C. následne bol zo zmesi za zníženého tlaku oddestilovaný DMF a rezíduum bolo rozpustené v CHCl<sub>3</sub> (30 ml) a vytrepané vodou (3 × 30 ml). Produkt bol prečistený stĺpcovou chromatografiou na silikageli (CHCl<sub>3</sub>. R<sub>f</sub> = 0,4). Bolo získaných 71 mg žltkastej amorfnej látky. Výťažok: 83 %.

T.t. 75,5 – 77,7 °C. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, Chloroform-*D*) δ 11,86 (s; 1H); 8,63 (dd; *J* = 7,9; 1,6 Hz; 1H); 8,33 (dd; *J* = 7,6; 1,6 Hz; 1H); 8,28 (dd; *J* = 8,1; 1,5 Hz; 1H); 7,46 (dd; *J* = 7,2; 1,5 Hz; 1H); 7,18 (td; *J* = 7,9; 5,7 Hz; 2H); 3,98 (s; 3H); 3,26 (t; *J* = 6,9 Hz; 2H); 2,88 – 2,81 (m; 2H); 1,76 (p; *J* = 7,7 Hz; 2H); 1,62 (p; *J* = 7,0 Hz; 2H); 1,56 – 1,40 (m; 3H). <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, Chloroform-*D*) δ 177,90; 168,32; 141,21; 138,17; 136,23; 133,56; 133,42; 128,98; 124,81; 121,80; 121,73; 121,48; 119,64; 113,48; 52,38; 51,25; 30,76; 28,87; 28,66; 28,60; 26,37. IČ (ATR)  $\nu_{\max}$  = 3268, 2934, 2860, 2087, 1695, 1636, 1610, 1597, 1593, 1524, 1462, 1435, 1409, 1348, 1309, 1280, 1193, 1170, 1139, 1106, 1075, 1006, 973, 917, 901, 888, 833, 823, 764, 742, 725, 696, 689, 680, 660, 654, 649, 644, 637, 632, 627, 611 cm<sup>-1</sup>. HRMS (*m/z*): [M+H]<sup>+</sup> vypočítané pre C<sub>21</sub>H<sub>22</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub>: 379,1765; zmerané: 379,1772.

#### 6.1.51 metyl 9-amino-5-(6-azidohexyl)akridín-4-karboxylát (47)

Látka **46** (68 mg, 0,179 mmol) bola rozpustená v SOCl<sub>2</sub> (1 ml) a zmes bola miešaná 1 h pri 80 °C. Následne bol z reakcie za zníženého tlaku oddestilovaný SOCl<sub>2</sub> a k reziduu bol pridaný fenol (10 ekvivalentov) a reakčná zmes bola zahriata na 110 °C a miešaná pri tejto teplote 15 minút. Po ochladení na 65 °C bol do zmesi pridaný (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (50 mg, 0,52 mmol) a reakčná zmes bola miešaná 1 h pri tejto teplote. Reakčná zmes bola následne rozpustená v CHCl<sub>3</sub> (40 ml) a vytrepaná 2M NaOH (3 × 30 ml). Organická vrstva bola oddelená, vysušená Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a za zníženého tlaku oddestilovaná. Produkt bol prečistený stĺpcovou chromatografiou na silikageli (1. EAC, 2. EAC:TEA 95:5. R<sub>f</sub> = 0,13). Bolo získaných 18 mg žltoranžovej olejovitej látky. Výťažok 26 %.

T.t. 66,3 – 68,5 °C. R<sub>f</sub> v druhej MF: 0,35. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*D*<sub>6</sub>) δ 8,49 (d; *J* = 8,7 Hz; 1H); 8,23 (d; *J* = 8,6 Hz; 1H); 7,80 (s; 2H); 7,74 (d; *J* = 6,7 Hz; 1H); 7,50 (d; *J* = 6,6 Hz; 1H); 7,31 (dd; *J* = 8,6; 6,7 Hz; 1H); 7,28 – 7,21 (m; 1H); 3,91 (s; 3H); 3,29 (t; *J* = 6,9 Hz; 2H); 3,14 – 3,07 (m; 2H); 1,72 (d; *J* = 7,7 Hz; 2H); 1,52 (dd; *J* = 8,9; 5,0 Hz; 2H); 1,36 (p; *J* = 3,4 Hz; 4H). <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, DMSO-*D*<sub>6</sub>) δ 170,13; 150,85; 147,68; 145,24; 140,67; 133,44; 129,68; 128,81; 125,93; 122,27; 121,55; 120,72; 113,19; 113,09; 52,21; 51,05; 32,33; 30,45; 29,34; 28,72; 26,58. IČ (ATR)  $\nu_{\max}$  = 3265, 2936, 2859, 2097, 1693, 1609, 1557, 1523, 1452, 1436, 1415, 1361, 1329, 1306, 1271, 1189, 1169, 1138, 1099, 1078, 1000, 955, 910, 887, 838, 809, 787, 760, 753, 736, 651, 637, 627, 612, 609 cm<sup>-1</sup>. HRMS (*m/z*): [M+H]<sup>+</sup> vypočítané pre C<sub>21</sub>H<sub>23</sub>N<sub>5</sub>O<sub>2</sub>: 378,1925; zmerané: 378,1931.

#### 6.1.52 9-amino-5-(6-azidohexyl)-N-[2-(dimetylamino)etyl]akridín-4-karboxamid (44)

Látka **47** (18 mg, 0,0476 mmol) bola rozpustená v *N,N*-dimetyletán-1,2-diamíne (1 ml) a zmes bola miešaná 1 h pri 60 °C. Následne bol zo zmesi za zníženého tlaku oddestilovaný prebytočný *N,N*-dimetyletán-1,2-diamín. Produkt bol prečistený stĺpcovou chromatografiou na silikageli (1. CHCl<sub>3</sub>:MeOH 4:1; 2. CHCl<sub>3</sub>:MeOH:TEA 4:1:0,5. R<sub>f</sub> = 0,5). Bolo získaných 18 mg (0,0415 mmol) žltoranžovej kryštalickej látky. Výťažok 87 %.

T.t. 172,2 – 174,0 °C. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, Chloroform-*d*) δ 12,59 (t; *J* = 6,0 Hz; 1H); 8,60 (d; *J* = 7,1 Hz; 1H); 7,70 (dd; *J* = 14,9; 8,6 Hz; 2H); 7,37 (d; *J* = 6,8 Hz; 1H); 7,20 (t; *J* = 7,7 Hz; 1H); 7,08 (t; *J* = 7,8 Hz; 1H); 6,41 (s; 2H); 3,85 (q; *J* = 6,1 Hz; 2H); 3,23 (t; *J* = 7,0 Hz; 2H); 3,11 (t; *J* = 7,4 Hz; 2H); 2,83 (t; *J* = 6,4 Hz; 2H); 2,48 (s; 6H); 1,80 (t; *J* = 7,2 Hz; 2H); 1,58 (d; *J* = 6,9 Hz; 2H); 1,45 – 1,38 (m; 4H). <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, Chloroform-*D*) δ 167,27; 149,97; 145,52; 145,06; 138,83; 134,24;

129,67; 127,18; 124,78; 122,42; 121,46; 119,67; 112,71; 112,19; 59,41; 51,38; 45,71; 37,50; 32,58; 29,22; 29,00; 28,78; 26,82. IČ (ATR)  $\nu_{\max}$  = 3379, 3183, 2928, 2859, 2827, 2801, 2094, 1688, 1632, 1616, 1569, 1550, 1529, 1490, 1467, 1440, 1395, 1355, 1330, 1277, 1258, 1211, 1192, 1171, 1162, 1093, 1082, 1057, 1039, 1015, 960, 895, 853, 801, 763, 757, 730, 712, 681, 666, 650, 645, 641, 636, 631, 627, 617, 610, 603  $\text{cm}^{-1}$ . HRMS (m/z):  $[\text{M}+\text{H}]^+$  vypočítané pre  $\text{C}_{24}\text{H}_{31}\text{N}_7\text{O}$ : 434,2663; zmerané: 434,2669.

#### 6.1.53 $N^1$ -(3-amíniopropyl)- $N^4$ -(3-azidopropyl)bután-1,4-diamínium trifluorooctát (48)

Látka **47** bola pripravená podľa publikovaného postupu.<sup>245</sup>

#### 6.1.54 2'-{4-[(6-azidohexyl)oxy]fenyl}-6-(4-metylpiperazín-1-yl)-1H,3'H-2,5'-bibenzo[d]imidazol (49)

Do zmesi Hoechst 33258 (100 mg, 0,187 mmol) a bezvodého  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (117 mg, 0,846 mmol) bol pridaný bezvodý DMF (1,2 ml). Do reakčnej zmesi bol pridaný 1-azido-6-brómhexán (58 mg, 0,281 mmol) a zmes bola miešaná 12 h pri 60 °C. Následne bol zo zmesi za zníženého tlaku oddestilovaný DMF. Produkt bol prečistený stĺpcovou chromatografiou na silikageli ( $\text{CHCl}_3$ :MeOH 95:5.  $R_f$  = 0,5). Produkt bol prevedený na hydrochlorid okamžite po prečistení. Bolo získaných 45 mg žltej práškovej látky. Výťažok 48 %.

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz, MeOH- $D_4$ )  $\delta$  8,19 (s; 1H); 7,96 – 7,87 (m; 3H); 7,63 (d; J = 8,4 Hz; 1H); 7,49 (d; J = 8,7 Hz; 1H); 7,10 (d; J = 2,2 Hz; 1H); 7,01 (m; 1H); 6,97 – 6,91 (m; 2H); 3,88 (t; J = 6,5 Hz; 2H); 3,27 – 3,17 (m; 6H); 2,70 (t; J = 5,0 Hz; 4H); 2,40 (s; 3H); 1,76 – 1,64 (m; 2H); 1,56 (p; J = 6,9 Hz; 2H); 1,46 – 1,34 (m; 4H).  $^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz, MeOH- $D_4$ )  $\delta$  162,53; 155,27; 153,72; 149,45; 129,48; 125,56; 122,68; 122,39; 116,33; 115,88; 69,02; 56,07; 52,38; 51,60; 45,90; 30,18; 29,85; 27,62; 26,67. HRMS (m/z):  $[\text{M}+\text{H}]^+$  vypočítané pre  $\text{C}_{31}\text{H}_{35}\text{N}_9\text{O}$ : 550,3037, zmerané: 550,3045.

## 6.2 Modifikácia ON na pevnej fáze a purifikácia modifikovaného ON

Testované ON boli pripravené štandardnou fosforamiditovou syntézou na pevnej fáze (CPG 500 Å, loading 30 – 40  $\mu\text{mol/g}$ ) na ABI 394 DNA/RNA syntetizéri. Syntéza ON prebiehala v 1  $\mu\text{mol}$  scale. Na syntézu bolo použité 3'-fosfát CPG a Ultra Mild chránené fosforamiditové monoméry. Tymidínový fosforamidit nesúci DBCO bol počas syntézy zavedený do požadovaných pozícií v sekvencii. Na 5'-koniec bol zavedený FAM pomocou fosforamiditového monoméru. Po syntéze bola pevná fáza so syntetizovaným ON vysušená a použitá na modifikáciu ON pomocou akridínových derivátov. Bolo pripravených 8 typov ON (Tabuľka 3).

### 6.2.1 Obecný postup modifikácie a purifikácie ON sond

Ku 4 mg pevnej fázy v 2,5 ml plastových vialkách bol pridaný roztok príslušného akridínového derivátu v MeOH (200  $\mu\text{l}$ , ca 50 mM). Zmes bola trepaná v tme, za laboratórnej teploty po dobu 24 h. Následne bol zo zmesi odpipetovaný prebytočný roztok akridínového derivátu a pevná fáza bola ešte 5-krát premytá čistým MeOH (500  $\mu\text{l}$ ). K premytej pevnej fáze bolo pridané Ultra Mild deprotečné činidlo – 0,05 M  $\text{K}_2\text{CO}_3$  v MeOH (500  $\mu\text{l}$ ). Zmes bola trepaná v tme, za laboratórnej teploty po dobu 8 h. Do reakčnej zmesi bola pridaná demineralizovaná voda (500  $\mu\text{l}$ ) a celý objem zmesi (1 ml) obsahujúci ochránené modifikované ON bol predčistený pomocou gélovej chromatografie na kolónkach CentriPure N10 (emp Biotech GmbH, Berlín, Nemecko). Celý objem (1 ml) sa nechal vsiaknuť do kolónky. Následne bola do kolónky pridaná demineralizovaná voda (1,5 ml) a modifikovaná sonda bola eluovaná do vialky. Následne bola voda z roztoku sondy odparená za zníženého tlaku. K suchému rezíduu bola pridaná demineralizovaná voda (120  $\mu\text{l}$ ) a výsledný roztok (2  $\mu\text{l}$ ) bol analyzovaný pomocou HPLC. Zvyšný objem bol použitý na semipreparatívnu HPLC purifikáciu za optimalizovaných elučných podmienok (objemový pomer

ACN v mobilnej fáze). Purifikovaná sonda bola zachytená do vialky a mobilná fáza bola zo zmesi za zníženého tlaku odparená. K rezíduu bola pridaná demineralizovaná voda (120  $\mu$ l) a čistota sondy vo výslednom roztoku (2  $\mu$ l) bola analyzovaná pomocou HPLC pomocou kolóny Phenomenex Luna 5 $\mu$  Phenyl-Hexyl 150 $\times$ 3.00 mm, veľkosť častíc 5 $\mu$ m a mobilnej fázy acetonitril : trietylamónium acetát (ACN:TEAA). Teplota termostatu bola 40 °C a prietok mobilnej fázy 1 ml/min. Správna hmota sond bola overená pomocou MALDI-TOF (Obrázok 56, Obrázok 57) v spolupráci s kolegami z Generi Biotech.

## 6.3 Testovanie

### 6.3.1 Test aktivity akridínov voľne v roztoku

Na testovanie aktivity akridínových derivátov voľne v roztoku boli použité dva komplementárne 18 báz dlhé ON. Sense ON bol značený na 5'-konci 6-karboxyfluoresceínom (6-FAM), antisens ON bol značený BHQ1 na 3'-konci. Bolo pripravených niekoľko roztokov akridínov. Prvý zásobný roztok (10 mM) bol pripravený rozpustením príslušného akridínového derivátu v DMSO. Druhý zásobný roztok (0,8 mM) bol pripravený nariadením prvého zásobného roztoku do vody. Pracovné roztoky boli pripravené nariadením druhého zásobného roztoku na sedem koncentrácií akridínových derivátov (400; 100; 50; 25; 6,25; 0,64; 0,08  $\mu$ M). Pracovné roztoky akridínových derivátov (5  $\mu$ l) boli nariadené na finálnu koncentráciu akridínových derivátov (1/4 vyššie uvedených koncentrácií) pridaním do PCR pufru (15  $\mu$ l; pH 8,3; 20 mM Tris-HCl; 20 mM KCl; 5 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; C<sub>L</sub> 0,15  $\mu$ M; T<sub>L</sub> 0,30  $\mu$ M) v jamkách. Zmes bola zahrievaná pri 95 °C 1 minútu. Zmes bola ochladená na 40 °C počas 3 minút. Následne bola teplota zmesi pomaly zvyšovaná po 0,2 (prípadne 0,5) °C krokoch, kým dosiahla 80 °C. Fluorescencia bola meraná 5 s po každom zvýšení teploty o 0,2 (prípadne 0,5) °C. Výsledné hodnoty fluorescence v závislosti na teplote tvorili meltingové krivky. Tie boli porovnané s meltingovými krivkami kontroly. Porovnaním meltingových píkov boli získané hodnoty  $\Delta T_m$ . Všetky testy boli robené v triplikáte.

### 6.3.2 Na fluorescencii založená štúdia termálnej denaturácie sond značených FAM a akridínom

ON sondy značené FAM a akridínom a ON sondy značené FAM boli testované na CFX96 Touch Real-Time PCR cykléri (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). 96 jamková doštička bola použitá na zmeranie  $T_m$  (kanály pre fluorescenciu FAM,  $\lambda_{ex}$  = 450–490 nm,  $\lambda_{em}$  = 515–530 nm). Do jamiek bol pipetovaný PCR pufr obsahujúci antisense ON značené BHQ1 (15  $\mu$ l; 0,53  $\mu$ l). Pracovný roztok sond značených FAM a konjugovaných s akridínmi (5  $\mu$ l; 1,2  $\mu$ M) bol pridaný do jamiek s PCR pufrom. Výsledná koncentrácia ON sond bola 0,3  $\mu$ M a antisense ON 0,4  $\mu$ M. Obsah jamiek na doštičke bol jemným krúživým pohybom zamiešaný a následne centrifugovaný. Obsah jamiek bol zahrievaný 1 minútu pri 95 °C a následne ochladzovaný 3 minúty na 40 °C. Po dosiahnutí teploty 40 °C bol obsah jamiek postupne po krokoch (0,5 °C) zahrievaný kým teplota dosiahla 80 °C. Fluorescencia bola meraná 5 sekúnd po každom zvýšení teploty o 0,5 °C. Výsledné hodnoty fluorescence vynesené do grafu proti teplote vytvorili meltingové krivky. Tie boli porovnané s meltingovými krivkami kontrolných sond značených len FAM. Porovnaním meltingových píkov boli získané hodnoty  $\Delta T_m$ . Všetky testy boli robené v triplikáte.

### 6.3.3 Na absorpcii založená štúdia termálnej denaturácie sond značených FAM a akridínom

Modifikované sondy boli testované na Shimadzu UV-2600 spektrofotometri spojenom s Shimadzu S-1700 teplotným holderom (Shimadzu, Kyoto, Japonsko). Na meranie  $T_m$  boli použité 1400- $\mu$ l fluorescenčné quartz kyvety. Do kyviet bol pipetovaný PCR pufr (1000  $\mu$ l) obsahujúci

antisense ON značené BHQ1 a sondu značenú FAM a modifikovanú akridínom, obe o koncentrácii 1  $\mu\text{M}$ . Kyveta bola zahrievaná 3 minúty na 95 °C a následne postupne chladená po dobu 10 minút na laboratórnu teplotu. Kyveta bola vložená do teplotného holderu temperovaného 40 °C. Absorpcia pri 260 nm bola meraná po 90 sekundách stabilizácie teploty. Kyveta bola postupne po krokoch (0,5 °C) zahrievaná kým teplota dosiahla 80 °C. Absorpcia bola meraná 90 sekúnd po každom zvýšení teploty o 0,5 °C. Výsledné hodnoty absorpcie vynesené do grafu proti teplote vytvorili meltingové krivky. Prism 9 (GraphPad) software bol použitý na analýzu meltingových pík. Všetky experimenty boli robené v triplikáte.

#### 6.3.4 Na fluorescencii založená štúdia termálnej denaturácie sond modifikovaných akridínom

ON sondy modifikované akridínom (**L\_1\_2\***, **L\_7\_2\*** a **S\_1\_2\***) boli testované pomocou FLS100 spektrofluorimetru (Edinburgh Instruments, Edinburgh, UK). Na meranie  $T_m$  boli použité 1400- $\mu\text{l}$  fluorescenčné quartz kyvety. Do kyviet bol pipetovaný PCR pufr (1000  $\mu\text{l}$ ) obsahujúci antisense ON značené BHQ1 a sondu modifikovanú akridínom, obe o koncentrácii 1  $\mu\text{M}$ . Zmes bola zahrievaná 3 minúty na 95 °C a následne postupne chladená po dobu 10 minút na laboratórnu teplotu. Kyveta bola vložená do teplotného holderu temperovaného na 20 °C (pre **S** sondy) a 40 °C (pre **L** sondy). Fluorescencia ( $\lambda_{\text{ex}} = 400 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 500 \text{ nm}$ ) bola meraná po 90 sekundách stabilizácie teploty. Kyveta bola postupne po krokoch (0,5 °C) zahrievaná kým teplota dosiahla 60 °C (pre **S** sondy) a 80 °C (pre **L** sondy). Fluorescencia bola meraná 90 sekúnd po každom zvýšení teploty o 0,5 °C. Výsledné hodnoty fluorescencie vynesené do grafu proti teplote vytvorili meltingové krivky. Prism 9 (GraphPad) software bol použitý na analýzu meltingových pík. Všetky experimenty boli robené v triplikáte.

#### 6.3.5 Štúdia interakcie akridínu 2 s ssDNA a dsDNA

Na štúdium bol použitý 4-mM zásobný roztok akridínu 2 vo vode. Zásobný roztok akridínu 2 vo vode (5 $\mu\text{l}$ ) bol pridaný do reakčného pufru (995  $\mu\text{l}$ ; 10 mM Tris-HCl o pH 7,5 pri 25 °C; 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,1 mM CaCl<sub>2</sub>) aby vytvoril 20  $\mu\text{M}$  roztok akridínu 2 v kyvete. Takto pripravený roztok akridínu 2 v kyvete bol použitý na UV-Vis monitorovanú štúdiu interakcie akridínu 2 s DNA. Absorpčné spektrum v rozmedzí vlnových dĺžok 350 – 500 nm bolo merané po každom malom prídavku ssDNA alebo dsDNA (koncentrácia zásobného roztoku DNA bola 1mM) až do konečnej koncentrácie ssDNA (40  $\mu\text{M}$ ) a dsDNA (20  $\mu\text{M}$ ). Sekvencie jednotlivých ON použitých v štúdiu sú uvedené v Tabuľka 3. V prípade fluorescenčných meraní bol použitý spektrofluorimeter FLS1000 (Edinburgh Instruments) a emisné spektrum bolo merané v rozmedzí vlnových dĺžok 390-700 nm ( $\lambda_{\text{ex}} = 380 \text{ nm}$ ).

#### 6.3.6 Job's plot

Boli pripravené zásobné roztoky akridínu 2 (20  $\mu\text{M}$ ) a dsHFE, dsAT, dsGC a ssHFE (20  $\mu\text{M}$ ) v reakčnom pufri (10 mM Tris-HCl o pH 7,5 pri 25 °C, 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1 mM CaCl<sub>2</sub>). Zásobný roztok akridínu 2 a odpovedajúci zásobný roztok dsDNA alebo ssDNA boli zmiešané v kyvete v rôznych pomeroch, tak aby celkový objem zmesi bol zakaždým 1 ml. Súčasne bol zásobný roztok akridínu 2 zmiešaný s reakčným pufrom v kyvete v rovnakých pomeroch, tak aby celkový objem zmesi bol zakaždým 1 ml. Absorpčné spektrá roztokov boli zmerané v rozmedzí 350 – 500 nm. Od absorpcie zmesi akridínu 2 s dsDNA alebo ssDNA pri 417 nm bola odčítaná absorpcia zmesi akridínu 2 s reakčným pufrom pri rovnakej vlnovej dĺžke. Takto získaná zmena absorpcie bola vynesená do grafu oproti  $c_{\text{acr}} / (c_{\text{acr}} + c_{\text{DNA}})$ , kde  $c_{\text{acr}}$  je koncentrácia akridínu a  $c_{\text{DNA}}$  je koncentrácia dsDNA alebo ssDNA.



### 6.3.7 Štúdium hybridizácie sondy modifikovanej akridínom 2 (L\_7\_2\*)

Roztok L\_7\_2\* sondy (10  $\mu\text{M}$ ) bol pripravený v reakčnom pufrí vo fluorescenčnej quartzovej kyvete. Pripravený roztok bol použitý na UV-Vis a fluorescenčné monitorovanie spektrálnych zmien akridínu pri interakcií so samotnou sondou (intramolekulárna interakcia) a s duplexom (L\_7\_2\* + cieľ). K roztoku L\_7\_2\* bol postupne po malých častiach pridávaný zásobný roztok komplementárneho T<sub>L</sub> neznáčeného BHQ1 (2 mM) až do dosiahnutia konečnej koncentrácie T<sub>L</sub> 20  $\mu\text{M}$ . Absorpčné spektrá (350 – 500 nm) a fluorescenčné spektrá (420 – 650 nm,  $\lambda_{\text{ex}} = 400 \text{ nm}$ ) boli merané po každom prídavku a hybridizácii T<sub>L</sub>. Hybridizácia ON prebiehala nasledovným spôsobom: zmes bola zahrievaná 3 minúty na 95 °C a následne postupne chladená po dobu 10 minút na laboratórnu teplotu. Postup hybridizácie bol opakovaný po každom prídavku T<sub>L</sub>.

### 6.3.8 Štúdium teplotne závislých zmien emisného spektra sondy L\_7\_2\*

Teplotné mapy emisného spektra sondy L\_7\_2\* (420 – 700 nm) boli zmerané pomocou FLS1000 spektrofluorimetru (Edinburgh Instruments). Na meranie emisných spektier bola použitá 1400- $\mu\text{l}$  fluorescenčná quartzová kyveta. K roztoku L\_7\_2\* v PCR pufrí (1  $\mu\text{M}$ , 1000  $\mu\text{l}$ ) bol pridaný zásobný roztok T<sub>L</sub> (1  $\mu\text{l}$ , 1 mM). Zmes bola zahrievaná 3 minúty na 95 °C a následne postupne chladená po dobu 10 minút na laboratórnu teplotu. Kyveta bola vložená do teplotného holderu temperovaného na 40 °C a po 90 sekundovej stabilizácii teploty bolo zmerané emisné spektrum (420 – 700 nm,  $\lambda_{\text{ex}} = 400 \text{ nm}$ ). Následne bola teplota postupne po krokoch (1 °C) zvyšovaná kým nedosiahla 80 °C. Emisné spektrá boli merané 90 sekúnd po každom zvýšení teploty o 1 °C.

### 6.3.9 Meltingová analýza amplifikovaného templátu HFE génu

Real-time PCR a meltingová analýza boli urobené pomocou CFX96T cykléru (Bio-Rad) s použitím kanálu pre fluorescenciu FAM ( $\lambda_{\text{ex}} = 450 - 490 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 515 - 530 \text{ nm}$ ) v gb Basic PCR master mix s 2 mM koncentráciou  $\text{Mg}^{2+}$  v reakcii. Všetky komponenty boli zmiešané pred začiatkom PCR (forward primer (0,1  $\mu\text{M}$ ), reverse primer (0,5  $\mu\text{M}$ ), sekvencia s BHQ1 (0,2  $\mu\text{M}$ ), sonda L\_7\_2 (0,15  $\mu\text{M}$ ) a templát ( $1 \times 10^5$  kópií)). Teplotný profil PCR reakcie bol nasledovný: počiatočná denaturácia 3 minúty pri 95 °C a 50 cyklov denaturácie 10 s pri 95 °C, nasledovnej anelácie 10 s pri 60 °C a elongácie 20 s pri 72 °C. Meltingová analýza prebehla okamžite po PCR za nasledovných podmienok: 1 minúta pri 95 °C, 3 minúty pri 35 °C a zvyšovanie teploty (0,5 °C za 5 sekúnd, 35 => 80 °C) s meraním fluorescencie. Sonda a primery boli založené na kvantifikačnej analýze pre HFE gén s nasledujúcimi sekvenciami: forward primer: GGACCTGGTCTTTCCTTGTTG, reverse primer: CACATCTGGCTTGAATTCTACTGG, fluorescenčná sonda L\_7\_2: TGATCATGAGAGTCGCCG a zhášacia sekvencia značená BHQ1 na 3'-konci: ATGGATGACCAGCTGTTTCGTGTTTC. Sekvencie templátov sú uvedené na Obrázok 51. Všetky experimenty boli robené v triplicate.

## 7 Publikované vedecké práce, podané patenty, prezentácie vedeckých výsledkov

### Publikácie v impaktovaných časopisoch

#### P1

**Kostelansky, F.**; Miletin, M.; Havlinova, Z.; Szotakova, B.; Libra, A.; Kucera, R.; Novakova, V.; Zimcik, P. Thermal stabilisation of the short DNA duplexes by acridine-4-carboxamide derivatives, Thermal stabilisation of the short DNA duplexes by acridine-4-carboxamide derivatives. *Nucleic Acids Research* **2022**, 50 (18), 10212-10229. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac777>. IF<sub>2022</sub> = 19,160

*Podiel autora: syntéza, čistenie a charakterizácia akridínov, príprava a purifikácia ON sond modifikovaných akridínmi, vyhodnotenie testov (akridínov voľne v roztoku a viazaných na sondách), štúdium interakcií akridínov s DNA pomocou absorpčných a fluorescenčných titrácií, štúdium termálnej stabilizácie duplexov sond pomocou absorpčných a fluorescenčných meraní, vyhodnotenie a finalizácia dát. Príprava textu publikácie.*

#### Ďalšie publikácie:

Halaskova, M., **Kostelansky, F.**, Demuth, J., Hlbocanova, I., Miletin, M., Zimcik, P., Machacek, M., Novakova, V., Amphiphilic Cationic Phthalocyanines for Photodynamic Therapy of Cancer, Amphiphilic Cationic Phthalocyanines for Photodynamic Therapy of Cancer, *ChemPlusChem*, **2022**, 87 (9), e202200133. <https://doi.org/10.1002/cplu.202200133>. IF<sub>2022</sub> = 3,210

*Podiel autora: syntéza, čistenie a charakterizácia časti látok, absorpčné a fluorescenčné merania.*

Machacek, M., Carter K, Kostelansky, F., Miranda, D., Seffouh, A., Ortega, J., Simunek, T., Zimcik, P., Lovell, J., Binding of an amphiphilic phthalocyanine to pre-formed liposomes confers light-triggered cargo release, *J. Mater. Chem. B*, **2018**, 6, 7298-7305. <https://doi.org/10.1039/C8TB01602J>. IF<sub>2018</sub> = 5,047

*Podiel autora: syntéza, čistenie a charakterizácia časti látok. Podiel na príprave textu publikácie.*

Nawrot, D., Kolenič, M., Kuneš, J., Kostelansky, F., Miletin, M., Novakova, V., Zimcik, P. Transalkylation of alkyl aryl sulfides with alkylating agents, *Tetrahedron*, **2018**, 74, 5: 594-599. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2017.12.039>. IF<sub>2018</sub> = 2,379

*Podiel autora: syntéza, čistenie a charakterizácia časti látok.*

#### Patentové prihlášky

UNIVERZITA KARLOVA, GENERI BIOTECH s.r.o. Deriváty akridinu a antracenu jako sloučeniny interkalující se do DNA a jejich použití. Vynálezci: **Filip KOSTELANSKÝ**, Veronika NOVÁKOVÁ, Petr ZIMČÍK, Miroslav MILETÍN, Zuzana HAVLÍNOVÁ, Antonín LIBRA, Pavel FLÍDR. Česká republika. Patentový spis PV 2020-154. 19.3.2020.

UNIVERZITA KARLOVA, GENERI BIOTECH s.r.o. Deriváty akridinu a antracenu jako sloučeniny interkalující se do DNA a jejich použití. Vynálezci: **Filip KOSTELANSKÝ**, Veronika

NOVÁKOVÁ, Petr ZIMČÍK, Miroslav MILETÍN, Zuzana HAVLÍNOVÁ, Antonín LIBRA, Pavel FLÍDR.  
Česká republika. Patentový spis PV 2021-407. 03.09.2021

## **Prezentácia vedeckých výsledkov formou ústnych prezentácií a posterov**

### Ústne prezentácie

**Kostelanský, F.**, Havlínová, Z., Miletín, M., Zimčík, P., Investigation of the Compounds Influencing the Melting Temperature of Oligonucleotide Probes. 9. Postgraduální a 7. postdoktorandská konference, Hradec Králové, Česká republika, 23. - 24.1. 2019.

**Kostelanský, F.**, Havlínová, Z., Miletín, M., Zimčík, P., Preparation, HPLC Purification, and Evaluation of Modified Oligodeoxynucleotide Probes. 10. Postgraduální a postdoktorandská konference, Hradec Králové, Česká republika, 22. - 23.1. 2020.

**Kostelanský, F.**, Havlínová, Z., Miletín, M., Zimčík, P., Preparation of New Melting Temperature Modifiers. 11th Postgraduate and Postdoc Conference, Hradec Králové, Česká republika, 27. - 28.1. 2021

**Kostelanský, F.**, Havlínová, Z., Miletín, M., Zimčík, P., Synthesis of Acridine-4-Carboxamides for Thermal Stabilization of Short DNA Duplexes. Conference Synthesis and Analysis of Drugs 2021, Hradec Králové, Česká republika, 16. - 17.9. 2021.

**Kostelanský, F.**, Havlínová, Z., Miletín, M., Zimčík, P., Synthesis of New Acridine-4-Carboxamides. 12th Postgraduate and Postdoc Conference, Hradec Králové, Česká republika, 1. - 2.2. 2022.

### Postery

**Kostelanský, F.**, Havlínová, Z., Zimčík, P., Miletín, M., Increasing melting temperature of fluorescent oligonucleotide probes (4th Conference on Fluorescent Biomolecules and Their Building Blocks FB<sup>3</sup>, 30.6. – 3.7.2018, Glasgow, Spojené Království)

**Kostelanský, F.**, Havlínová, Z., Miletín, M., Zimčík, P., Investigation of the Compounds Influencing the Melting Temperature of Oligonucleotide Probes (17th Congress of the International Union of Photobiology and 18th Congress of the European Society for Photobiology, 25. 30.8.2019, Barcelona, Španělsko)

**Kostelanský, F.**, Havlínová, Z., Miletín, M., Zimčík, P., Preparation and HPLC Purification of Modified Oligonucleotide Probes (Liblice 2019; 6. – 8. 11. 2019; Špindlerův Mlýn, Česká republika)

**Kostelanský, F.**, Havlínová, Z., Miletín, M., Zimčík, P., Investigation of the Compounds Influencing the Melting Temperature of Oligonucleotide Probes (Immuno Series: Virtual & Biologics Series Virtual, 24. – 28.8.2020, Londýn, Spojené Království)

**Kostelanský, F.**, Zimčík, P., Miletín, M., Havlínová, Z., poster, Synthesis of Acridine-4-carboxamides for Thermal Stabilization of Short DNA Duplexes (Liblice 2021; 3. – 6. 11. 2021; Špindlerův Mlýn, Česká republika)

## 8 Granty, výskumné stáže a ocenenia

### 8.1 Granty

Grantová agentura Univerzity Karlovy

Číslo projektu: **994218**

Hlavný riešiteľ: Mgr. Filip Kostelanský

Názov projektu: „*Syntéza modifikátorů zvyšujících teplotu tání oligonukleotidových sond.*“

Grantová agentura České republiky

Číslo projektu: **17-19094S**

Hlavný riešiteľ: prof. PharmDr. Petr Zimčík, Ph.D.

Člen kolektívu: Mgr. Filip Kostelanský

Názov projektu: „*Azaphthalocyanines – dark quenchers in DNA hybridization probes.*“

Technologická agentura České republiky

Číslo projektu:

**TH03010251**

Hlavný riešiteľ: Ing. Zuzana Havlíková Ph.D.(Generi Biotech), doc. PharmDr. Miroslav Miletín, Ph.D. (Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy v Hradci Králové)

Člen kolektívu: Mgr. Filip Kostelanský

Názov projektu: „*IVD PROBES.*“

### 8.2 Výskumné stáže

2021 „Institute of Analytical Chemistry and Food Chemistry, Graz University of Technology,“ (Graz, Rakúsko) – Syntéza  $\pi$ -rozšírených porfyrínov.

Vedúci práce: Ass. Prof. Sergey Borisov (2 týždne)

## 9 Zoznam použitej literatúry

- (1) Erlich, H. A. *PCR technology*; Springer, 1989.
- (2) Joshi, M.; Deshpande, J. Polymerase chain reaction: methods, principles and application. *International Journal of Biomedical Research* **2010**, *2* (1), 81-97.
- (3) Navarro, E.; Serrano-Heras, G.; Castaño, M.; Solera, J. Real-time PCR detection chemistry. *Clinica chimica acta* **2015**, *439*, 231-250.
- (4) Deepak, S.; Kottapalli, K.; Rakwal, R.; Oros, G.; Rangappa, K.; Iwahashi, H.; Masuo, Y.; Agrawal, G. Real-time PCR: revolutionizing detection and expression analysis of genes. *Current genomics* **2007**, *8* (4), 234-251.
- (5) Mullis, K.; Faloona, F.; Scharf, S.; Saiki, R.; Horn, G.; Erlich, H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Biotechnology Series* **1992**, 17-17.
- (6) Kogan, S. C.; Doherty, M.; Gitschier, J. An improved method for prenatal diagnosis of genetic diseases by analysis of amplified DNA sequences. *New England Journal of Medicine* **1987**, *317* (16), 985-990.
- (7) Higuchi, R.; Dollinger, G.; Walsh, P. S.; Griffith, R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Bio/technology* **1992**, *10* (4), 413-417.
- (8) Lee, L. G.; Connell, C. R.; Bloch, W. Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes. *Nucleic acids research* **1993**, *21* (16), 3761-3766.
- (9) Holland, P. M.; Abramson, R. D.; Watson, R.; Gelfand, D. H. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3'exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1991**, *88* (16), 7276-7280.
- (10) Smith, L. M.; Fung, S.; Hunkapiller, M. W.; Hunkapiller, T. J.; Hood, L. E. The synthesis of oligonucleotides containing an aliphatic amino group at the 5' terminus: synthesis of fluorescent DNA primers for use in DNA sequence analysis. *Nucleic acids research* **1985**, *13* (7), 2399-2412.
- (11) Cardullo, R. A.; Agrawal, S.; Flores, C.; Zamecnik, P. C.; Wolf, D. E. Detection of nucleic acid hybridization by nonradiative fluorescence resonance energy transfer. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1988**, *85* (23), 8790-8794.
- (12) Nazarenko, I. A.; Bhatnagar, S.; Hohman, R. A closed tube format for amplification and detection of DNA based on energy transfer. *Nucleic acids research* **1997**, *25* (12), 2516-2521.
- (13) Whitcombe, D.; Theaker, J.; Guy, S. P.; Brown, T.; Little, S. Detection of PCR products using self-probing amplicons and fluorescence. *Nature Biotechnology* **1999**, *17* (8), 804-807. DOI: 10.1038/11751.
- (14) Tyagi, S.; Kramer, F. R. Molecular Beacons: Probes that Fluoresce upon Hybridization. *Nature Biotechnology* **1996**, *14* (3), 303-308. DOI: 10.1038/nbt0396-303.
- (15) Nazarenko, I.; Lowe, B.; Darfler, M.; Ikononi, P.; Schuster, D.; Rashtchian, A. Multiplex quantitative PCR using self-quenched primers labeled with a single fluorophore. *Nucleic acids research* **2002**, *30* (9), e37-e37.
- (16) Walter, N. G.; Burke, J. M. Real-time monitoring of hairpin ribozyme kinetics through base-specific quenching of fluorescein-labeled substrates. *Rna* **1997**, *3* (4), 392-404. From NLM.
- (17) Kandimalla, E. R.; Agrawal, S. 'Cyclicons' as hybridization-based fluorescent primer-probes: synthesis, properties and application in real-time PCR. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2000**, *8* (8), 1911-1916. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0968-0896\(00\)00136-X](https://doi.org/10.1016/S0968-0896(00)00136-X).
- (18) Lee, M.; Siddle, A.; Page, R. ResonSense®: simple linear fluorescent probes for quantitative homogeneous rapid polymerase chain reaction. *Analytica Chimica Acta* **2002**, *457* (1), 61-70.
- (19) Wittwer, C. T.; Herrmann, M. G.; Moss, A. A.; Rasmussen, R. P. Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *Biotechniques* **1997**, *22* (1), 130-138.
- (20) Heller, M. J.; Morrison, L. E. CHEMILUMINESCENT AND FLUORESCENT PROBES FOR DNA HYBRIDIZATION SYSTEMS. In *Rapid Detection and Identification of Infectious Agents*, Kingsbury, D. T., Falkow, S. Eds.; Academic Press, 1985; pp 245-256.
- (21) Bernard, P. S.; Ajioka, R. S.; Kushner, J. P.; Wittwer, C. T. Homogeneous multiplex genotyping of hemochromatosis mutations with fluorescent hybridization probes. *Am J Pathol* **1998**, *153* (4), 1055-1061. DOI: 10.1016/s0002-9440(10)65650-7 From NLM.
- (22) Bonnet, G.; xe; goire; Tyagi, S.; Libchaber, A.; Kramer, F. R. Thermodynamic Basis of the Enhanced Specificity of Structured DNA Probes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1999**, *96* (11), 6171-6176. (accessed 2022/07/04/).JSTOR.
- (23) French, D. J.; Archard, C. L.; Brown, T.; McDowell, D. G. HyBeacon™ probes: a new tool for DNA sequence detection and allele discrimination. *Molecular and Cellular Probes* **2001**, *15* (6), 363-374. DOI: <https://doi.org/10.1006/mcpr.2001.0384>.

- (24) Crockett, A. O.; Wittwer, C. T. Fluorescein-Labeled Oligonucleotides for Real-Time PCR: Using the Inherent Quenching of Deoxyguanosine Nucleotides. *Analytical Biochemistry* **2001**, *290* (1), 89-97. DOI: <https://doi.org/10.1006/abio.2000.4957>.
- (25) Edwards, K.; Logan, J. Mutation detection by Real-time PCR. *Real-time PCR: An essential guide*. Eds Edwards K, Logan J, Saunders N. *Horizon bioscience, United Kingdom* **2004**, 31-70.
- (26) Punia, P.; Cane, P.; Teo, C.-G.; Saunders, N. Quantitation of hepatitis B lamivudine resistant mutants by real-time amplification refractory mutation system PCR. *Journal of hepatology* **2004**, *40* (6), 986-992.
- (27) Li, Q.; Luan, G.; Guo, Q.; Liang, J. A new class of homogeneous nucleic acid probes based on specific displacement hybridization. *Nucleic Acids Research* **2002**, *30* (2), e5-e5. DOI: 10.1093/nar/30.2.e5 (accessed 7/6/2022).
- (28) Lee, L. G.; Livak, K.; Mullah, B.; Graham, R.; Vinayak, R.; Woudenberg, T. Seven-color, homogeneous detection of six PCR products. *Biotechniques* **1999**, *27* (2), 342-349.
- (29) Livak, K. J. Allelic discrimination using fluorogenic probes and the 5' nuclease assay. *Genetic Analysis: Biomolecular Engineering* **1999**, *14* (5), 143-149. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1050-3862\(98\)00019-9](https://doi.org/10.1016/S1050-3862(98)00019-9).
- (30) Kostrikis, L. G.; Tyagi, S.; Mhlanga, M. M.; Ho, D. D.; Kramer, F. R. Spectral Genotyping of Human Alleles. *Science* **1998**, *279* (5354), 1228-1229. DOI: doi:10.1126/science.279.5354.1228.
- (31) Mei, R.; Galipeau, P. C.; Prass, C.; Berno, A.; Ghandour, G.; Patil, N.; Wolff, R. K.; Chee, M. S.; Reid, B. J.; Lockhart, D. J. Genome-wide detection of allelic imbalance using human SNPs and high-density DNA arrays. *Genome research* **2000**, *10* (8), 1126-1137.
- (32) Wang, D. G.; Fan, J.-B.; Siao, C.-J.; Berno, A.; Young, P.; Sapolsky, R.; Ghandour, G.; Perkins, N.; Winchester, E.; Spencer, J.; et al. Large-Scale Identification, Mapping, and Genotyping of Single-Nucleotide Polymorphisms in the Human Genome. *Science* **1998**, *280* (5366), 1077-1082. DOI: doi:10.1126/science.280.5366.1077.
- (33) Buetow, K. H.; Edmonson, M.; MacDonald, R.; Clifford, R.; Yip, P.; Kelley, J.; Little, D. P.; Strausberg, R.; Koester, H.; Cantor, C. R.; et al. High-throughput development and characterization of a genomewide collection of gene-based single nucleotide polymorphism markers by chip-based matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2001**, *98* (2), 581-584. DOI: doi:10.1073/pnas.98.2.581.
- (34) Mehta, B.; Daniel, R.; Phillips, C.; McNevin, D. Forensically relevant SNaPshot® assays for human DNA SNP analysis: a review. *International Journal of Legal Medicine* **2017**, *131* (1), 21-37. DOI: 10.1007/s00414-016-1490-5.
- (35) Landegren, U.; Kaiser, R.; Sanders, J.; Hood, L. A ligase-mediated gene detection technique. *Science* **1988**, *241* (4869), 1077-1080.
- (36) Shi, C.; Zhao, C.; Guo, Q.; Ma, C. Entropy-driven molecular switch and signal amplification for homogeneous SNPs detection. *Chemical Communications* **2011**, *47* (10), 2895-2897.
- (37) Lyamichev, V.; Mast, A. L.; Hall, J. G.; Prudent, J. R.; Kaiser, M. W.; Takova, T.; Kwiatkowski, R. W.; Sander, T. J.; de Arruda, M.; Arco, D. A.; et al. Polymorphism identification and quantitative detection of genomic DNA by invasive cleavage of oligonucleotide probes. *Nature Biotechnology* **1999**, *17* (3), 292-296. DOI: 10.1038/7044.
- (38) Vologodskii, A.; Frank-Kamenetskii, M. D. DNA melting and energetics of the double helix. *Physics of Life Reviews* **2018**, *25*, 1-21. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.plrev.2017.11.012>.
- (39) Marmur, J.; Doty, P. Determination of the base composition of deoxyribonucleic acid from its thermal denaturation temperature. *Journal of molecular biology* **1962**, *5* (1), 109-118.
- (40) Ririe, K. M.; Rasmussen, R. P.; Wittwer, C. T. Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Analytical biochemistry* **1997**, *245* (2), 154-160.
- (41) Gudnason, H.; Dufva, M.; Bang, D. D.; Wolff, A. Comparison of multiple DNA dyes for real-time PCR: effects of dye concentration and sequence composition on DNA amplification and melting temperature. *Nucleic Acids Res* **2007**, *35* (19), e127. DOI: 10.1093/nar/gkm671 From NLM.
- (42) Singh, S. K.; Koshkin, A. A.; Wengel, J.; Nielsen, P. LNA (locked nucleic acids): synthesis and high-affinity nucleic acid recognition. *Chemical communications* **1998**, (4), 455-456.
- (43) CHRISTENSEN, U.; JACOBSEN, N.; RAJWANSHI, V. K.; WENGEL, J.; KOCH, T. Stopped-flow kinetics of locked nucleic acid (LNA)-oligonucleotide duplex formation: studies of LNA-DNA and DNA-DNA interactions. *Biochemical Journal* **2001**, *354* (3), 481-484.
- (44) Singer, A.; Tang, Y.-W. Artificial nucleic acid probes and their applications in clinical microbiology. In *Methods in Microbiology*, Vol. 42; Elsevier, 2015; pp 569-596.
- (45) Koshkin, A. A.; Singh, S. K.; Nielsen, P.; Rajwanshi, V. K.; Kumar, R.; Meldgaard, M.; Olsen, C. E.; Wengel, J. LNA (Locked Nucleic Acids): Synthesis of the adenine, cytosine, guanine, 5-methylcytosine, thymine and

uracil bicyclonucleoside monomers, oligomerisation, and unprecedented nucleic acid recognition. *tetrahedron* **1998**, *54* (14), 3607-3630.

(46) Obika, S.; Nanbu, D.; Hari, Y.; Andoh, J.-i.; Morio, K.-i.; Doi, T.; Imanishi, T. Stability and structural features of the duplexes containing nucleoside analogues with a fixed N-type conformation, 2'-O, 4'-C-methyleneribonucleosides. *Tetrahedron letters* **1998**, *39* (30), 5401-5404.

(47) Asari, M.; Okuda, K.; Yajima, D.; Maseda, C.; Hoshina, C.; Omura, T.; Shiono, H.; Matsubara, K.; Shimizu, K. Rapid genotyping of 25 autosomal STRs in a Japanese population using fluorescent universal primers containing locked nucleic acids. *Journal of Forensic and Legal Medicine* **2015**, *31*, 36-41. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jflm.2015.01.004>.

(48) Reynisson, E.; Josefsen, M. H.; Krause, M.; Hoorfar, J. Evaluation of probe chemistries and platforms to improve the detection limit of real-time PCR. *Journal of Microbiological Methods* **2006**, *66* (2), 206-216. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2005.11.006>.

(49) Wang, Q.; Wang, X.; Zhang, J.; Song, G. LNA real-time PCR probe quantification of hepatitis B virus DNA. *Exp Ther Med* **2012**, *3* (3), 503-508. DOI: 10.3892/etm.2011.442.

(50) Wang, L.; Yang, C. J.; Medley, C. D.; Benner, S. A.; Tan, W. Locked nucleic acid molecular beacons. *Journal of the American Chemical Society* **2005**, *127* (45), 15664-15665.

(51) Hansen, Z. R.; Knaus, B. J.; Tabima, J. F.; Press, C. M.; Judelson, H. S.; Grünwald, N. J.; Smart, C. D. SNP-Based Differentiation of *Phytophthora infestans* Clonal Lineages Using Locked Nucleic Acid Probes and High-Resolution Melt Analysis. *Plant Disease* **2016**, *100* (7), 1297-1306. DOI: 10.1094/pdis-11-15-1247-re.

(52) Morandi, L.; De Biase, D.; Visani, M.; Cesari, V.; De Maglio, G.; Pizzolitto, S.; Pession, A.; Tallini, G. Allele specific locked nucleic acid quantitative PCR (ASLNAqPCR): an accurate and cost-effective assay to diagnose and quantify KRAS and BRAF mutation. *PLoS one* **2012**, *7* (4), e36084.

(53) Alcaide, F.; Trastoy, R.; Moure, R.; González-Bardanca, M.; Ambroa, A.; López, M.; Bleriot, I.; Blasco, L.; Fernandez-García, L.; Tato, M.; et al. Multiplex Real-Time PCR-short<sub>TUB</sub> Assay for Detection of the Mycobacterium tuberculosis Complex in Smear-Negative Clinical Samples with Low Mycobacterial Loads. *Journal of Clinical Microbiology* **2019**, *57* (8), e00733-00719. DOI: doi:10.1128/JCM.00733-19.

(54) Feng, Z.-s.; Zhao, L.; Wang, J.; Qiu, F.-z.; Zhao, M.-c.; Wang, L.; Duan, S.-x.; Zhang, R.-q.; Chen, C.; Qi, J.-J.; et al. A multiplex one-tube nested real time RT-PCR assay for simultaneous detection of respiratory syncytial virus, human rhinovirus and human metapneumovirus. *Virology Journal* **2018**, *15* (1), 167. DOI: 10.1186/s12985-018-1061-0.

(55) Nielsen, P. E.; Egholm, M.; Berg, R. H.; Buchardt, O. Sequence-selective recognition of DNA by strand displacement with a thymine-substituted polyamide. *Science* **1991**, *254* (5037), 1497-1500.

(56) Braasch, D. A.; Corey, D. R. Synthesis, Analysis, Purification, and Intracellular Delivery of Peptide Nucleic Acids. *Methods* **2001**, *23* (2), 97-107. DOI: <https://doi.org/10.1006/meth.2000.1111>.

(57) Bentin, T.; Nielsen, P. E. Enhanced Peptide Nucleic Acid Binding to Supercoiled DNA: Possible Implications for DNA "Breathing" Dynamics. *Biochemistry* **1996**, *35* (27), 8863-8869. DOI: 10.1021/bi960436k.

(58) Tomac, S.; Sarkar, M.; Ratilainen, T.; Wittung, P.; Nielsen, P. E.; Nordén, B.; Gräslund, A. Ionic effects on the stability and conformation of peptide nucleic acid complexes. *Journal of the American Chemical Society* **1996**, *118* (24), 5544-5552.

(59) Ørum, H.; Nielsen, P. E.; Egholm, M.; Berg, R. H.; Buchardt, O.; Stanley, C. Single base pair mutation analysis by PNA directed PCR clamping. *Nucleic acids research* **1993**, *21* (23), 5332-5336.

(60) Ortiz, E.; Estrada, G.; Lizardi, P. M. PNA molecular beacons for rapid detection of PCR amplicons. *Molecular and Cellular Probes* **1998**, *12* (4), 219-226. DOI: <https://doi.org/10.1006/mcpr.1998.0175>.

(61) Choi, Y. J.; Kim, H. J.; Shin, H. B.; Nam, H. S.; Lee, S. H.; Park, J. S.; Park, K. S.; Baek, K. A. Evaluation of peptide nucleic acid probe-based real-time PCR for detection of Mycobacterium tuberculosis complex and nontuberculous mycobacteria in respiratory specimens. *Annals of Laboratory Medicine* **2012**, *32* (4), 257-263.

(62) Hur, D.; Kim, M. S.; Song, M.; Jung, J.; Park, H. Detection of genetic variation using dual-labeled peptide nucleic acid (PNA) probe-based melting point analysis. *Biological Procedures Online* **2015**, *17* (1), 14. DOI: 10.1186/s12575-015-0027-5.

(63) Summerton, J. E. Morpholinos and PNAs compared. *Letters in Peptide Science* **2003**, *10* (3), 215-236. DOI: 10.1007/s10989-004-4913-y.

(64) Chen, J.; Wu, J.; Hong, Y. The morpholino molecular beacon for specific RNA visualization in vivo. *Chemical Communications* **2016**, *52* (15), 3191-3194.

(65) Gao, Z.; Deng, H.; Shen, W.; Ren, Y. A Label-Free Biosensor for Electrochemical Detection of Femtomolar MicroRNAs. *Analytical Chemistry* **2013**, *85* (3), 1624-1630. DOI: 10.1021/ac302883c.

- (66) Gao, Z.; Ting, B. P. A DNA biosensor based on a morpholino oligomer coated indium-tin oxide electrode and a cationic redox polymer. *Analyst* **2009**, *134* (5), 952-957, 10.1039/B816123B. DOI: 10.1039/B816123B.
- (67) Zhang, G.-J.; Luo, Z. H. H.; Huang, M. J.; Tay, G. K. I.; Lim, E.-J. A. Morpholino-functionalized silicon nanowire biosensor for sequence-specific label-free detection of DNA. *Biosensors and Bioelectronics* **2010**, *25* (11), 2447-2453. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bios.2010.04.001>.
- (68) Mana, T.; Kundu, J.; Lahiri, H.; Bera, S.; Kolay, J.; Sinha, S.; Mukhopadhyay, R. Molecularly resolved, label-free nucleic acid sensing at solid-liquid interface using non-ionic DNA analogues. *RSC Advances* **2022**, *12* (15), 9263-9274, 10.1039/D2RA00386D. DOI: 10.1039/D2RA00386D.
- (69) Pons, B.; Kotera, M.; Zuber, G.; Behr, J.-P. Online Synthesis of Diblock Cationic Oligonucleotides for Enhanced Hybridization to their Complementary Sequence. *ChemBioChem* **2006**, *7* (8), 1173-1176. DOI: <https://doi.org/10.1002/cbic.200600178>.
- (70) Noir, R.; Kotera, M.; Pons, B.; Remy, J.-S.; Behr, J.-P. Oligonucleotide-Oligospermine Conjugates (Zip Nucleic Acids): A Convenient Means of Finely Tuning Hybridization Temperatures. *Journal of the American Chemical Society* **2008**, *130* (40), 13500-13505. DOI: 10.1021/ja804727a.
- (71) Moreau, V.; Voirin, E.; Paris, C.; Kotera, M.; Nothisen, M.; Remy, J.-S.; Behr, J.-P.; Erbacher, P.; Lenne-Samuel, N. Zip Nucleic Acids: new high affinity oligonucleotides as potent primers for PCR and reverse transcription. *Nucleic acids research* **2009**, *37* (19), e130-e130.
- (72) Paris, C.; Moreau, V.; Deglane, G.; Voirin, E.; Erbacher, P.; Lenne-Samuel, N. Zip nucleic acids are potent hydrolysis probes for quantitative PCR. *Nucleic acids research* **2010**, *38* (7), e95-e95.
- (73) Erdem, A.; Eksin, E. Impedimetric Sensing of Factor V Leiden Mutation by Zip Nucleic Acid Probe and Electrochemical Array. *Biosensors* **2020**, *10* (9), 116.
- (74) Sinyakov, A. N.; Lokhov, S. G.; Kutyavin, I. V.; Gamper, H. B.; Meyer Jr, R. B. Exceptional and selective stabilization of AT rich DNA. cntdot. DNA duplexes by N-methylpyrrole carboxamide peptides conjugated to oligodeoxynucleotides. *Journal of the American Chemical Society* **1995**, *117* (17), 4995-4996.
- (75) Lukhtanov, E. A.; Kutyavin, I. V.; Gamper, H. B.; Meyer Jr, R. B. Oligodeoxynucleotides with conjugated dihydropyrroloindole oligopeptides: Preparation and hybridization properties. *Bioconjugate chemistry* **1995**, *6* (4), 418-426.
- (76) Wiederholt, K.; Rajur, S. B.; Giuliano, J.; O'Donnel, M. J.; McLaughlin, L. W. J. J. o. t. A. C. S. DNA-tethered Hoechst groove-binding agents: Duplex stabilization and fluorescence characteristics. **1996**, *118* (30), 7055-7062.
- (77) Rahman, A.; O'Sullivan, P.; Rozas, I. Recent developments in compounds acting in the DNA minor groove. *MedChemComm* **2019**, *10* (1), 26-40.
- (78) Wiederholt, K.; Rajur, S. B.; Giuliano, J.; O'Donnel, M. J.; McLaughlin, L. W. DNA-tethered Hoechst groove-binding agents: Duplex stabilization and fluorescence characteristics. *Journal of the American Chemical Society* **1996**, *118* (30), 7055-7062.
- (79) Rajur, S. B.; Robles, J.; Wiederholt, K.; Kuimelis, R. G.; McLaughlin, L. W. Hoechst 33258 tethered by a hexa (ethylene glycol) linker to the 5' -termini of oligodeoxynucleotide 15-mers: duplex stabilization and fluorescence properties. *The Journal of Organic Chemistry* **1997**, *62* (3), 523-529.
- (80) Kutyavin, I. V.; Afonina, I. A.; Mills, A.; Gorn, V. V.; Lukhtanov, E. A.; Belousov, E. S.; Singer, M. J.; Walburger, D. K.; Lokhov, S. G.; Gall, A. A. 3'-minor groove binder-DNA probes increase sequence specificity at PCR extension temperatures. *Nucleic acids research* **2000**, *28* (2), 655-661.
- (81) Belousov, Y. S.; Welch, R. A.; Sanders, S.; Mills, A.; Kulchenko, A.; Dempcy, R.; Afonina, I. A.; Walburger, D. K.; Glaser, C. L.; Yadavalli, S. Single nucleotide polymorphism genotyping by two colour melting curve analysis using the MGB Eclipse™ Probe System in challenging sequence environment. *Human genomics* **2004**, *1* (3), 1-9.
- (82) Lukhtanov, E. A.; Lokhov, S. G.; Gorn, V. V.; Podyminogin, M. A.; Mahoney, W. Novel DNA probes with low background and high hybridization-triggered fluorescence. *Nucleic Acids Research* **2007**, *35* (5), e30-e30. DOI: 10.1093/nar/gkl1136 (accessed 9/10/2020).
- (83) Sharma, V.; Gupta, M.; Kumar, P.; Sharma, A. A Comprehensive Review on Fused Heterocyclic as DNA intercalators: Promising Anticancer Agents. *Current Pharmaceutical Design* **2020**.
- (114) Asseline, U.; Bonfils, E.; Dupret, D.; Thuong, N. T. Synthesis and binding properties of oligonucleotides covalently linked to an acridine derivative: new study of the influence of the dye attachment site. *Bioconjugate chemistry* **1996**, *7* (3), 369-379.
- (115) Fukui, K.; Morimoto, M.; Segawa, H.; Tanaka, K.; Shimidzu, T. Synthesis and properties of an oligonucleotide modified with an acridine derivative at the artificial abasic site. *Bioconjugate chemistry* **1996**, *7* (3), 349-355.



- (116) Lacoste, J.; François, J.-C.; Hélène, C. Triple helix formation with purine-rich phosphorothioate-containing oligonucleotides covalently linked to an acridine derivative. *Nucleic acids research* **1997**, *25* (10), 1991-1998.
- (117) Klysik, J.; Kinsey, B. M.; Hua, P.; Glass, G. A.; Orson, F. M. A 15-Base Acridine-Conjugated Oligodeoxynucleotide Forms Triplex DNA with Its IL-2R $\alpha$  Promoter Target with Greatly Improved Avidity. *Bioconjugate chemistry* **1997**, *8* (3), 318-326.
- (118) Orson, F. M.; Kinsey, B. M.; McShan, W. M. Linkage structures strongly influence the binding cooperativity of DNA intercalators conjugated to triplex forming oligonucleotides. *Nucleic acids research* **1994**, *22* (3), 479-484.
- (119) Yamana, K.; Mitsui, T.; Yoshioka, J.; Isuno, T.; Nakano, H. Incorporation of two anthraquinonylmethyl groups into the 2'-O-positions of oligonucleotides: increased affinity and sequence specificity of anthraquinone-modified oligonucleotides in hybrid formation with DNA and RNA. *Bioconjugate chemistry* **1996**, *7* (6), 715-720.
- (120) Patra, A.; Richert, C. High fidelity base pairing at the 3'-terminus. *Journal of the American Chemical Society* **2009**, *131* (35), 12671-12681.
- (121) Mori, K.; Subasinghe, C.; Cohen, J. S. Oligodeoxynucleotide analogs with 5'-linked anthraquinone. *FEBS letters* **1989**, *249* (2), 213-218.
- (122) Bouquin, N.; Malinovskii, V. L.; Häner, R. Anthraquinones as artificial DNA building blocks. Wiley Online Library: 2008.
- (123) Haner, R.; Keller, T. H. Synthesis and hybridization properties of oligonucleotides containing 2'-O-modified ribonucleotides. *Nucleic acids research* **1993**, *21* (19), 4499-4505.
- (124) May, J. P.; Brown, L. J.; van Delft, I.; Thelwell, N.; Harley, K.; Brown, T. Synthesis and evaluation of a new non-fluorescent quencher in fluorogenic oligonucleotide probes for real-time PCR. *Organic & biomolecular chemistry* **2005**, *3* (14), 2534-2542.
- (125) Zhao, Z.; Peng, G.; Michels, J.; Fox, K. R.; Brown, T. Synthesis of anthraquinone oligonucleotides for triplex stabilization. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids* **2007**, *26* (8-9), 921-925.
- (126) Sidstedt, M.; Rådström, P.; Hedman, J. PCR inhibition in qPCR, dPCR and MPS—mechanisms and solutions. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2020**, *412* (9), 2009-2023. DOI: 10.1007/s00216-020-02490-2.
- (127) Dragan, A.; Pavlovic, R.; McGivney, J.; Casas-Finet, J.; Bishop, E.; Strouse, R.; Schenerman, M.; Geddes, C. SYBR Green I: fluorescence properties and interaction with DNA. *Journal of fluorescence* **2012**, *22* (4), 1189-1199.
- (128) Giglio, S.; Monis, P. T.; Saint, C. P. Demonstration of preferential binding of SYBR Green I to specific DNA fragments in real-time multiplex PCR. *Nucleic acids research* **2003**, *31* (22), e136-e136.
- (129) Mao, F.; Leung, W.-Y.; Xin, X. Characterization of EvaGreen and the implication of its physicochemical properties for qPCR applications. *BMC biotechnology* **2007**, *7* (1), 1-16.
- (130) Klimkowski, P.; De Ornellas, S.; Singleton, D.; El-Sagheer, A. H.; Brown, T. Design of thiazole orange oligonucleotide probes for detection of DNA and RNA by fluorescence and duplex melting. *Organic & Biomolecular Chemistry* **2019**, *17* (24), 5943-5950, 10.1039/C9OB00885C. DOI: 10.1039/C9OB00885C.
- (131) Anderson, B. A.; Onley, J. J.; Hrdlicka, P. J. Recognition of double-stranded DNA using energetically activated duplexes modified with N2'-pyrene-, perylene-, or coronene-functionalized 2'-N-methyl-2'-amino-DNA monomers. *The Journal of organic chemistry* **2015**, *80* (11), 5395-5406.
- (132) Karmakar, S.; Madsen, A. S.; Guenther, D. C.; Gibbons, B. C.; Hrdlicka, P. J. Recognition of double-stranded DNA using energetically activated duplexes with interstrand zippers of 1-, 2- or 4-pyrenyl-functionalized O2'-alkylated RNA monomers. *Organic & Biomolecular Chemistry* **2014**, *12* (39), 7758-7773, 10.1039/C4OB01183J. DOI: 10.1039/C4OB01183J.
- (133) Osman, A. M.; Pedersen, E. B. Conjugation of N-(3-(9-Ethynyl-6H-indolo [2, 3-b] quinoxalin-6-yl) propyl)-2, 2, 2-trifluoroacetamide Intercalator to a Triplex Forming Oligonucleotide, a Three-Way Junction, and a G-Quadruplex. *European Journal of Organic Chemistry* **2019**, *2019* (27), 4362-4371.
- (134) Michelson, A.; Todd, A. R. Nucleotides part XXXII. Synthesis of a dithymidine dinucleotide containing a 3': 5'-internucleotidic linkage. *Journal of the Chemical Society (Resumed)* **1955**, 2632-2638.
- (135) Letsinger, R. L.; Mahadevan, V. Oligonucleotide synthesis on a polymer support1, 2. *Journal of the American Chemical Society* **1965**, *87* (15), 3526-3527.
- (136) Letsinger, R. L.; Ogilvie, K. K. Convenient method for stepwise synthesis of oligothymidylate derivatives in large-scale quantities. *Journal of the American Chemical Society* **1967**, *89* (18), 4801-4803.
- (137) Letsinger, R. L.; Ogilvie, K. K. Nucleotide chemistry. XIII. Synthesis of oligothymidylates via phosphotriester intermediates. *Journal of the American Chemical Society* **1969**, *91* (12), 3350-3355.

- (138) Eckstein, F.; Rizk, I. Oligonucleotide syntheses by means of 2, 2, 2-trichloroethyl phosphorodichoridate. *Angewandte Chemie (International ed. in English)* **1967**, *6* (11), 949.
- (139) Eckstein, F.; Rizk, I. Synthesis of oligonucleotides by use of phosphoric triesters. *Angewandte Chemie (International ed. in English)* **1967**, *6* (8), 695-697.
- (140) Reese, C.; Saffhill, R. Oligonucleotide synthesis via phosphotriester intermediates: The phenyl-protecting group. *Chemical Communications (London)* **1968**, (13), 767-768.
- (141) Letsinger, R. L.; Lunsford, W. B. Synthesis of thymidine oligonucleotides by phosphite triester intermediates. *Journal of the American Chemical Society* **1976**, *98* (12), 3655-3661.
- (142) Beaucage, S.; Caruthers, M. Deoxynucleoside phosphoramidites—a new class of key intermediates for deoxypolynucleotide synthesis. *Tetrahedron letters* **1981**, *22* (20), 1859-1862.
- (143) Adams, S. P.; Kavka, K. S.; Wykes, E. J.; Holder, S. B.; Galluppi, G. R. Hindered dialkylamino nucleoside phosphite reagents in the synthesis of two DNA 51-mers. *Journal of the American Chemical Society* **1983**, *105* (3), 661-663.
- (144) McBride, L.; Caruthers, M. An investigation of several deoxynucleoside phosphoramidites useful for synthesizing deoxyoligonucleotides. *Tetrahedron letters* **1983**, *24* (3), 245-248.
- (145) Sinha, N.; Biernat, J.; Köster, H.  $\beta$ -Cyanoethyl N, N-dialkylamino/N-morpholinomono-chloro phosphoamidites, new phosphitylating agents facilitating ease of deprotection and work-up of synthesized oligonucleotides. *Tetrahedron letters* **1983**, *24* (52), 5843-5846.
- (146) Hogrefe, R. I.; Midthune, B.; Lebedev, A. Current Challenges in Nucleic Acid Synthesis. *Israel Journal of Chemistry* **2013**, *53* (6-7), 326-349. DOI: <https://doi.org/10.1002/ijch.201300032>.
- (147) Corby, N.; Kenner, G.; Todd, A. 704. Nucleotides. Part XVI. Ribonucleoside-5' phosphites. A new method for the preparation of mixed secondary phosphites. *Journal of the Chemical Society (Resumed)* **1952**, 3669-3675.
- (148) Froehler, B.; Matteucci, M. Nucleoside H-phosphonates: valuable intermediates in the synthesis of deoxyoligonucleotides. *Tetrahedron letters* **1986**, *27* (4), 469-472.
- (149) Froehler, B. C.; Ng, P. G.; Matteucci, M. D. Synthesis of DNA via deoxynucleoside H-phosphonate intermediates. *Nucleic Acids Research* **1986**, *14* (13), 5399-5407.
- (150) Froehler, B. C. Oligodeoxynucleotide synthesis. In *Protocols for oligonucleotides and Analogs*, Springer, 1993; pp 63-80.
- (151) Reese, C. B.; Song, Q. A new approach to the synthesis of oligonucleotides and their phosphorothioate analogues in solution. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **1997**, *7* (21), 2787-2792.
- (152) Reese, C. The H-phosphonate approach to the synthesis of oligonucleotides and their phosphorothioate analogues in solution. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1* **1999**, (11), 1477-1486.
- (153) Reese, C. B.; Yan, H. Solution phase synthesis of ISIS 2922 (Vitravene) by the modified H-phosphonate approach. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1* **2002**, (23), 2619-2633.
- (154) Sato, K.; Imai, H.; Shuto, T.; Hara, R. I.; Wada, T. Solid-Phase Synthesis of Phosphate/Boranophosphate Chimeric DNAs Using the H-Phosphonate–H-Boranophosphonate Method. *The Journal of Organic Chemistry* **2019**, *84* (23), 15032-15041.
- (155) Takahashi, Y.; Sato, K.; Wada, T. Solid-Phase Synthesis of Boranophosphate/Phosphorothioate/Phosphate Chimeric Oligonucleotides and Their Potential as Antisense Oligonucleotides. *The Journal of Organic Chemistry* **2021**.
- (156) Hall, R.; Todd, A.; Webb, R. 644. Nucleotides. Part XLI. Mixed anhydrides as intermediates in the synthesis of dinucleoside phosphates. *Journal of the Chemical Society (Resumed)* **1957**, 3291-3296.
- (157) Beaucage, S. L.; Iyer, R. P. Advances in the synthesis of oligonucleotides by the phosphoramidite approach. *Tetrahedron* **1992**, *48* (12), 2223-2311.
- (158) Reddy, M.; Hanna, N. B.; Farooqui, F. Ultrafast cleavage and deprotection of oligonucleotides synthesis and use of CAc derivatives. *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids* **1997**, *16* (7-9), 1589-1598.
- (159) Mullah, B.; Andrus, A. Automated synthesis of double dye-labeled oligonucleotides using tetramethylrhodamine (TAMRA) solid supports. *Tetrahedron Letters* **1997**, *38* (33), 5751-5754.
- (160) Gillet, L. C.; Alzeer, J.; Schärer, O. D. Site-specific incorporation of N-(deoxyguanosin-8-yl)-2-acetylaminofluorene (dG-AAF) into oligonucleotides using modified 'ultra-mild' DNA synthesis. *Nucleic acids research* **2005**, *33* (6), 1961-1969.
- (161) Bologna, J.-C.; Imbach, J.-L.; Morvan, F. A mild method for fluorescein labeling of base-sensitive oligonucleotides on solid support. *Tetrahedron Letters* **2000**, *41* (38), 7317-7321. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(00\)01227-2](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(00)01227-2).

- (162) Viladkar, S. Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry analysis of fluorophore-labeled oligonucleotides using ferulic acid. *Journal of Mass Spectrometry* **2001**, *36* (8), 973-974. DOI: <https://doi.org/10.1002/jms.183>.
- (163) Noble, J. E.; Wang, L.; Cole, K. D.; Gaigalas, A. K. The effect of overhanging nucleotides on fluorescence properties of hybridising oligonucleotides labelled with Alexa-488 and FAM fluorophores. *Biophysical chemistry* **2005**, *113* (3), 255-263.
- (164) Daniel, S. G.; Westling, M. E.; Moss, M. S.; Kanagy, B. D. FastTag™ Nucleic Acid Labeling System: A Versatile Method for Incorporating Haptens, Fluorochromes and Affinity Ligands into DNA, RNA and Oligonucleotides. *Biotechniques* **1998**, *24* (3), 484-489.
- (165) Aubert, Y.; Bourgerie, S.; Meunier, L.; Mayer, R.; Roche, A.-C.; Monsigny, M.; Thuong, N. T.; Asseline, U. Optimized synthesis of phosphorothioate oligodeoxyribonucleotides substituted with a 5'-protected thiol function and a 3'-amino group. *Nucleic Acids Research* **2000**, *28* (3), 818-825. DOI: 10.1093/nar/28.3.818 (accessed 9/22/2022).
- (166) Skrzypczynski, Z.; Wayland, S. New reagents for the introduction of reactive functional groups into chemically synthesized DNA probes. *Bioconjugate chemistry* **2003**, *14* (3), 642-652.
- (167) Wang, C. C.-Y.; Seo, T. S.; Li, Z.; Ruparel, H.; Ju, J. Site-specific fluorescent labeling of DNA using Staudinger ligation. *Bioconjugate chemistry* **2003**, *14* (3), 697-701.
- (168) Salo, H.; Virta, P.; Hakala, H.; Prakash, T. P.; Kawasaki, A. M.; Manoharan, M.; Lönnberg, H. Aminoxy functionalized oligonucleotides: preparation, on-support derivatization, and postsynthetic attachment to polymer support. *Bioconjugate chemistry* **1999**, *10* (5), 815-823.
- (169) Defrancq, E.; Lhomme, J. Use of an aminoxy linker for the functionalization of oligodeoxyribonucleotides. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2001**, *11* (7), 931-933. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0960-894X\(01\)00108-1](https://doi.org/10.1016/S0960-894X(01)00108-1).
- (170) Zatsepin, T. S.; Stetsenko, D. A.; Gait, M. J.; Oretskaya, T. S. Synthesis of DNA conjugates by solid-phase fragment condensation via aldehyde-nucleophile coupling. *Tetrahedron letters* **2005**, *46* (18), 3191-3195.
- (171) Proudnikov, D.; Mirzabekov, A. Chemical Methods of DNA and RNA Fluorescent Labeling. *Nucleic Acids Research* **1996**, *24* (22), 4535-4542. DOI: 10.1093/nar/24.22.4535 (accessed 9/22/2022).
- (172) Hill, K. W.; Taunton-Rigby, J.; Carter, J. D.; Kropp, E.; Vagle, K.; Pieken, W.; McGee, D. P. C.; Husar, G. M.; Leuck, M.; Anziano, D. J.; et al. Diels-Alder Bioconjugation of Diene-Modified Oligonucleotides. *The Journal of Organic Chemistry* **2001**, *66* (16), 5352-5358. DOI: 10.1021/jo0100190.
- (173) Omumi, A.; Beach, D. G.; Baker, M.; Gabryelski, W.; Manderville, R. A. Postsynthetic Guanine Arylation of DNA by Suzuki-Miyaura Cross-Coupling. *Journal of the American Chemical Society* **2011**, *133* (1), 42-50. DOI: 10.1021/ja106158b.
- (174) Rist, M.; Amann, N.; Wagenknecht, H.-A. Preparation of 1-Ethynylpyrene-Modified DNA via Sonogashira-Type Solid-Phase Couplings and Characterization of the Fluorescence Properties for Electron-Transfer Studies. *European Journal of Organic Chemistry* **2003**, *2003* (13), 2498-2504. DOI: <https://doi.org/10.1002/ejoc.200300125>.
- (175) Kottysch, T.; Ahlborn, C.; Brotzel, F.; Richert, C. Stabilizing or Destabilizing Oligodeoxynucleotide Duplexes Containing Single 2'-Deoxyuridine Residues with 5-Alkynyl Substituents. *Chemistry – A European Journal* **2004**, *10* (16), 4017-4028. DOI: <https://doi.org/10.1002/chem.200306044>.
- (176) Filichev, V. V.; Pedersen, E. B. Stable and Selective Formation of Hoogsteen-Type Triplexes and Duplexes Using Twisted Intercalating Nucleic Acids (TINA) Prepared via Postsynthetic Sonogashira Solid-Phase Coupling Reactions. *Journal of the American Chemical Society* **2005**, *127* (42), 14849-14858. DOI: 10.1021/ja053645d.
- (177) Seo, T. S.; Li, Z.; Ruparel, H.; Ju, J. Click Chemistry to Construct Fluorescent Oligonucleotides for DNA Sequencing. *The Journal of Organic Chemistry* **2003**, *68* (2), 609-612. DOI: 10.1021/jo026615r.
- (178) Gierlich, J.; Burley, G. A.; Gramlich, P. M. E.; Hammond, D. M.; Carell, T. Click Chemistry as a Reliable Method for the High-Density Postsynthetic Functionalization of Alkyne-Modified DNA. *Organic Letters* **2006**, *8* (17), 3639-3642. DOI: 10.1021/ol0610946.
- (179) Gramlich, P. M. E.; Warncke, S.; Gierlich, J.; Carell, T. Click-Click-Click: Single to Triple Modification of DNA. *Angewandte Chemie International Edition* **2008**, *47* (18), 3442-3444. DOI: <https://doi.org/10.1002/anie.200705664>.
- (180) Berndl, S.; Herzig, N.; Kele, P.; Lachmann, D.; Li, X.; Wolfbeis, O. S.; Wagenknecht, H.-A. Comparison of a nucleosidic vs non-nucleosidic postsynthetic "click" modification of DNA with base-labile fluorescent probes. *Bioconjugate chemistry* **2009**, *20* (3), 558-564.
- (181) Honcharenko, D.; Druceikaite, K.; Honcharenko, M.; Bollmark, M.; Tedebark, U.; Strömberg, R. New Alkyne and Amine Linkers for Versatile Multiple Conjugation of Oligonucleotides. *ACS Omega* **2021**, *6* (1), 579-593. DOI: 10.1021/acsomega.0c05075.

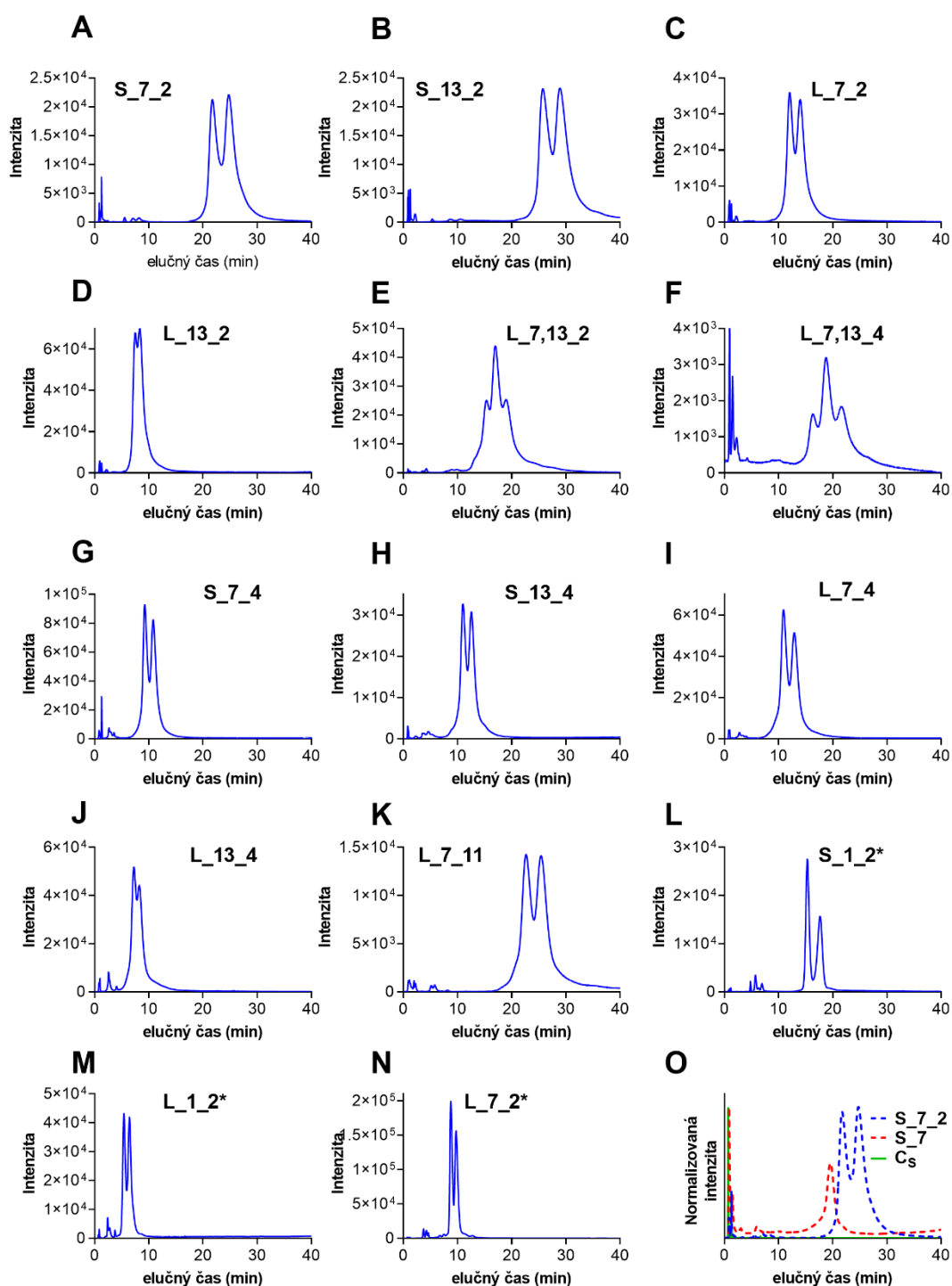
- (182) Bohländer, P. R.; Abba, M. L.; Bestvater, F.; Allgayer, H.; Wagenknecht, H.-A. Two wavelength-shifting molecular beacons for simultaneous and selective imaging of vesicular miRNA-21 and miRNA-31 in living cancer cells. *Organic & Biomolecular Chemistry* **2016**, *14* (22), 5001-5006, 10.1039/C6OB00691D. DOI: 10.1039/C6OB00691D.
- (183) Jezowska, M.; Honcharenko, D.; Ghidini, A.; Strömberg, R.; Honcharenko, M. Enabling Multiple Conjugation to Oligonucleotides Using “Click Cycles”. *Bioconjugate Chemistry* **2016**, *27* (11), 2620-2628. DOI: 10.1021/acs.bioconjchem.6b00380.
- (184) Fantoni, N. Z.; El-Sagheer, A. H.; Brown, T. A Hitchhiker’s Guide to Click-Chemistry with Nucleic Acids. *Chemical Reviews* **2021**, *121* (12), 7122-7154. DOI: 10.1021/acs.chemrev.0c00928.
- (185) Demuth, J.; Kantor, M.; Kucera, R.; Miletin, M.; Novakova, V. Comparison of Quenching Efficiencies in Long Triple-Labeled and Double-Labeled TaqMan *Bioconjugate Chemistry* **2022**, *33* (5), 788-794. DOI: 10.1021/acs.bioconjchem.2c00023.
- (186) Wiener, J.; Kokotek, D.; Rosowski, S.; Lickert, H.; Meier, M. Preparation of single- and double-oligonucleotide antibody conjugates and their application for protein analytics. *Scientific Reports* **2020**, *10* (1), 1457. DOI: 10.1038/s41598-020-58238-6.
- (187) Ling, X.; Xie, B.; Gao, X.; Chang, L.; Zheng, W.; Chen, H.; Huang, Y.; Tan, L.; Li, M.; Liu, T. Improving the efficiency of precise genome editing with site-specific Cas9-oligonucleotide conjugates. *Science Advances* **2020**, *6* (15), eaaz0051. DOI: doi:10.1126/sciadv.aaz0051.
- (188) Michael, A.; Auf, U. D. E. V. D. Acetylendicarbonsäuremethylester. *J. prakt. Chem* **1893**, *48*, 94-95.
- (189) Tornøe, C. W.; Christensen, C.; Meldal, M. Peptidotriazoles on Solid Phase: [1,2,3]-Triazoles by Regiospecific Copper(I)-Catalyzed 1,3-Dipolar Cycloadditions of Terminal Alkynes to Azides. *The Journal of Organic Chemistry* **2002**, *67* (9), 3057-3064. DOI: 10.1021/jo011148j.
- (190) Rostovtsev, V. V.; Green, L. G.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B. A Stepwise Huisgen Cycloaddition Process: Copper(I)-Catalyzed Regioselective “Ligation” of Azides and Terminal Alkynes. *Angewandte Chemie International Edition* **2002**, *41* (14), 2596-2599. DOI: [https://doi.org/10.1002/1521-3773\(20020715\)41:14<2596::AID-ANIE2596>3.0.CO;2-4](https://doi.org/10.1002/1521-3773(20020715)41:14<2596::AID-ANIE2596>3.0.CO;2-4).
- (191) NobelPrize.org. *The Nobel Prize in Chemistry 2022*. NobelPrize.org, 2022. <https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/2022/press-release/> (accessed 30.11.2022).
- (192) Chan, T. R.; Hilgraf, R.; Sharpless, K. B.; Fokin, V. V. Polytriazoles as Copper(I)-Stabilizing Ligands in Catalysis. *Organic Letters* **2004**, *6* (17), 2853-2855. DOI: 10.1021/ol0493094.
- (193) Meldal, M.; Tornøe, C. W. Cu-Catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition. *Chemical Reviews* **2008**, *108* (8), 2952-3015. DOI: 10.1021/cr0783479.
- (194) Gerowska, M.; Hall, L.; Richardson, J.; Shelbourne, M.; Brown, T. Efficient reverse click labeling of azide oligonucleotides with multiple alkynyl Cy-Dyes applied to the synthesis of HyBeacon probes for genetic analysis. *Tetrahedron* **2012**, *68* (3), 857-864. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tet.2011.11.041>.
- (195) Astakhova, I. K.; Wengel, J. Interfacing Click Chemistry with Automated Oligonucleotide Synthesis for the Preparation of Fluorescent DNA Probes Containing Internal Xanthene and Cyanine Dyes. *Chemistry – A European Journal* **2013**, *19* (3), 1112-1122. DOI: <https://doi.org/10.1002/chem.201202621>.
- (196) Pourceau, G.; Meyer, A.; Vasseur, J.-J.; Morvan, F. Synthesis of Mannose and Galactose Oligonucleotide Conjugates by Bi-click chemistry. *The Journal of Organic Chemistry* **2009**, *74* (3), 1218-1222. DOI: 10.1021/jo802536q.
- (197) Mansawat, W.; Boonlua, C.; Siriwong, K.; Vilaivan, T. Clicked polycyclic aromatic hydrocarbon as a hybridization-responsive fluorescent artificial nucleobase in pyrrolidinyl peptide nucleic acids. *Tetrahedron* **2012**, *68* (21), 3988-3995. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tet.2012.03.062>.
- (198) Liu, P. Y.; Jiang, N.; Zhang, J.; Wei, X.; Lin, H. H.; Yu, X. Q. The oxidative damage of plasmid DNA by ascorbic acid derivatives in vitro: the first research on the relationship between the structure of ascorbic acid and the oxidative damage of plasmid DNA. *Chemistry & biodiversity* **2006**, *3* (9), 958-966.
- (199) Knorre, D. G.; Fedorova, O. S.; Frolova, E. I. Oxidative degradation of nucleic acids. *Russian Chemical Reviews* **1993**, *62* (1), 65.
- (200) Himo, F.; Lovell, T.; Hilgraf, R.; Rostovtsev, V. V.; Noodleman, L.; Sharpless, K. B.; Fokin, V. V. Copper(I)-Catalyzed Synthesis of Azoles. DFT Study Predicts Unprecedented Reactivity and Intermediates. *Journal of the American Chemical Society* **2005**, *127* (1), 210-216. DOI: 10.1021/ja0471525.
- (201) Agard, N. J.; Prescher, J. A.; Bertozzi, C. R. A strain-promoted [3+ 2] azide-alkyne cycloaddition for covalent modification of biomolecules in living systems. *Journal of the American Chemical Society* **2004**, *126* (46), 15046-15047.

- (202) van Berkel, S. S.; Dirks, A. J.; Meeuwissen, S. A.; Pinggen, D. L.; Boerman, O. C.; Laverman, P.; van Delft, F. L.; Cornelissen, J. J.; Rutjes, F. P. Application of Metal-Free Triazole Formation in the Synthesis of Cyclic RGD–DTPA Conjugates. *ChemBioChem* **2008**, *9* (11), 1805-1815.
- (203) Devaraj, N. K.; Weissleder, R.; Hilderbrand, S. A. Tetrazine-Based Cycloadditions: Application to Pretargeted Live Cell Imaging. *Bioconjugate Chemistry* **2008**, *19* (12), 2297-2299. DOI: 10.1021/bc8004446.
- (204) Song, W.; Wang, Y.; Qu, J.; Lin, Q. Selective Functionalization of a Genetically Encoded Alkene-Containing Protein via “Photoclick Chemistry” in Bacterial Cells. *Journal of the American Chemical Society* **2008**, *130* (30), 9654-9655. DOI: 10.1021/ja803598e.
- (205) Dommerholt, J.; Rutjes, F. P. J. T.; van Delft, F. L. Strain-Promoted 1,3-Dipolar Cycloaddition of Cycloalkynes and Organic Azides. *Topics in Current Chemistry* **2016**, *374* (2), 16. DOI: 10.1007/s41061-016-0016-4.
- (206) Garcia-Hartjes, J.; Dommerholt, J.; Wennekes, T.; van Delft, F. L.; Zuilhof, H. Electronic Effects versus Distortion Energies During Strain-Promoted Alkyne-Azide Cycloadditions: A Theoretical Tool to Predict Reaction Kinetics. *European Journal of Organic Chemistry* **2013**, *2013* (18), 3712-3720. DOI: <https://doi.org/10.1002/ejoc.201201627>.
- (207) Zimmerman, E. S.; Heibeck, T. H.; Gill, A.; Li, X.; Murray, C. J.; Madlansacay, M. R.; Tran, C.; Uter, N. T.; Yin, G.; Rivers, P. J. Production of site-specific antibody–drug conjugates using optimized non-natural amino acids in a cell-free expression system. *Bioconjugate chemistry* **2014**, *25* (2), 351-361.
- (208) Dommerholt, J.; Van Rooijen, O.; Borrmann, A.; Guerra, C. F.; Bickelhaupt, F. M.; Van Delft, F. L. Highly accelerated inverse electron-demand cycloaddition of electron-deficient azides with aliphatic cyclooctynes. *Nature Communications* **2014**, *5* (1), 1-7.
- (209) Fan, W.; Qi, Y.; Qiu, L.; He, P.; Liu, C.; Li, Z. Click Chemical Ligation-Initiated On-Bead DNA Polymerization for the Sensitive Flow Cytometric Detection of 3'-Terminal 2'-O-Methylated Plant MicroRNA. *Analytical Chemistry* **2018**, *90* (8), 5390-5397. DOI: 10.1021/acs.analchem.8b00589.
- (210) Gong, H.; Holcomb, I.; Ooi, A.; Wang, X.; Majonis, D.; Unger, M. A.; Ramakrishnan, R. Simple Method To Prepare Oligonucleotide-Conjugated Antibodies and Its Application in Multiplex Protein Detection in Single Cells. *Bioconjugate Chemistry* **2016**, *27* (1), 217-225. DOI: 10.1021/acs.bioconjchem.5b00613.
- (211) Jin, J.; Baker, E. G.; Wood, C. W.; Bath, J.; Woolfson, D. N.; Turberfield, A. J. Peptide assembly directed and quantified using megadalton DNA nanostructures. *ACS nano* **2019**, *13* (9), 9927-9935.
- (212) Huggins, I. J.; Medina, C. A.; Springer, A. D.; van den Berg, A.; Jadhav, S.; Cui, X.; Dowdy, S. F. Site Selective Antibody-Oligonucleotide Conjugation via Microbial Transglutaminase. *Molecules* **2019**, *24* (18), 3287.
- (213) Abendroth, F.; Seitz, O. Double-Clicking Peptides onto Phosphorothioate Oligonucleotides: Combining Two Proapoptotic Agents in One Molecule. *Angewandte Chemie* **2014**, *126* (39), 10672-10677.
- (214) Kushnarova-Vakal, A.; Äärelä, A.; Huovinen, T.; Virta, P.; Lamminmäki, U. Site-specific linking of an oligonucleotide to mono- and bivalent recombinant antibodies with SpyCatcher-SpyTag system for immuno-PCR. *ACS omega* **2020**, *5* (38), 24927-24934.
- (215) Dovgan, I.; Ursuegui, S.; Erb, S.; Michel, C.; Kolodych, S.; Cianféroni, S.; Wagner, A. Acyl Fluorides: Fast, Efficient, and Versatile Lysine-Based Protein Conjugation via Plug-and-Play Strategy. *Bioconjugate Chemistry* **2017**, *28* (5), 1452-1457. DOI: 10.1021/acs.bioconjchem.7b00141.
- (216) Ren, X.; Gerowska, M.; El-Sagheer, A. H.; Brown, T. Enzymatic incorporation and fluorescent labelling of cyclooctyne-modified deoxyuridine triphosphates in DNA. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2014**, *22* (16), 4384-4390. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2014.05.050>.
- (217) Melnychuk, N.; Klymchenko, A. S. DNA-Functionalized Dye-Loaded Polymeric Nanoparticles: Ultrabright FRET Platform for Amplified Detection of Nucleic Acids. *Journal of the American Chemical Society* **2018**, *140* (34), 10856-10865. DOI: 10.1021/jacs.8b05840.
- (218) Mendez-Gonzalez, D.; Laurenti, M.; Latorre, A.; Somoza, A.; Vazquez, A.; Negro, A. I.; López-Cabarcos, E.; Calderón, O. G.; Melle, S.; Rubio-Retama, J. Oligonucleotide Sensor Based on Selective Capture of Upconversion Nanoparticles Triggered by Target-Induced DNA Interstrand Ligand Reaction. *ACS Applied Materials & Interfaces* **2017**, *9* (14), 12272-12281. DOI: 10.1021/acsami.7b00575.
- (219) Sola, L.; Damin, F.; Gagni, P.; Consonni, R.; Chiari, M. Synthesis of clickable coating polymers by postpolymerization modification: Applications in microarray technology. *Langmuir* **2016**, *32* (40), 10284-10295.
- (220) Fan, J.; Yang, W. Electrochemical DNA/aptamer biosensors based on SPAAC for detection of DNA and protein. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2022**, *353*, 131100. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.snb.2021.131100>.

- (221) Grabowska, I.; Zborowska, M.; Nguyen, N. T.; Dehaen, W.; Stulz, E.; Wood, J. W.; Radecka, H.; Radecki, J. Deposition of Ni (II) porphyrin monolayer on the gold electrode via azide-alkyne click-coupling and its electrochemical characterization. *Int. J. Electrochem. Sci* **2014**, *9* (11), 5948.
- (222) Ranishenka, B.; Ulashchik, E.; Radchanka, A.; Shmanai, V.; Artemyev, M. Electrostatic Repulsion Controls Efficiency of Cu-Free Click-Reaction with Azide-Modified Semiconductor Quantum Dots. *ChemNanoMat* **2020**, *6* (2), 292-297. DOI: <https://doi.org/10.1002/cnma.201900609>.
- (223) Marks, I. S.; Kang, J. S.; Jones, B. T.; Landmark, K. J.; Cleland, A. J.; Taton, T. A. Strain-Promoted "Click" Chemistry for Terminal Labeling of DNA. *Bioconjugate Chemistry* **2011**, *22* (7), 1259-1263. DOI: 10.1021/bc1003668.
- (224) Terzic, V.; Pousse, G.; Méallet-Renault, R.; Grellier, P.; Dubois, J. Dibenzocyclooctynes: Effect of Aryl Substitution on Their Reactivity toward Strain-Promoted Alkyne-Azide Cycloaddition. *The Journal of Organic Chemistry* **2019**, *84* (13), 8542-8551. DOI: 10.1021/acs.joc.9b00895.

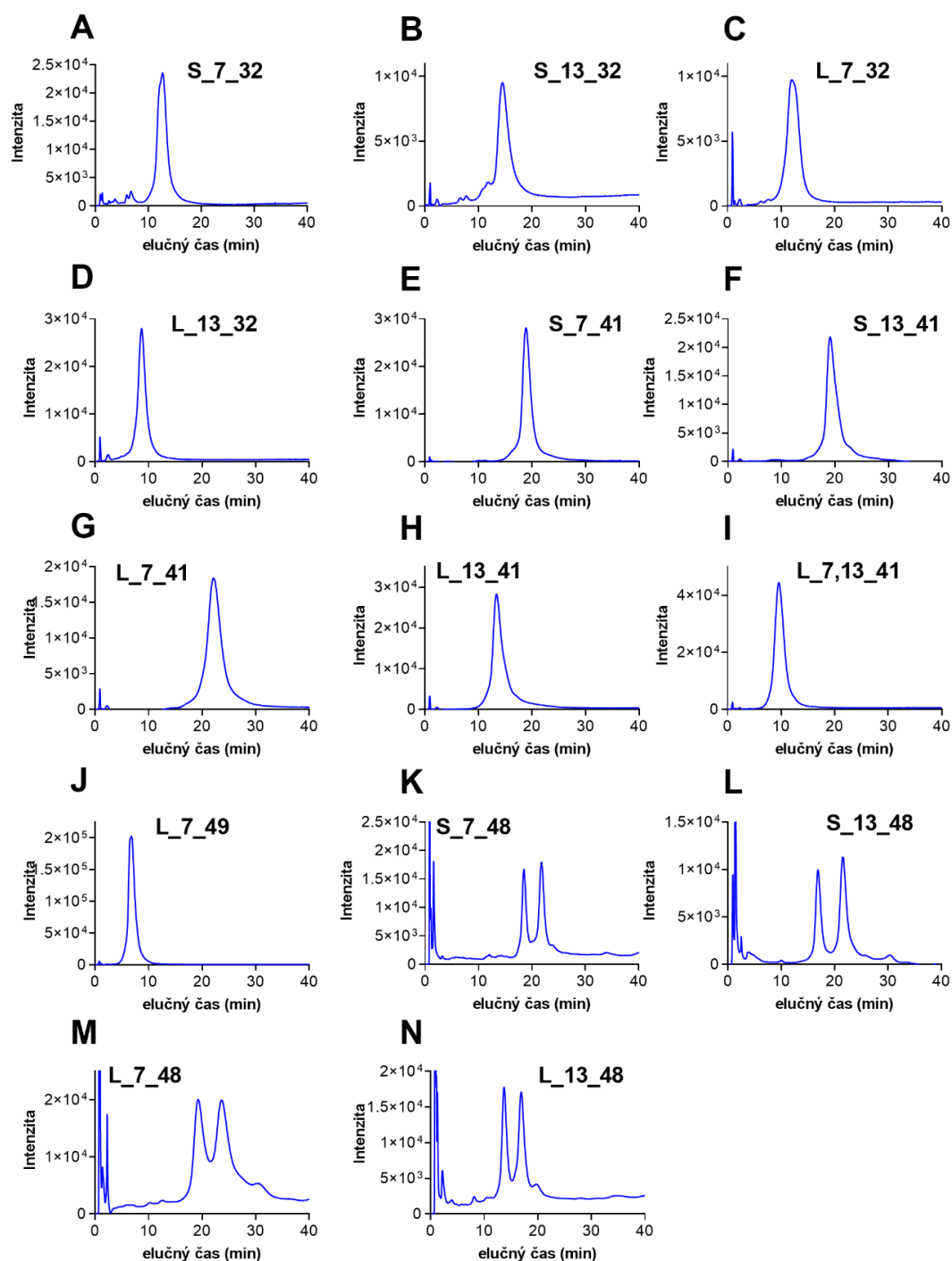
# 10 Zoznam príloh

## 10.1 Príloha 1



Obrázok 54 HPLC chromatogramy modifikovaných sond (merané pri  $\lambda = 260$  nm) a) S\_7\_2, b) S\_13\_2, c) L\_7\_2, d) L\_13\_2, e) L\_7,13\_2, f) L\_7,13\_4, g) S\_7\_4, h) S\_13\_4, i) L\_7\_4, j) L\_13\_4, k) L\_7\_11, l) S\_1\_2\*, m) L\_1\_2\*, n) L\_7\_2\* o) porovnanie sondy S\_7\_2 (modrá prerušovaná čiara), nemodifikovanej sondy S\_7 (obsahujúcej nemodifikované DBCO, červená prerušovaná čiara), a kontrolnej sondy Cs (značenej len FAM, zelená plná čiara). HPLC analýza bola robená pomocou Phenomenex Luna 5u Phenyl-Hexyl (150x3,0 mm; veľkosť častíc 5  $\mu$ m) kolóny za použitia izokratickej elúcie s ACN a 50 mmol trietylamónium acetátovým pufrom (TEAA) s prietokom 1 ml/min a teplotou 40°C. Na analýzu boli použité nasledujúce pomery TEAA:ACN: 1. TEAA:ACN 83:17 (l, n); 2. TEAA:ACN 82:18 (a, b, c, d, i, j, k, m, o); 3. TEAA:ACN 81:19 (g, h); 4. TEAA:ACN 78:22 (e, f).

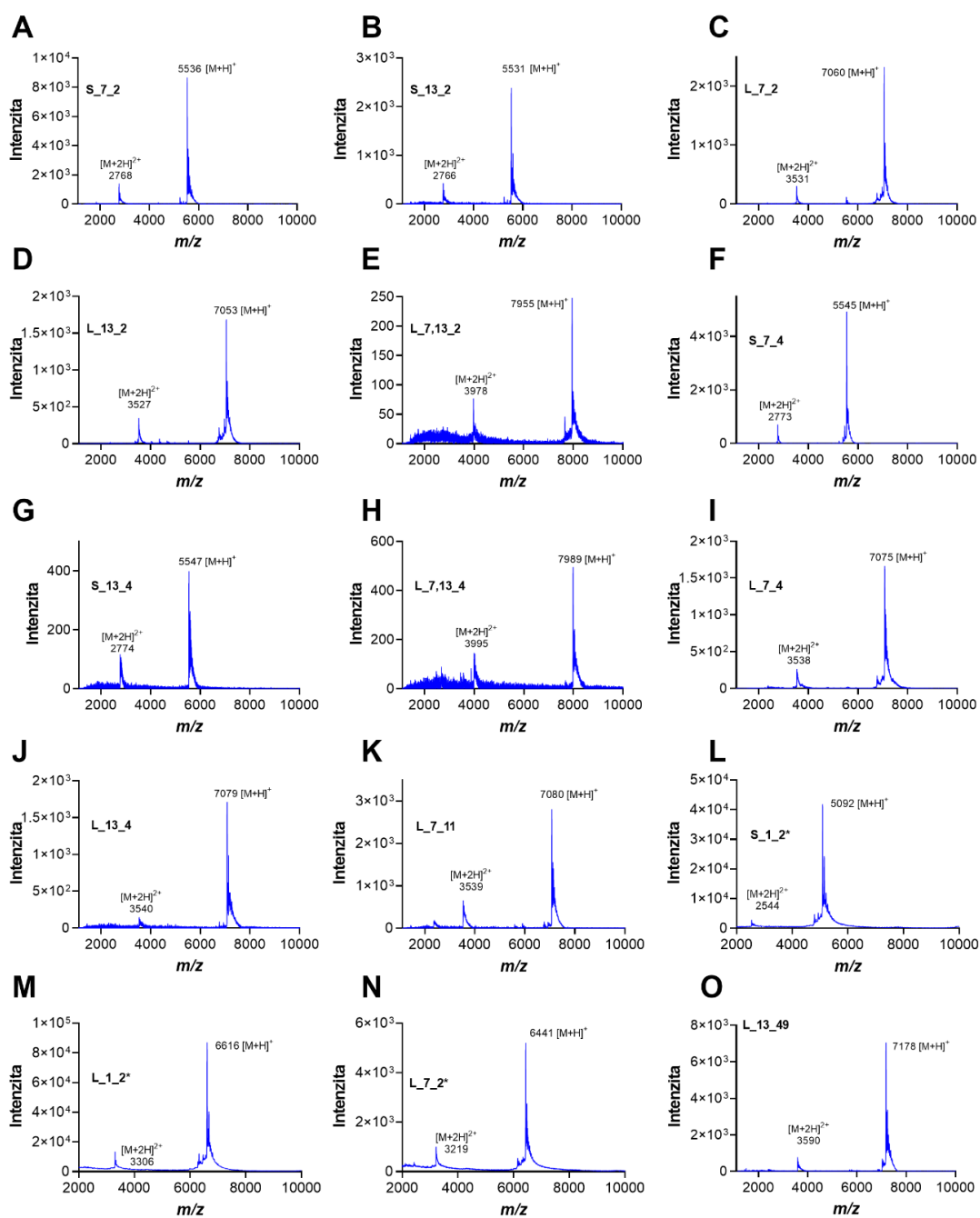
## 10.2 Príloha 2



Obrázok 55 HPLC chromatogramy modifikovaných sond (merané pri  $\lambda = 260$  nm) a) **S\_7\_32**, b) **S\_13\_32**, c) **L\_7\_32**, d) **L\_13\_32**, e) **S\_7\_41**, f) **S\_13\_41**, g) **L\_7\_41**, h) **L\_13\_41**, i) **L\_7,13\_41**, j) **L\_7\_48**, k) **S\_7\_48**, l) **S\_13\_48**, m) **L\_7\_48**, n) **L\_13\_48**. HPLC analýza bola robená pomocou Phenomenex Luna 5u Phenyl-Hexyl (150×3,0 mm; veľkosť častíc 5  $\mu$ m) kolóny za použitia izokratickej elúcie s ACN a 50 mmol trietylamónium acetátovým pufrom (TEAA) s prietokom 1 ml/min a teplotou 40°C. Na analýzu boli použité nasledujúce pomery TEAA:ACN: 1. TEAA:ACN 83:17 (l, n); 2. TEAA:ACN 82:18 (a, b, c, d, i, j, k, m, o); 3. TEAA:ACN 81:19 (g, h); 4. TEAA:ACN 78:22 (e, f).

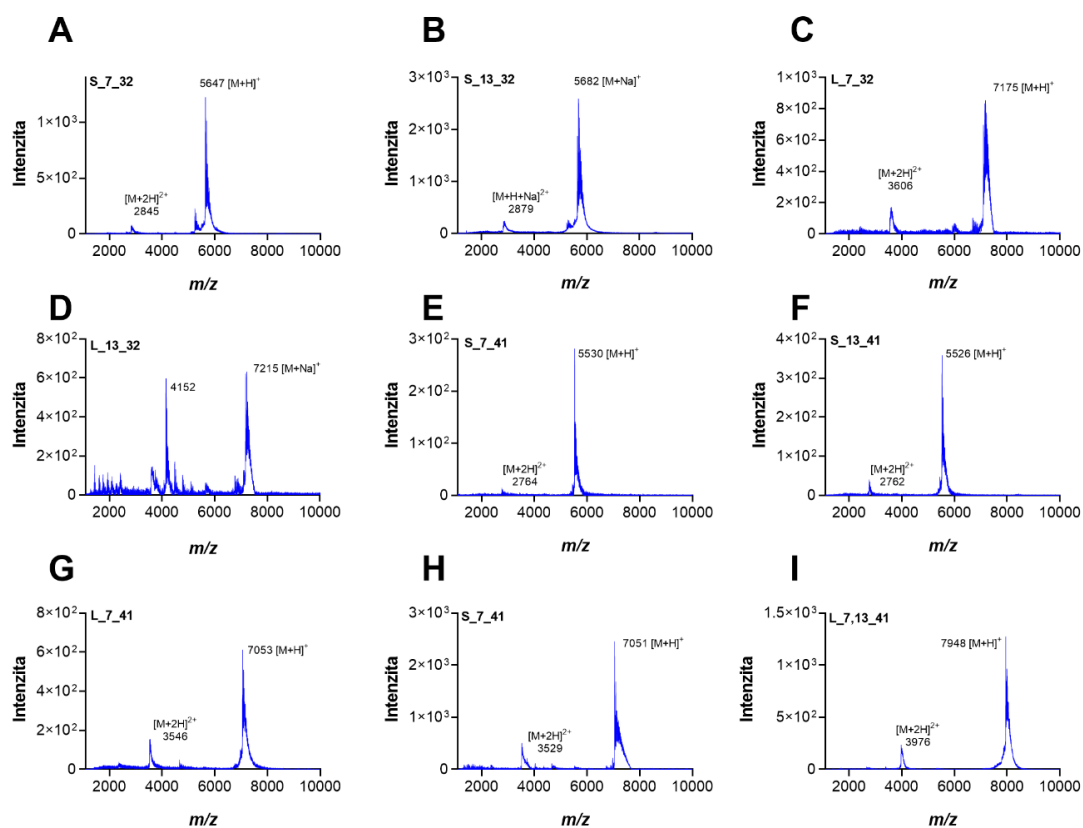


### 10.3 Príloha 3



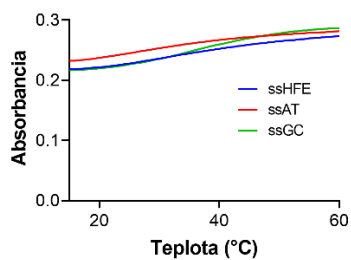
Obrázky 56 MALDI MS spektra sond.

## 10.4 Príloha 4



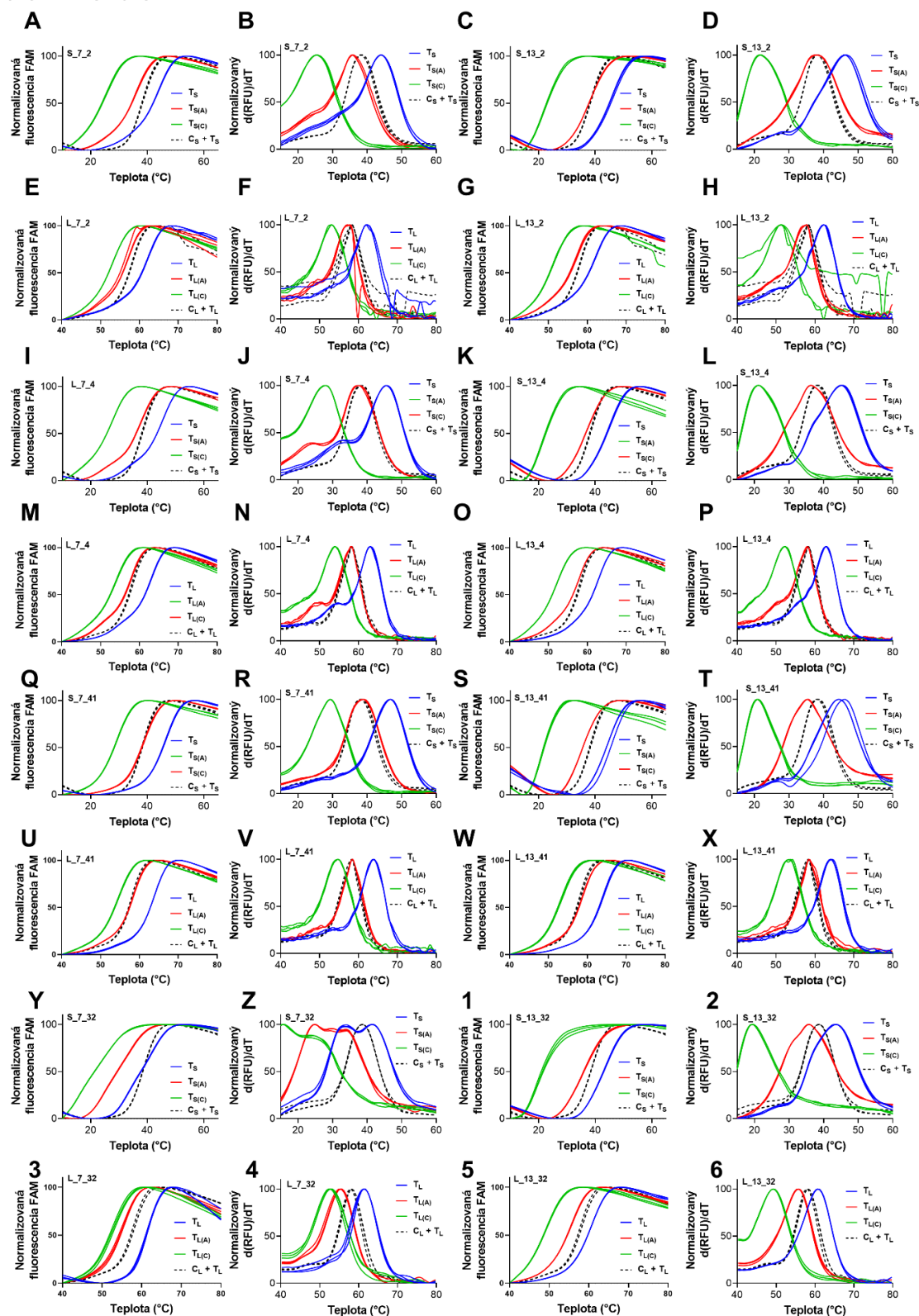
Obrázok 57 MALDI-MS spektrá sond. Sodíkové adukty u (B) S\_13\_32 a (D) L\_13\_32

## 10.5 Príloha 5



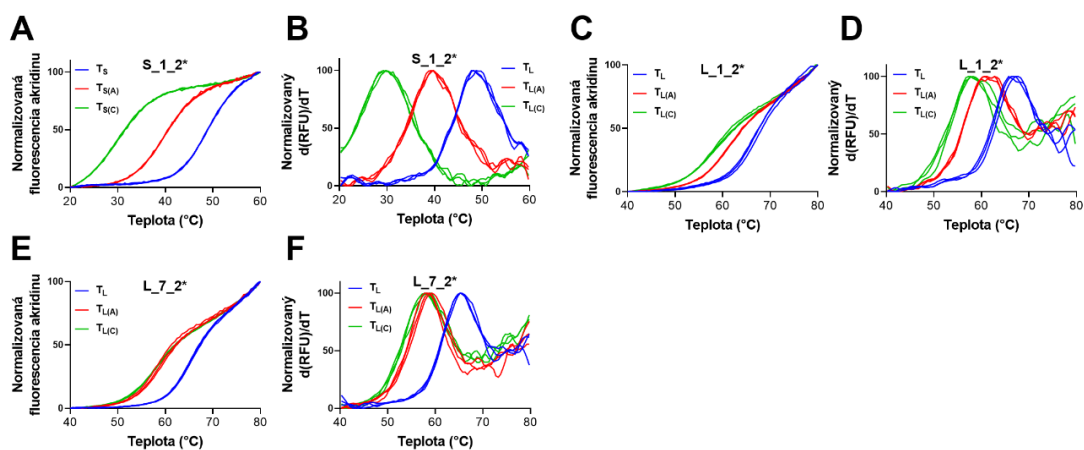
Obrázok 58 Na absorpcii založená meltingová analýza ssDNAs. ssHFE sekvencia (modrá čiara), ssAT sekvencia (červená čiara), ssGC sekvencia (zelená čiara).

## 10.6 Príloha 6



Obrázok 59 Normalizované meltingové krivky a meltingové píky duplexov sond modifikovaných akridínmi 2, 4, 31 a 41 s plne komplementárnymi sekvenciami  $T_{S/L}$  (modrá), so sekvenciami  $T_{S(A)/L(A)}$  variantu S65C A>T (červená), so sekvenciami  $T_{S(C)/L(C)}$  variantu H63D C>G (zelená) a duplexov  $C_S+T_S$  a  $C_L+T_L$  (prerušovaná čierna)

## 10.7 Príloha 7



Obrázok 60. Normalizované meltingové krivky a meltingové píky duplexov sond S<sub>1\_2</sub>\*, L<sub>1\_2</sub>\*, L<sub>7\_2</sub>\* s plne komplementárnymi sekvenciami T<sub>S/L</sub> (modrá), so sekvenciami T<sub>S(A)/L(A)</sub> variantu S65C A>T (červená), so sekvenciami T<sub>S(C)/L(C)</sub> variantu H63D C>G (zelená).