

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

KATEDRA ANORGANICKÉ CHEMIE

Studijní obor: Chemie



BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Deriváty triazacyklononanu s thiazolovou postranní skupinou pro ukotvení do
polymerních nosičů

Triazacyclononane derivatives bearing thiazole side group for anchoring to
polymeric materials

Robert Willimetz

Vedoucí práce/Školitel:
Doc. RNDr. Jan Kotek, PhD.

Praha, 2020

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, dne 14.6.2020

Robert Willimetz

Abstrakt

S rozvíjející se rezistencí bakterií na antibiotika je nutné hledat jiné způsoby léčby a předcházení bakteriálních infekcí. Bakterie přichycené na povrchu medicínských implantátů mohou tvořit tzv. biofilm, který je zodpovědný za potenciální rozvinutí infekce, která může způsobit zdravotní komplikace. Cílem této práce bylo připravit ligand schopný komplexace hydrolyticky aktivních iontů kovů, které by byly schopny štěpit nukleové kyseliny bakterií. Zvoleným ligandem byl derivát 1,4,7-triazacyklonanu obsahující připojenou thiazolovou kotvu sloužící k zabudování výsledného komplexu do polymerních nosičů. Těmito antibakteriálními polymerními látkami by bylo možné potahovat povrchy implantátů a předcházet tak rozvíjení infekcí.

Klíčová slova

1,4,7-Triazacyklononan; Umělé nukleázy; Biofilm; Thiazolová kotva; Hydrolýza fosfoesterové vazby

Abstract

With the growing resistance of bacteria to antibiotics, it is crucial to search for other ways to treat and prevent bacterial infections. Bacteria attached to the surface of medical implants can form a so-called biofilm, which is able to potentially cause the infection and subsequent health issues. The aim of this thesis was to prepare ligand capable of complexation of hydrolytically active metal ions, which would be able to cleave nucleic acids of bacteria. The selected ligand was 1,4,7-triazacyclononane derivative linked to thiazole side group for anchoring to polymeric materials. With these antibacterial polymeric substances it would be possible to coat the surfaces of the implants and therefore prevent developing of infections.

Keywords

1,4,7-Triazacyclononane; Artificial nucleases; Biofilm; Thiazole anchor; Hydrolysis of the phosphoester bond

Poděkování

V první řadě bych rád poděkoval své rodině a přítelkyni Páje za velkou podporu a motivaci, které se mi dostávalo celé moje dosavadní studium.

Dále můj velký dík patří celému kolektivu naší laboratoře za skvělou atmosféru, ve které je radost pracovat. Jmenovitě pak hlavně Filipovi, Míše a Kubovi. Bez jejich pomoci, naměřených spekter, konzultací a podpory by tato práce nevznikla. Mému školiteli Honzovi Kotkovi děkuju za přátelský a vstřícný přístup, za jeho rady a za trpělivost, kterou se mnou měl.

Paní doktorce Císařové děkuji za RTG strukturu a Ondrovi za změřené hmotníky.

Obsah

1. Teoretický úvod	7
1.1 Implantáty v moderní medicíně.....	7
1.1.1 Rizika spojená se zaváděním implantátů.....	7
1.1.2 Současná léčba a předcházení biofilmových infekcí.....	9
1.2 Nukleové kyseliny a jejich štěpení.....	9
1.2.1 Mechanismus hydrolyzy fosfoesterové vazby.....	10
1.2.2 Používané ionty kovů schopné hydrolyzovat nukleové kyseliny.....	12
1.2.3 Důvody výzkumu umělých nukleáz.....	13
1.2.4 Modelové substráty pro štěpení nukleových kyselin.....	13
1.3 Ligandy.....	14
1.3.1 Makrocyclické ligandy.....	15
1.3.2 Cu(II) komplexy makrocyclických ligandů.....	16
1.4 Thiazolová kotva.....	17
1.5 Cíl práce.....	19
2. Experimentální část	20
2.1 Seznam použitých chemikálií.....	20
2.2 Metody charakterizace.....	20
2.2.1 NMR spektroskopie.....	20
2.2.2 Tenkovrstvá chromatografie – TLC.....	20
2.2.3 Hmotnostní spektrometrie.....	20
2.2.4 UV–VIS spektroskopie.....	20
2.2.5 RTG difrakce.....	21
2.3 Syntetická část.....	21
2.3.1 Příprava 1-benzyl-1,4,7-triazacyklonanu (3).....	23
2.3.2 Příprava 1-benzyl-4,7-dimethyl-1,4,7-triazacyklonanu (4).....	24
2.3.3 Příprava 1,4-dimethyl-1,4,7-triazacyklonanonu (5).....	24
2.3.4 Příprava 1-(3-ftalimidopropyl)- 4,7-dimethyl-triazacyklonanonu (7).....	25
2.3.5 Příprava 1-(3-aminopropyl)-4,7-dimethyl-1,4,7-triazacyklonanonu (8).....	26
2.3.6 Příprava ligandu L1.....	27
2.3.7 Příprava <i>N</i> -(3-brompropyl)ftalimidu (6).....	29
2.3.8 Příprava kyseliny brompyrohroznové (BrP).....	29
2.3.9 Příprava thioformamidu (TF).....	30
2.3.10 Příprava 4-thiazolkarboxylové kyseliny (ThK).....	30

2.3.11 Příprava 4-thiazolkarbonyl chloridu (9).....	31
2.3.12 Příprava tris(4-nitrofenol)fosfátu (TNFF).....	32
2.3.13 Příprava bis(4-nitrofenol)fosfátu (BNFF).....	32
2.3.14 Příprava komplexu [Cu ²⁺ (L1)].....	33
3. Diskuze a výsledky	34
3.1 Příprava 4-thiazolkarboxylové kyseliny (ThK) a reakce jejího chloridu (9).....	34
3.2 Příprava 1-benzyl-1,4,7-triazacyclonanu (3).....	36
3.3 Příprava 1-benzyl-4,7-dimethyl-1,4,7-triazacyclonanu (4)	36
3.4 Příprava 1,4-dimethyl-1,4,7-triazacyclononanu (5).....	37
3.5 Příprava <i>N</i> -(3-brompropyl)ftalimidu (6).....	37
3.6 Příprava 4,7-dimethyl-1-(3-ftalimidopropyl)-triazacyclononanu (7).....	38
3.7 Příprava 1-(3-aminopropyl)-4,7-dimethyl-1,4,7-triazacyclononanu (8)	38
3.8 Příprava ligandu L1	39
3.9 Příprava BNFF.....	39
3.10 Měření absorpčního spektra komplexu [Cu ²⁺ (L1)]	39
3.11 Měření kinetiky hydrolýzy BNFF	40
4. Závěr.....	43
5. Seznam použitých zkratk	44
6. Seznam použité literatury	45

1. Teoretický úvod

1.1 Implantáty v moderní medicíně

Implantáty jsou zařízení či předměty vyrobené ze syntetického materiálu pro medicínské účely. Ať už se jedná o zubní implantáty, náhrady kloubů či kanyly, společným znakem všech implantátů je styk s lidskou tkání. Mohou být použity na náhradu lidských tkání, lze jejich pomocí do těla vpravovat léky a jiné látky, mohou regulovat a monitorovat tělesné funkce a zlepšovat kvalitu života.

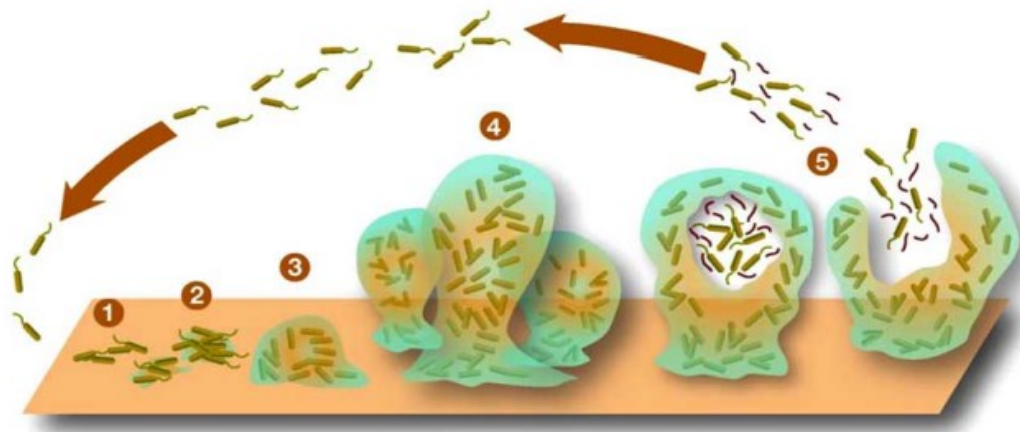
Pro potřebu vpravování léčiv a tekutin do krevního oběhu se využívají intravenózní kanyly. Jedná se o malé flexibilní trubičky, které jsou zavedeny do žíly pacienta. Zavedením látek do krevního oběhu lze docílit jejich rychlého účinku a vysoké biodostupnosti. Z tohoto důvodu je jejich praktické použití v medicíně velmi rozsáhlé. Dalšími implantáty využívanými například k podávání tekutin, léčiv nebo plynů, jsou katetry. Tyto úzké trubičky jsou vkládány do tělních dutin a je možné je použít i jako drenáž. Udává se, že katetry má zavedeno více než 30 % hospitalizovaných pacientů^[1].

Rozmach ve vývoji moderních implantátů na jedno použití nastal v 50. letech 20. století. V této poválečné době docházelo k vývoji nových materiálů a metod pro zpracování plastů a jejich sterilizaci. Bylo tedy možné vyrábět plastové předměty pro medicínské využití o definovaných rozměrech metodou extruze, která spočívala ve vytlačování roztaveného materiálu skrze formu a v jeho následném ochlazení. Sterilizace ethylenoxidem za nízké teploty, tzv. proces EtO, snižovala riziko infekce po aplikaci těchto implantátů do těl pacientů. Mezi první moderní jednorázové prostředky patřily katetry z PVC. V následujících letech docházelo k optimalizaci používaných materiálů. Velký vliv měl vynález Teflonu, který byl svými vlastnostmi svého času revoluční. Teflonové kanyly bylo možné díky nepřilnavému povrchu a flexibilitě jednoduše zavést, což zlepšovalo komfort pacienta^[2].

1.1.1 Rizika spojená se zaváděním implantátů

Zavádění implantátu je invazivní zásah, při kterém dochází k narušení epitelálních a mukózních bariér, následkem čehož může dojít k rozvinutí infekce^[1]. Rozhraní pevné a kapalné fáze (krev) je ideálním rozhraním pro množení mikroorganismů na povrchu implantátu^[3]. Množící se bakterie vytvářejí vrstvu biofilmu. Biofilm je shluk buněk nevratně připojených na povrch materiálu, který je uzavřen v matrix tvořené především

polysacharidy, které samy produkují^[4]. Matrix rovněž obsahuje nukleové kyseliny, proteiny a lipidy. Společně pak tyto extracelulární polymerní látky vytvářejí třídimenzionální mechanicky odolnou síť, ve které jsou buňky v blízkém kontaktu, díky kterému mezi nimi může probíhat komunikace^[5]. Vývoj biofilmu je znázorněn na *Obr. 1*.



Obr. 1: Vývoj biofilmu – 1) přichycení bakterií na povrch, 2) bakteriální buňky vylučují polymerní látky a jejich přichycení na povrch se stává nevratným, 3) začíná se objevovat třídimenzionální struktura, 4) stadium zralosti, 5) „disperzní“ stádium, ve kterém dochází k uvolňování a šíření buněk otevíráním kanálků (obrázek převzatý z literatury^[6])

Ve veřejném prohlášení U.S. National Institutes of Health bylo sděleno, že biofilmy jsou zodpovědné za více než 80 % mikrobiálních onemocnění v lidském těle^[7]. Mechanismus vzniku onemocnění spojeného s přítomností v biofilmu vázaných organismů není dostatečně popsán. Navrhovaný mechanismus zahrnuje i) oddělení buněk z biofilmu do krevního řečiště nebo do močových cest, ii) produkci endotoxinů, iii) rezistenci na imunitní systém hostitele, a iv) poskytnutí prostoru pro množení nové generace rezistentních organismů v důsledku výměny plazmidů^[4].

Problémem je, že bakterie v biofilmu jsou odolné vůči imunitní odpovědi hostitele a vůči antibiotické léčbě. Bylo pozorováno, že pro biofilmy stejných organismů se efektivita určitého antibiotika projevovala až při 100 až 1000 větší koncentraci, než byla zapotřebí u volných planktonických bakterií^[8]. Z tohoto důvodu je standardní antibiotická léčba tohoto typu infekce zpravidla neúčinná^[9]. Mechanismus rezistence bakteriálních biofilmů není přesně znám^[10]. Bylo ukázáno, že na rozdíl od povrchu biofilmu může být koncentrace kyslíku v jeho centru nízká^[11]. To by mohlo mít za následek vznik anaerobních podmínek ve spodních vrstvách biofilmu. Podobný trend vykazuje aktivita v růstu, syntéze proteinů

a metabolické aktivitě buněk. To bývá jedním z vysvětlení důvodů antibiotické rezistence^[12]. Dalším vysvětlením je role matrix biofilmu coby difúzní bariéry pro antibiotická léčiva^[13].

1.1.2 Současná léčba a předcházení biofilmových infekcí

S pokrokem medicíny se využívá stále více implantovaných zařízení. V důsledku toho jsou i infekce způsobené přítomností biofilmu více časté^[14]. V současné době existuje několik strategií, jak biofilm kontrolovat. Patří mezi ně i) předcházení kontaminace implantátu, ii) penetrace matrix biofilmu a zabití asociovaných buněk a iii) odstranění implantátu^[4].

V praxi začíná léčba těchto infekcí odstraněním implantátu, který bývá nahrazen novým, a následnou antibiotickou léčbou. Nový potenciální přístup spočívá například v použití slabých organických kyselin, jako je kyselina octová, která je schopna difundovat skrz buněčnou membránu, a poté disociovat a snižovat cytoplazmické pH, což může vést k narušení metabolické aktivity bakteriálních buněk. Zatím však nebyl proveden výzkum, který by testoval toleranci lidského organismu na slabé organické kyseliny a zároveň jejich efektivitu^[15].

Další ochrana před biofilmovými infekcemi spočívá v úpravě povrchů implantátů vedoucí ke snížení adheze bakterií. Příkladem může být povrch upravený oxidem titaničitým nebo potažený polymerní látkou, která je schopna nosit antibakteriální látky. V praxi se také používá potahování stříbrem (v atomární/nanočásticové formě), jehož dezinfekční účinky jsou dlouho známé^[16]. Kromě stříbra vykazuje antimikrobiální účinky řada dalších kovů a jejich komplexů, které jsou schopny štěpit extracelulární DNA produkovanou buňkami při tvorbě biofilmu^[17–19]. Za tímto účelem se také stále častěji používají komplexy obsahující měď^[20]. Extracelulární DNA zvyšuje adhezi bakterií k povrchu, zvyšuje agregaci buněk a propojuje je s dalšími komponenty matrix^[21]. Štěpením této složky matrix lze rozložit již vzniklý biofilm či zabránit jeho vzniku^[22]. Syntézou komplexů s vlastnostmi enzymů schopných štěpit nukleové kyseliny lze potenciálně přecházet rozvinutí infekcí spojených s tvorbou biofilmu na implantátech.

1.2 Nukleové kyseliny a jejich štěpení

Nukleové kyseliny jsou biopolymery s nezastupitelnou funkcí v živých organizmech. V DNA je uložena genetická informace, která může být přepsána do struktury mRNA, která

má zásadní roli v syntéze proteinů. Struktura DNA i RNA obsahuje fosfodiesterové vazby, které propojují jednotlivé nukleosidy. Tyto fosfodiesterové vazby jsou velmi odolné vůči spontánní hydrolýze^[23]. Nekatalyzovaná hydrolýza DNA je termodynamicky výhodná, ale kineticky velmi pomalá. Fosfodiesterová skupina je záporně nabitá a chrání strukturu DNA před nukleofilním atakem hydroxidových iontů či jiných nukleofilů^[24]. Ve skutečnosti je hydrolýza tak pomalá, že bylo obtížné měřit rychlostní konstantu tohoto štěpení. Z tohoto důvodu se používají modelové sloučeniny, které se k tomuto měření využívají. Současný odhad poločasu hydrolýzy jedné fosfoesterové vazby je asi 30 milionů let^[23]. Vyšší rychlosti hydrolytického štěpení lze dosáhnout pomocí enzymů ze třídy nukleáz. Přirozeně se vyskytující nukleázy ve své struktuře často obsahují ionty kovů, konkrétně ionty Mg^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} a Zn^{2+} , které mají důležitou katalytickou funkci^[25]. Z tohoto důvodu byly intenzivně studovány komplexy různých kovů jako umělé nukleázy, které by byly schopny hydrolyticky štěpit nukleové kyseliny a napodobit tak funkci tělu vlastních enzymů.

1.2.1 Mechanismus hydrolýzy fosfoesterové vazby

Ionty kovů přítomné v metalonukleázách mají důležitou roli v jejich hydrolytické aktivitě. Jsou obecně přijímány tři přímé a tři nepřímé způsoby, kterými ionty kovů urychlují hydrolýzu fosfoesterové vazby (*Schéma 1*).

Přímé způsoby zahrnují i) aktivaci Lewisovy kyseliny, kdy se atom kyslíku koordinuje na ion kovu, ii) nukleofilní aktivaci, při které dochází ke koordinaci nukleofilu a iii) aktivaci odstupující skupiny, při které se kyslík z odstupující skupiny koordinuje na atom kovu. Mezi nepřímé způsoby patří iv) chování koordinovaných hydroxido komplexů jakožto bází, v) chování koordinovaných molekul vody jako kyselin a také vii) elektrostatické interakce mezi iontem kovu a nekoordinovaným fosfoesterem^[27].

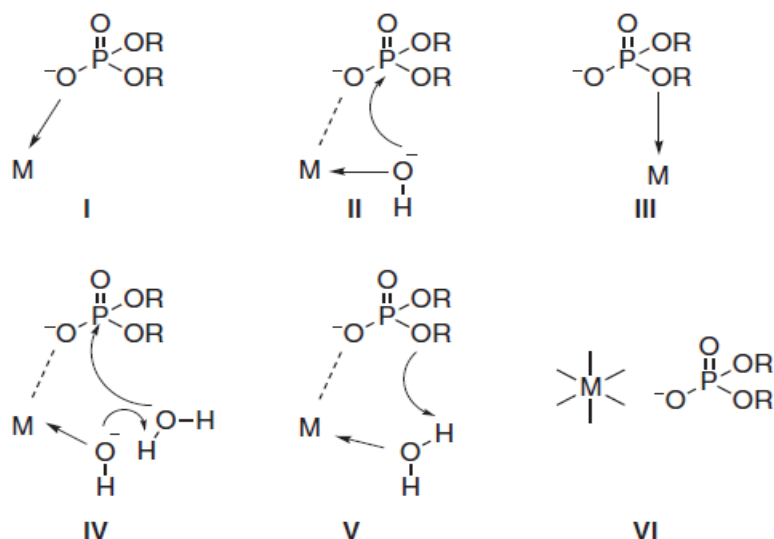


Schéma 1: Navrhovaný mechanismus hydrolyzy fosfoesterové vazby (převzato z literatury^[27])

Hydrolyza fosfodiesterů probíhá pravděpodobně asociativním mechanismem analogickým k S_N2 mechanismu na uhlíku. Hendry a Sargeson^[28] použili komplex obsahující Ir(III) k demonstraci tohoto mechanismu (*Schéma 2*) na modelové sloučenině ethyl-4-nitrofenyl fosfátu. Bylo dokázáno, že kyslík koordinované vody (nebo hydroxidu) nukleofilně atakoval fosforový atom, na kterém došlo k vytvoření pentakoordinovaného trigonálně bipyramidálního přechodového stavu, ve kterém přistupující i odstupující skupiny obsazovaly axiální polohy. Vzniklý oxyfosforan se rychle rozkládal odstoupením 4-nitrofenolu za vzniku monoesteru. Alternativní (pravděpodobně i častější) způsob odstoupení 4-nitrofenolátu vedl přes deprotonizaci hydroxylové skupiny. V posledním kroku následovalo rychlé otevření chelátového kruhu rozštěpením vazby P–O za vzniku monodentátního ester komplexu.

Tento navrhovaný mechanismus se stal vzorem pro vysvětlování iontem kovu katalyzované hydrolyzy fosfoesterů^[26].

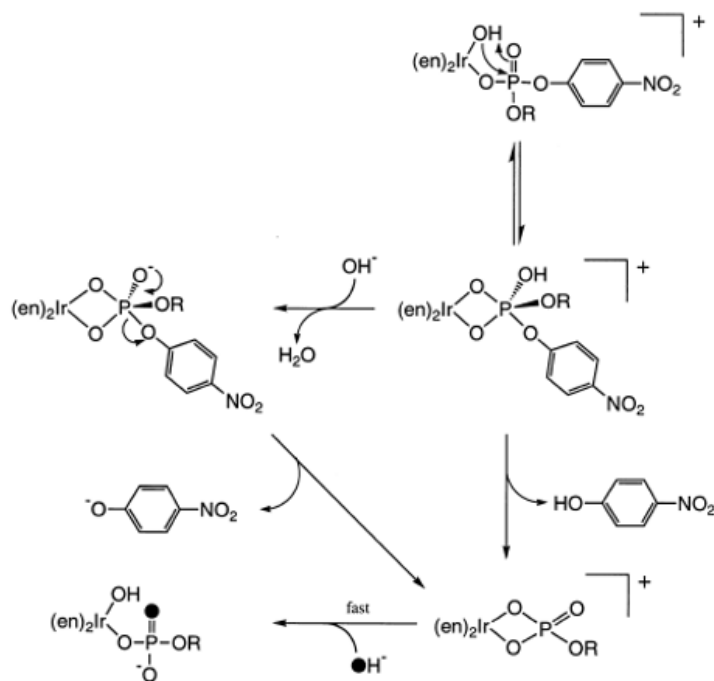


Schéma 2: Navrhovaný mechanismus hydrolyzy fosfodiesterů za účasti Ir(III)
(převzato z literatury^[26])

1.2.2 Používané ionty kovů schopné hydrolyzovat nukleové kyseliny

Téměř jedna třetina enzymatických procesů vyžaduje jako kofaktor ion kovu^[29]. Lidské tělo obsahuje esenciální ionty kovů Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , $\text{Fe}^{2+/3+}$, Mn^{2+} , $\text{Co}^{2+/3+}$, Cu^{2+} , Zn^{2+} a Mo^{2+} ^[30]. Ionty Mg^{2+} patří mezi nejvíce se vyskytující kofaktory v mnoha nukleázách díky jejich schopnosti vytvářet stabilní komplexy se sloučeninami obsahující fosfát. Jedná se o tvrdou Lewisovu kyselinu s nejvyšší hustotou náboje mezi ostatními ionty zastoupenými v biologických systémech. Právě díky těmto vlastnostem jsou ionty Mg^{2+} vhodné k navázání aniontů kyslíku přítomných v fosfoesterové kostře nukleových kyselin^[29].

Na základě provedených studií by měl ion kovu v umělých hydrolázách splňovat čtyři podmínky k tomu, aby jevil katalytickou funkci. Měl by i) poskytovat dvě *cis*-orientovaná labilní koordinační místa k navázání substrátu a molekuly vody; ii) snižovat pK_a koordinované vody; iii) aktivovat substrát pro nukleofilní atak, a iv) vytvářet produkty rozumnou rychlostí^[26].

Ve výzkumu syntetických nukleáz jsou hojně využívány ionty Zn^{2+} a Cu^{2+} , jejichž koordinační chemie je dobře prostudována. Vystupují jako Lewisovy kyseliny s poměrně vysokými ionizačními potenciály, které jsou schopny polarizovat fosfoesterovou vazbu a aktivovat fosforový atom vůči nukleofilnímu ataku. Hodnoty pK_a koordinovaných molekul

vody spadají do rozmezí pH 7–9. Tyto komplexy vykazují schopnost hydrolytického štěpení v blízkosti fyziologického pH. Podobné vlastnosti vykazují i komplexy s Ni^{2+} ionty, které však nebyly za tímto účelem rozsáhle zkoumány^[25].

1.2.3 Důvody výzkumu umělých nukleáz

V posledních dekádách byl značný zájem o přípravu látek, které by byly účinné jako katalytické hydrolázy. Tyto látky by potenciálně mohly mít důležitou roli nejen v prevenci vzniku či v rozkladu biofilmu, ale i v jiných odvětvích, jakou jsou například biotechnologie či genové inženýrství.

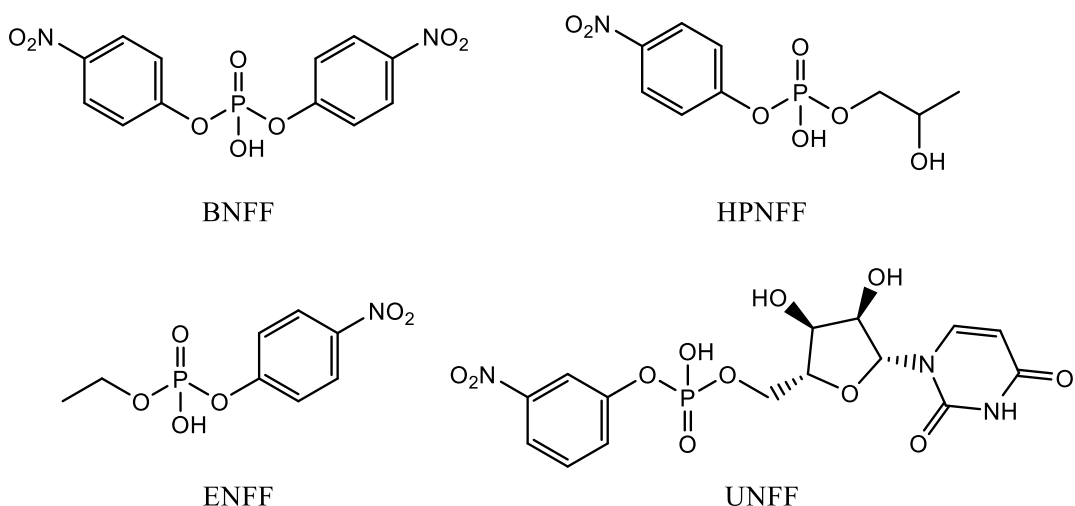
Uměle připravené nukleázy by mohly být použity jako restriční enzymy, které by byly schopné, na rozdíl od přírodně se vyskytujících restričních enzymů, štěpit selektivně řetězce nukleových kyselin po určitých sekvencích. Přírodní restriční enzymy rozeznávají sekvence po 4, 6 nebo 8 bazích. Produktem takového štěpení je v případě lidského genomu velké množství fragmentů. S přípravou látky, která by byla schopna štěpit delší fragmenty, by nebyla hydrolyzovaná směs tak bohatá, a separace fragmentů by byla jednodušší. Izolované fragmenty by následně mohly být dále hydrolyzovány a analyzovány^[26].

Umělé nukleázy mohou také poskytnout informace o konformační variabilitě DNA. Pro tyto účely se typicky používá nukleární magnetická rezonance nebo rentgenová strukturní analýza. Nicméně interpretace výsledků poskytnutých oběma metodami může být složitá^[27]. Syntetické metalonukleázy by také mohly pomoci při objasňování rolí iontů kovů přítomných v přírodně se vyskytujících enzimech^[26].

1.2.4 Modelové substráty pro štěpení nukleových kyselin

V případě použití umělých nukleáz ke štěpení sekvence DNA a jiných biopolymerů je produktem mnoho obtížně identifikovatelných a separovatelných fragmentů. Z toho důvodu (a z důvodu vysoké ceny substrátů) se za účelem napodobení štěpení DNA používají modelové substráty obsahující fosfoesterovou vazbu, typicky sloučeniny obsahující 4-nitrofenol. Vybrané substráty jsou zobrazeny na *Obr. 2*. Mezi tři nejvíce používané modelové substráty patří bis(4-nitrofenyl)fosfát (BNFF), bis(2,4-dinitrofenyl)fosfát (BDNFF) a ethyl-4-nitrofenylfosfát (ENFF). Za účelem měření kinetiky štěpení se častěji používá BNFF oproti ENFF z důvodu přibližně 15krát větší rychlosti hydrolýzy^[32]. Pro napodobení RNA fosfodiesterové vazby se používají modelové substráty s hydroxylovou

skupinou na druhém atomu uhlíku. Mezi takovéo používané substráty patří například 2-hydroxypropyl-4-nitrofenylfosfát (HPNFF) nebo uridin 3'-nitrofenylfosfát (UNFF). Za účelem vývoje protinádorových léčiv lze kromě těchto modelových substrátů zkoumat degradaci krátkých sekvencí DNA či RNA^[32]. Štěpením těchto molekul vznikají 4-nitrofenoxidové ionty (NF), které silně absorbují při 400 nm a tím pádem může být jejich vznik a tím i kinetika hydrolyzy snadno sledována UV–VIS spektroskopií^[33].

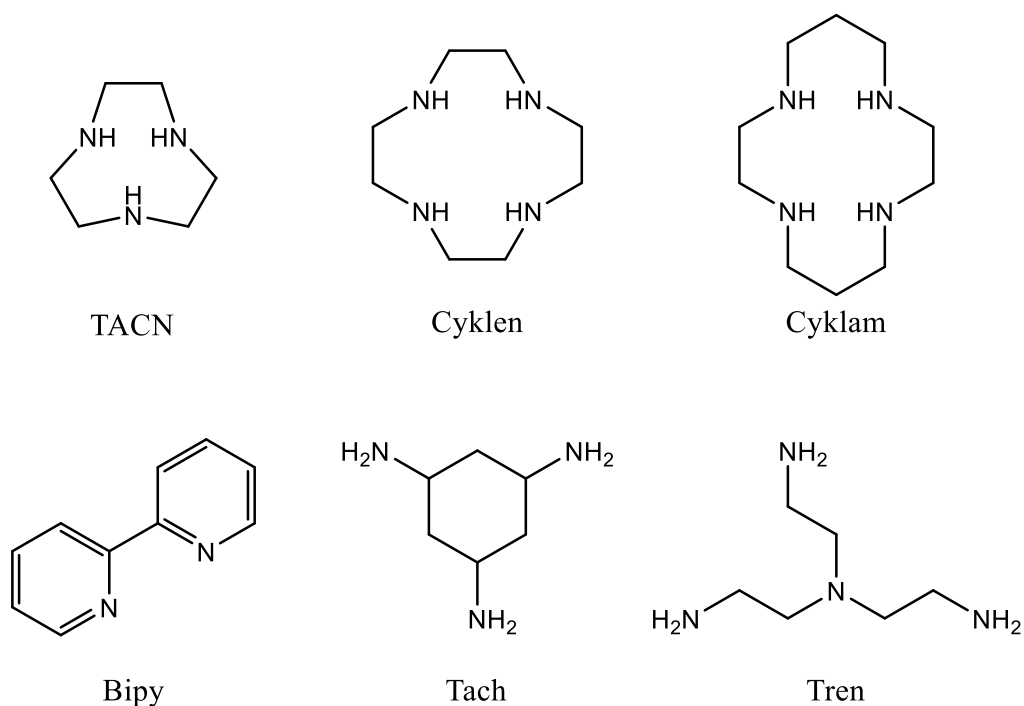


Obr. 2: Modelové substráty obsahující 4-nitrofenol

1.3 Ligandy

Kromě druhu centrálního iontu kovu je nutné uvažovat strukturu ligandu. Zatímco přírodní enzymy mají svá aktivní centra obklopena aminokyselinami, které jsou nezbytné pro katalytickou funkci, v umělých enzimech jsou kolem aktivních center jednoduché organické ligandy.

V praxi se často používají ligandy, které mají ve své struktuře atomy dusíku. Jedná se například o tripodální ligandy, Schiffovy báze, porfyriny, deriváty pyridinu a především o makrocykly^[26,28]. Konkrétní příklady některých ligandů jsou uvedeny na *Obr. 3*.



Obr. 3: Ligandy využívané pro studium umělých nukleáz

De Rosch a Trogler^[34] studovali sérii komplexů bipy a tren s Cu(II), Zn(II) a Ni(II). Bylo zjištěno, že aktivita štěpení modelového substrátu BNFF byla při neutrálním pH nejvyšší pro komplex Cu(II)-bipy. Vysvětlením byla menší velikost a menší vaznost bidentátního bipy oproti tetradentátnímu tren. Bidentátní ligandy obsazují méně koordinačních míst na centrálním iontu kovu a na zbylá místa se může současně vázat substrát i hydroxidový anion plnicí roli nukleofilu.

Z hlediska centrálního atomu byla při neutrálním pH a teplotě 25 °C důležitým faktorem hodnota pK_a koordinované vody. Hodnoty pK_a komplexu $M(\text{bipy})(\text{OH})_2^{2+}$ pro Cu^{2+} , Zn^{2+} a Ni^{2+} byly 7,8, 8,1 a 8,9. Z tohoto důvodu vykazovaly při neutrálním pH nejlepší hydrolytickou aktivitu komplexy s Cu^{2+} .

Dalšími ligandy pro studium umělých nukleáz jsou tridentátní ligandy, které ponechávají dvě či více *cis* uspořádaných vazebných míst na iontu kovu, která umožňují koordinaci substrátu i nukleofilu ve vhodné vzdálenosti^[25].

1.3.1 Makrocyclické ligandy

Makrocykly jsou nejméně devítičlenné ligandy, které ve své struktuře obsahují minimálně tři heteroatomy (N, O nebo S)^[27].

Makrocyclické ligandy mají schopnost tvořit stabilní komplexy. Tyto ligandy lze funkcionalizovat zavedením pendantních ramen a měnit tak jejich koordinační vlastnosti^[35]. Další výhodou jejich použití je možnost tvorby komplexů s předem určenou stabilitou a spektroskopickými, magnetickými a redoxními vlastnostmi^[36].

Sekundární makrocyclické aminy mají široké rozpětí hodnot pK_a . Jednou protonizovaný makrocycklus má obecně hodnoty pK_a přibližně 9–11, zatímco pK_a plně protonizovaného makrocycclu bývá v rozpětí 1–3. Toto chování bývá vysvětlováno větším odpuzováním náboje způsobeným vyšší hustotou kladného náboje v cyklu ve srovnání s alifatickými polyaminy^[27].

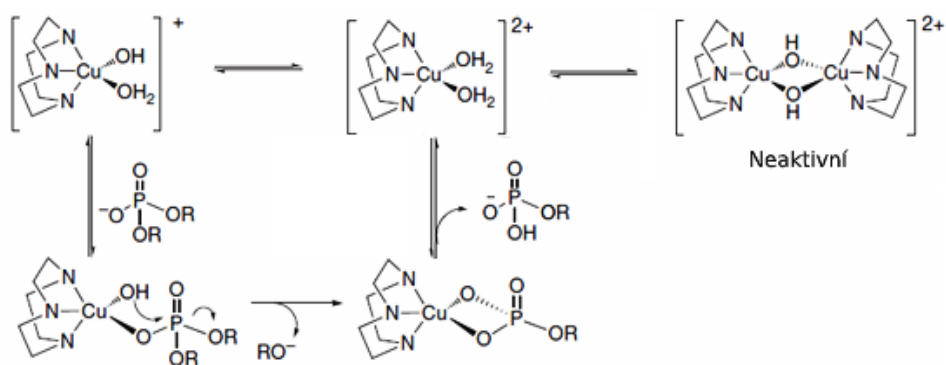
Pozitivní náboj makrocycklů při neutrálním pH usnadňuje jejich interakci s negativně nabitými biomolekulami, jako jsou například nukleové kyseliny a některé proteiny, a mohou je tak vázat elektrostatickými interakcemi^[27].

Komplexy makrocyclických polyaminů nacházejí uplatnění nejen jako umělé nukleázy, ale také jako kontrastní látky pro zobrazovací techniky v radiodiagnostice, při radioterapii, ve studiích transportu iontů kovů v biologických systémech, nebo jako chemické receptory pro kationty/anionty a bioaktivní molekuly^[27].

1.3.2 Cu(II) komplexy makrocyclických ligandů

Měď má důležitou strukturní a katalytickou roli v biologických procesech. V lidském těle jsou přítomny enzymy, které ji vyžadují pro svoji správnou funkci^[37]. To je jedním z důvodů studia komplexů mědi za účelem přípravy umělých nukleáz^[27].

Hegg a Burstyn^[26] popsali mechanismus a katalytickou schopnost štěpení modelových substrátů pro komplexy Cu(II)-TACN. Bylo dokázáno, že mechanismus štěpení probíhá přes tvorbu intermediátu komplex-substrát, po které následuje intramolekulární atak koordinovaného hydroxidu a eliminace 4-nitrofenoxidového iontu. Zároveň byl popsán vliv pendantních ramen na tuto štěpící aktivitu. Důležitým objevem byla skutečnost, že rychlost štěpení nesubstituovaných komplexů je ovlivněna rovnováhou mezi monomerní a dimerní formou. Tvorba neaktivní dimerní formy je silně upřednostňována při přibližně neutrálním pH. Substitucí na sekundárních atomech dusíku stericky objemnými skupinami lze omezit tvorbu dimerů a dosáhnout významného zrychlení štěpení.



Obr. 4: Navrhovaný mechanismus štěpení modelových substrátů pomocí Cu(II)-TACN (převzato z literatury^[27], upraveno)

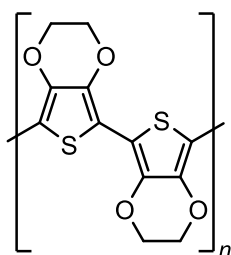
Zavedením tří isopropylových skupin lze docílit nejméně 60krát větší rychlosti štěpení modelového substrátu BNFF oproti nesubstituovanému komplexu Cu(II)^[38]. Podobných hodnot dosahoval i komplex se třemi methylovými substituenty^[31]. Dále bylo popsáno, že významného zvýšení rychlosti štěpení oproti nesubstituovanému Cu(II)-TACN lze docílit substitucí už pouze na dvou atomech dusíku^[39].

Mezi dobře popsané komplexy používané k tomuto účelu patří Cu[TACN]Cl₂. Deal a Burstyn^[40] ukázali, že počáteční rychlost štěpení vykazovala závislost 1. řádu na koncentraci substrátu BNFF bez ohledu na koncentraci komplexu. Při tomto měření nebyla pozorována saturace komplexu z důvodu nízké afinity komplex–substrát a z důvodu nízké rozpustnosti BNFF ve vodě. Při použití více rozpustných modelových substrátů byla saturace pozorována. Bylo pozorováno, že hydrolytická aktivita je inhibována produktem rozpadu BNFF, a sice NFF.

Jednoduché fosfodiesterly jsou za většiny podmínek (pH 2–10) vysoce stabilní sloučeniny a hydrolyzují rozumnou rychlostí pouze za zvýšených teplot kolem 100 °C. Například poločas hydrolyzy BNFF je při pH 3–4 a teplotě 100 °C delší než 4 měsíce^[41].

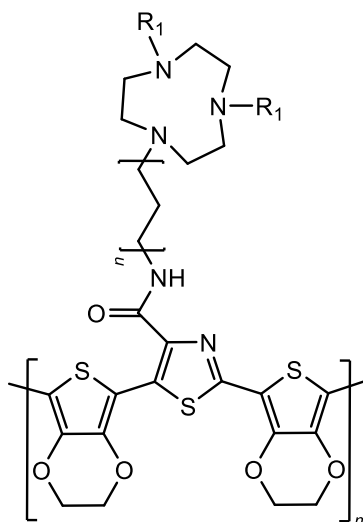
1.4 Thiazolová kotva

Komplexy vykazující hydrolytickou aktivitu mohou být zabudovány do polymerních nosičů skrze thiazolovou kotvu umístěnou na konci pendantního ramene ligandu. Heterocykly thiazol nebo thiofen lze zabudovat oxidativní nebo elektrochemickou kopolymerizací do vodivého polymeru poly(3,4-ethylendioxythiofen) (PEDOT) (Obr. 4), který je stabilní a biokompatibilní^[42].



Obr. 5: PEDOT polymer

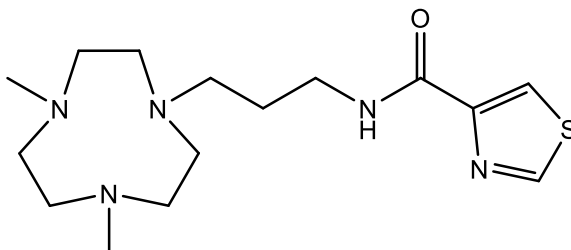
PEDOT polymer má, podobně jako některé další vodivé polymery (například polyanilin nebo polypyrrol), nízkou hustotu, dobrou flexibilitu, je odolný vůči korozi a lze modulovat jeho morfologii^[43]. Příklad makrocyclického ligandu zabudovaného do PEDOT polymeru zobrazuje Obr. 6.



Obr. 6: Makrocyclický ligand zabudovaný přes thiazolovou kotvu do PEDOT polymeru

1.5 Cíl práce

Cílem této bakalářské práce je příprava ligandu **L1** (Obr. 7) s pendantním ramenem zakončeným thiazolovou skupinou vhodnou pro zabudování do polymerních nosičů.



L1

Obr. 7: Připravovaný ligand **L1**

Dalším cílem byla příprava modelového substrátu **BNFF** a zavedení metodiky pro měření kinetiky umělých hydroláz.

2. Experimentální část

2.1 Seznam použitých chemikálií

Chemikálie použité k přípravě ligandu a prekurzorů jsou komerčně dostupné od prodejců, jako je například Sigma-Aldrich, Fluka, Penta, Lachema, Lach-ner a CheMaTech. Rozpouštědla nebyla před použitím sušena ani čištěna.

2.2 Metody charakterizace

2.2.1 NMR spektroskopie

Spektra NMR jader ^1H , ^{13}C a ^{31}P byla v průběhu syntézy měřena na spektrometrech Varian VNMR300 a Bruker Avance III HD 400. Spektra jader ^1H , ^{13}C a 2D experimenty ligandu **L1** byly měřeny na přístroji Bruker Avance III 600 MHz Mgr. Filipem Kouckým.

Naměřená spektra byla zpracována v programu MestReNova.

2.2.2 Tenkovrstvá chromatografie – TLC

Tenkovrstvá chromatografie (TLC) byla prováděna na silikagelových destičkách TLC Aluminium Plates Silica F254 od společnosti VWR. K vizualizaci byla použita UV lampa (vlnové délky 254 a 366 nm) a Dragendorffovo činidlo.

2.2.3 Hmotnostní spektrometrie

Hmotností spektra byla naměřena na přístroji Shimadzu LCMS-2020 LC/MS s ionizací elektrosprejem (detekce v pozitivním módu). U charakterizací připravených látek jsou uvedeny pouze intenzivní interpretované signály. Vzorky byly rozpuštěny v MeOH. Spektra byla změřena Mgr. Ondřejem Zemkem.

2.2.4 UV–VIS spektroskopie

UV–VIS spektra byla měřena na přístroji Specord 50 PLUS s měřícím rozsahem 190–1100 nm. Měření spekter bylo prováděno v kyvetách s optickou drahou 1 cm a objemem 1 ml. Spektrometr byl ovládán programem WinASPECT PLUS.

2.2.5 RTG difrakce

Krystalová struktura byla změřena na přístroji Bruker D8 VENTURE Kappa Duo PHOTON 100 CMOS s využitím vlnové délky $\text{MoK}\alpha$ $\lambda = 0,71073 \text{ \AA}$ při 120 K a vyřešena RNDr. Ivanou Císařovou, CSc., a vypřesněna školitelem. Vybrané charakteristiky jsou uvedeny v *Tabulce 1*.

Tabulka 1: Experimentální data stanovené krystalové struktury

Sloučenina	<i>N,N'</i> -(propan-1,3-diyl)bis(thiazol-4-karboxamid)
Vzorec	$\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{N}_4\text{O}_2\text{S}_2$
M_r	296,36
Krystalová soustava	Monoklinická
Prostorová grupa	$\text{P2}_1/\text{c}$
$a / \text{Å}$	12,1030(3)
$b / \text{Å}$	13,6029(3)
$c / \text{Å}$	8,6852(2)
$\alpha / ^\circ$	90,00
$\beta / ^\circ$	110,7880
$\gamma / ^\circ$	90,00
$U / \text{Å}^3$	1336,81(5)
Z	4
Difrakce celkem	3061
Difrakce intenzivní	2993
$R(I > 2\sigma(I))$	0,0253
R'	0,0258
$wR(I > 2\sigma(I))$	0,0637
wR'	0,0641

2.3 Syntetická část

Plánovaný postup přípravy ligandu **L1** zobrazuje *Schéma 3*. Příprava vychází z makrocyclu 1,4,7-triazacyklononanu.

Přípravu prekurzoru **9**, sloužícího pro zabudování látky **L1** ve formě svých komplexů do polymerních nosičů, zobrazuje *Schéma 4*.

Pro měření hydrolytické aktivity byl připraven modelový substrát **BNFF**, jehož přípravu shrnuje *Schéma 5*.

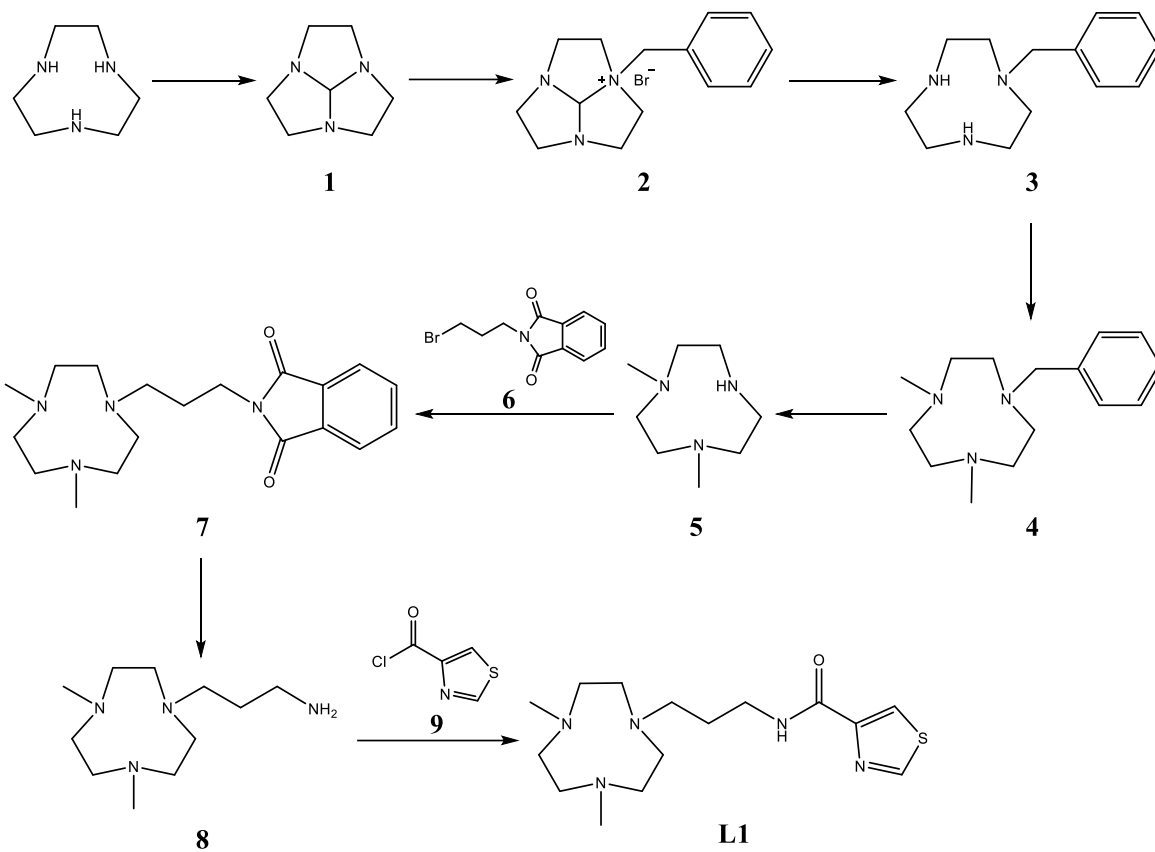


Schéma 3

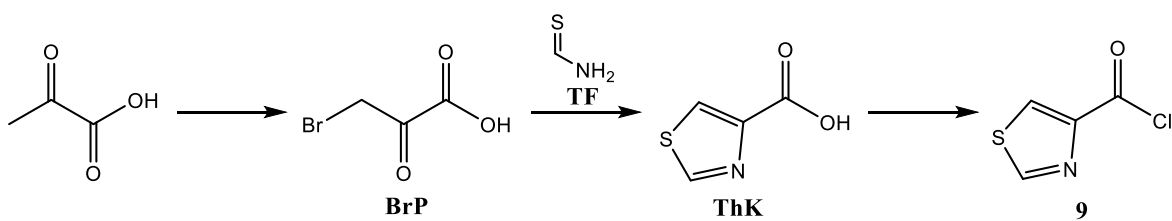


Schéma 4

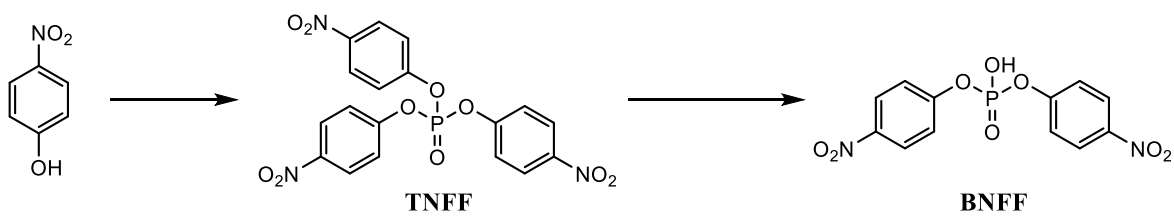
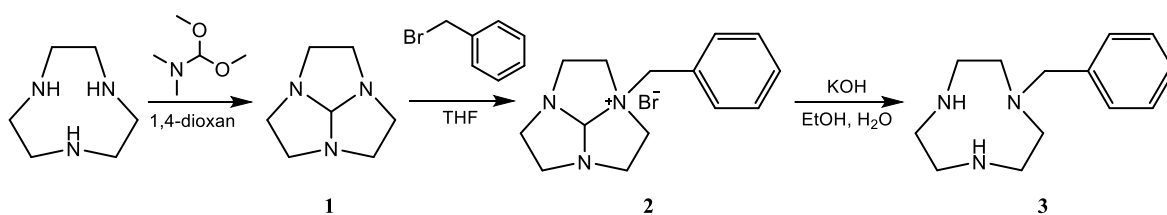


Schéma 5

2.3.1 Příprava 1-benzyl-1,4,7-triazacyklonanu (3)



Příprava **3** vycházela z publikovaného postupu^[44]. Bylo odváženo 1,00 g (7,75 mmol) 1,4,7-triazacyklononu, který byl převeden do 25ml baňky a poté rozpuštěn v 10 ml 1,4-dioxanu. K roztoku bylo následně přidáno 1,34 ml (9,83 mmol, 1,27 ekv.) 97% *N,N*-dimethylacetaldimethylformamidu. Směs byla zahřívána k varu 3 hodiny, a poté odpařena na RVO za vzniku světle žlutého oleje **1**. Odparek byl rozpuštěn v 8 ml THF. Následně bylo pomalu přikapáno 1,20 ml benzylbromidu (10,1 mmol, 1,30 ekv.) v 8 ml THF. Téměř okamžitě se tvořila nerozpustná světle žlutá sraženina. Reakční směs byla dále míchána přes noc. Následující den byla kvartérní amoniová sůl **2** odfiltrována a rozpuštěna v 5 ml destilované H₂O a 10 ml EtOH. Bylo přidáno 2,70 g KOH. Reakční směs byla dále zahřívána k varu 3 dny. Poté byla rozpouštědla odpařena na RVO a k odparku bylo přidáno přibližně 20 ml destilované vody. Následovala extrakce CHCl₃ (3x40 ml). Organické frakce byly spojeny a vysušeny přidávkem Na₂SO₄. Po odfiltrování sušidla a odpaření rozpouštědla na RVO byla získána látka **3** ve formě světle žlutého oleje.

Výtěžek: 1,62 g (95 %)

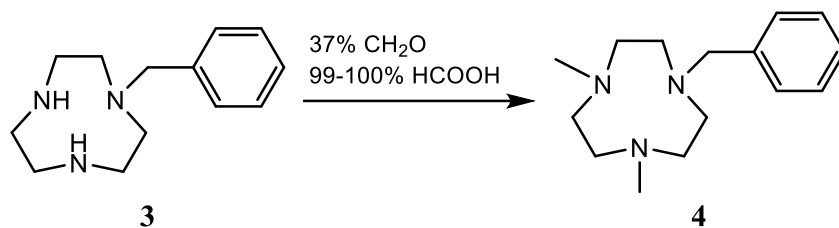
¹H NMR (299 MHz, CDCl₃): δ = 7,26 ppm (m, 5H), 3,67 ppm (s, 2H), 2,74 ppm (s, 4H), 2,61 ppm (m, 8H)

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ = 139,79 ppm (1C), 128,93 ppm (2C), 128,27 ppm (2C), 126,97 ppm (1C), 61,66 ppm (1C), 52,94 ppm (2C), 46,98 ppm (2C), 46,66 ppm (2C)

TLC: EtOH:NH₃(konc.aq.) = 5:1, R_f = 0,35 (UV, Dragendorffovo činidlo, oranžová skvrna)

MS-ESI (+): 220,2 ([M+H]⁺)

2.3.2 Příprava 1-benzyl-4,7-dimethyl-1,4,7-triazacyklonanu (4)



Do 3,01 g (13,7 mmol) látky **3** bylo přidáno 25 ml (24,1 ekv.) 37% roztoku formaldehydu a 15 ml (29,1 ekv.) 99–100% kyseliny mravenčí. Následovalo míchání a zahřívání na 120 °C pod zpětným chladičem přes noc. Po ukončení zahřívání byla směs odpařena na RVO. Vznikla světle hnědá kapalina, která byla extrahována z 10% roztoku NaOH do CHCl₃ (3x30 ml). Organické fáze byly vysušeny přidávkem Na₂SO₄, přefiltrovány a odpařeny na RVO. Byla získána látka **4** ve formě žlutého oleje.

Výtěžek: 3,23 g (95 %)

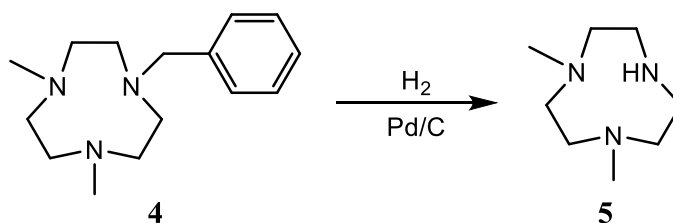
¹H NMR (299 MHz, CDCl₃): δ = 7,30 ppm (m, 5H), 3,66 ppm (s, 2H), 2,82 ppm (s, 4H), 2,73 ppm (m, 4H), 2,66 ppm (m, 4H), 2,35 ppm (s, 6H)

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ = 140,25 ppm (1C), 129,08 ppm (2C), 129,12 ppm (2C), 126,75 ppm (1C), 63,42 ppm (1C), 57,09 ppm (2C), 56,82 ppm (2C), 56,04 ppm (2C), 46,61 ppm (1C)

TLC: EtOH:NH₃(konc.aq.) = 5:1, R_f = 0,50 (UV, Dragendorffovo činidlo, oranžová skvrna)

MS–ESI (+): 248,3 ([M+H]⁺)

2.3.3 Příprava 1,4-dimethyl-1,4,7-triazacyklononanu (5)



Do baňky s vypouklým dnem bylo převedeno 3,23 g (13,1 mmol) látky **4** a následně přidáno přibližně 20 ml MeOH, 2 ml 99% CH₃COOH a 350 mg Pd/C (10,8 hm. % látky **4**). Baňka s redukcí a kohoutem byla evakuována. Evakuace byla ukončena v momentě,

kdy obsah baňky začal vřít. Následovala hydrogenace 3 dny při zahřívání na 50 °C pod balónkem naplněným H₂. Poté byl katalyzátor odfiltrován přes filtrační papír a filtrát byl zahuštěn na RVO. Odparek byl naředěn 20 ml destilované vody a opět odpařen na RVO. Tento postup byl dvakrát opakován. Bylo naměřeno ¹H NMR spektrum odparku, které potvrdilo přítomnost debenzoylovaného produktu **5**. Pro odstranění zbytku CH₃COOH byl produkt extrahován z 10% vodného roztoku NaOH do CHCl₃ (3x20 ml). Organické frakce byly spojeny, vysušeny přidávkem Na₂SO₄, přefiltrovány a odpařeny na RVO za vzniku látky **5** ve formě světle oranžového oleje.

Výtěžek: 1,75 g (85 %)

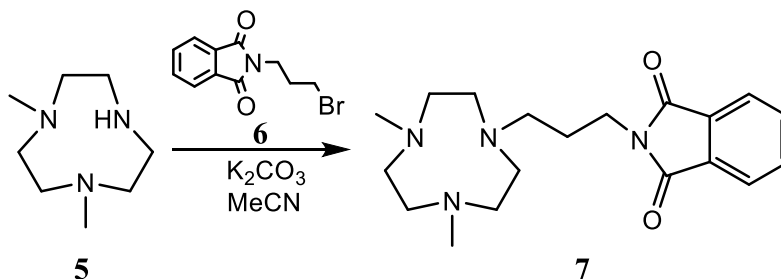
¹H NMR (299 MHz, CDCl₃): δ = 2,64 (m, 4H), 2,50 ppm (8H, m), 2,37 ppm (s, 6H)

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ = 54,45 ppm (2C), 53,40 ppm (2C), 46,22 ppm (2C), 45,46 ppm (2C)

TLC: EtOH:NH₃(konc.aq.) = 5:1, R_f = 0,50 (Dragendorffovo činidlo, oranžová skvrna)

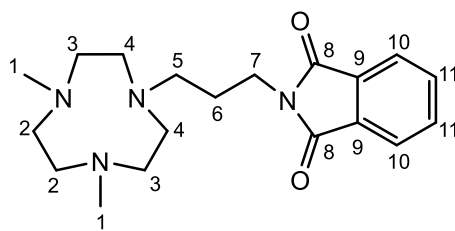
MS-ESI (+): 158,2 ([M+H]⁺)

2.3.4 Příprava 1-(3-ftalimidopropyl)- 4,7-dimethyl-triazacyklononanu (**7**)



Bylo rozpuštěno 1,70 g (10,8 mmol) látky **5** v 50 ml MeCN. Dále bylo přidáno 8,10 g (58,7 mmol, 5,43 ekv.) K₂CO₃ a 3,20 g (11,9 mmol, 1,10 ekv.) látky **6**. Směs byla intenzivně míchána, zahřívána pod zpětným chladičem v lázni vyhřáté na 100 °C 3 dny, a po vychladnutí přefiltrována přes fritu S3. Filtrát byl odpařen na RVO za vzniku tmavě oranžového oleje, který nebyl dále čištěn. Produkt **7** měl podle ¹H a ¹³C NMR spektra dobrou čistotu a byla s ním provedena následná reakce.

Výtěžek: 2,18 g (59 %)



Obr. 8: Označení atomů pro NMR charakterizaci

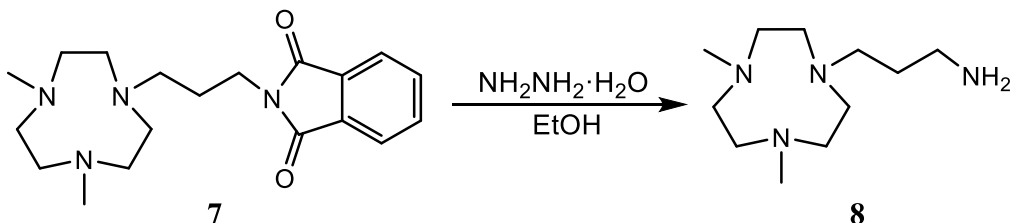
¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): δ = 7,84 ppm (m, H¹⁰), 7,72 ppm (m, H¹¹), 3,75 ppm (t, H⁷, ³J_{HH} = 7,45 Hz), 2,75 ppm (s, H²), 2,71 ppm (m, H³/H⁴), 2,67 ppm (m, H³/H⁴), 2,57 ppm (t, H⁵, ³J_{HH} = 7,06 Hz), 2,37 ppm (s, H¹), 1,82 ppm (p, H⁶, ³J_{HH} = 7,16 Hz)

¹³C NMR (151 MHz, CDCl₃): δ = 168,41 ppm (C⁸), 133,86 ppm (C¹¹), 132,21 ppm (C⁹), 122,77 ppm (C¹⁰), 57,38 ppm (C³/C⁴), 56,90 ppm (C²), 56,77 ppm (C⁵), 56,53 ppm (C³/C⁴), 46,70 ppm (C¹), 36,61 ppm (C⁷), 27,24 ppm (C⁶)

TLC: EtOH:NH₃(konc.aq.) = 5:1, R_f = 0,81 (UV)

MS-ESI (+): 345,3 ([M+H]⁺)

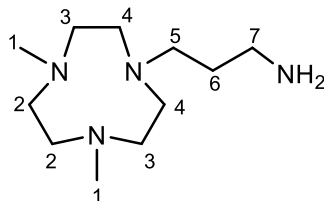
2.3.5 Příprava 1-(3-aminopropyl)-4,7-dimethyl-1,4,7-triazacyklononanu (8)



Ve 100ml baňce bylo k 2,18 g (6,34 mmol) látky **7** přidáno 5 ml EtOH a 35 ml NH₂NH₂·H₂O (64% hydrazin, 100% monohydrát). Reakční směs byla zahřívána pod zpětným chladičem na 90 °C 3 dny. Po ukončení zahřívání byla směs zahuštěna na RVO. V průběhu odpařování se vysrážel ftalhydrazid ve formě bílého prášku. K odparku bylo přidáno malé množství CHCl₃ a nerozpustný ftalhydrazid byl odfiltrován přes fritu S3. Filtrát byl odpařen na RVO. Vzniklo 0,65 g hnědé olejovité kapaliny. Odfiltrovaný ftalhydrazid byl zahříván k varu v CHCl₃ pod zpětným chladičem 2 hodiny. Po 2 hodinách byla směs přefiltrována přes fritu S3 a filtrát byl odpařen na RVO za vzniku dalších 0,38 g hnědého oleje. Oběma odparkům bylo změřeno NMR pro potvrzení přítomnosti látky **8**. První část odparku (0,65 g) byla extrahována z 10% vodného roztoku NaOH do CHCl₃

(3x20 ml). Spojené organické frakce byly vysušeny přidavkem Na₂SO₄ a odpařeny dosucha na RVO. Vznikla látka **8** ve formě světle hnědého oleje v syntetické čistotě.

Výtěžek: 0,40 g (29 %)



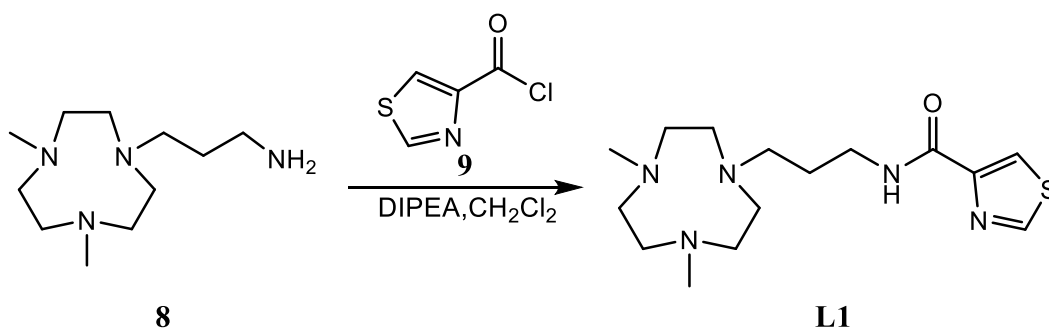
Obr. 9: Označení atomů pro NMR charakterizaci

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): δ = 2,75 ppm (t, H⁷, ³J_{HH} = 6,62 Hz), 2,66 ppm (s, H²), 2,62 ppm (s, H³/H⁴), 2,54 ppm (t, H⁵, ³J_{HH} = 6,94 Hz), 2,35 ppm (s, H¹), 1,62 ppm (p, H⁶, ³J_{HH} = 6,78 Hz)

¹³C NMR (151 MHz, CDCl₃): δ = 56,77 ppm (C²/C³/C⁴), 56,70 ppm (C⁵), 56,35 ppm (C²/C³/C⁴), 55,33 ppm (C²/C³/C⁴), 46,53 ppm (C¹), 40,35 ppm (C⁷), 30,44 ppm (C⁶)

TLC: EtOH:NH₃(konc.aq.) = 5:1, R_f = 0,80 (UV)

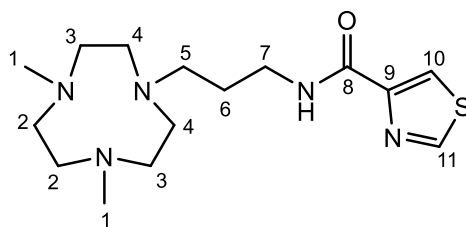
2.3.6 Příprava ligandu L1



Do baňky bylo převedeno 0,24 g látky **8** (1,12 mmol) a bylo přidáno 10 ml CH₂Cl₂. Dále bylo do směsi přikapáno 0,39 ml (2,24 mmol, 2,0 ekv.) DIPEA. Za stálého míchání bylo po částech přisypáno 0,18 g látky **9** (1,22 mmol, 1,09 mmol). Po 5 hodinách míchání bylo přidáno dalších 7 ml CH₂Cl₂. Výsledná reakční směs měla oranžovo–hnědou barvu a obsahovala části nerozpuštěné látky **9**. Směs byla míchána při laboratorní teplotě 1 den. Následně byla pevná látka odfiltrována přes fritu S4 a filtrát byl odpařen na RVO. Odparek byl poté rozpuštěn v CHCl₃ a nadbytek látky **9** byl odstraněn extrakcí z 10% vodného roztoku NaOH do CHCl₃ (3x20 ml). Spojené organické frakce byly vysušeny přidavkem

Na₂SO₄ a odpařeny dosucha na RVO. Vzniklo 0,26 g hustého hnědého oleje. Bylo změřeno ¹H NMR spektrum, podle kterého odparek obsahoval produkt **L1** společně s nečistotami. Pomocí TLC (EtOH:NH₃(konc.aq.) = 5:1, detekce UV a Dragendorffovo činidlo) byly zjištěny retenční faktory produktu (0,35) a nečistoty (0,90). Sloupcovou chromatografií (14 g silikagelu) bylo přečištěno 100 mg odpařené látky. Přítomnost produktu **L1** v jímaných frakcích byla zjišťována pomocí TLC. Frakce obsahující produkt byly spojeny a odpařeny na RVO. Vznikla hnědá olejovitá kapalina, ze které byl odebrán vzorek na charakterizaci. Zbytek odpařené látky byl přečištěn stejným postupem.

Výtěžek: 63,4 mg (17 %)



Obr. 10: Označení atomů pro NMR charakterizaci

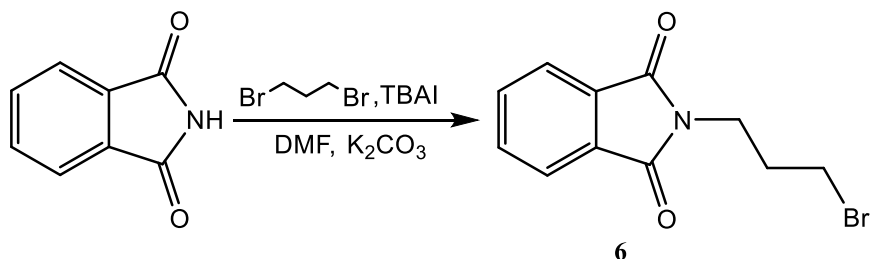
¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): δ = 8,76 ppm (d, H¹¹, ⁴J_{HH} = 2,01 Hz), 8,17 ppm (d, H¹⁰, ⁴J_{HH} = 1,92 Hz), 7,70 ppm (s, –NH–), 3,54 ppm (q, H⁷, ²J_{HH} = 6,71 Hz), 3,03 ppm (s, H²), 2,94 ppm (s, H³/H⁴), 2,81 ppm (s, H³/H⁴), 2,68 ppm (t, H⁵, ³J_{HH} = 6,96 Hz), 2,53 ppm (s, H¹), 1,81 ppm (p, H⁶, ³J_{HH} = 6,95 Hz)

¹³C NMR (151 MHz, CDCl₃): δ = 161,12 ppm (C⁸), 152,68 ppm (C¹¹), 151,20 ppm (C⁹), 123,01 ppm (C¹⁰), 56,41 ppm (C³/C⁴), 56,21 ppm (C⁵), 55,16 ppm (C²), 54,62 ppm (C³/C⁴), 45,64 ppm (C¹), 37,49 ppm (C⁷), 27,91 ppm (C⁶)

TLC: EtOH:NH₃(konc.aq.) = 5:1, R_f = 0,35 (UV)

MS–ESI (+): 326,3 ([M+H]⁺)

2.3.7 Příprava *N*-(3-brompropyl)ftalimidu (**6**)



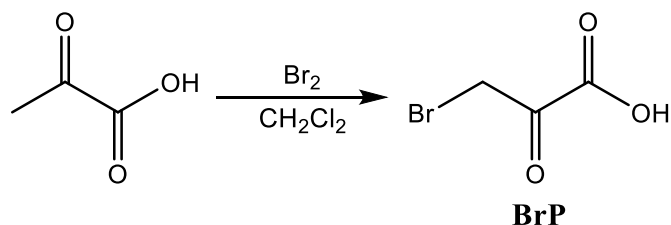
Postup přípravy byl převzat a upraven z literatury^[45]. Do baňky s 25 ml DMF a 15 ml 1,3-dibromopropanu (148 mmol, 4,28 ekv.), bylo naváženo 9,90 g K₂CO₃ a 1,20 g TBAI. Poté bylo po částech přidáno 5,08 g (34,6 mmol) ftalimidu. Reakční směs byla za stálého míchání zahřívána na 40 °C po dobu 24 hodin, a byla poté přefiltrována přes fritu S3. Filtrát byl naředěn cca 100 ml destilované vody a extrahován CH₂Cl₂ (3x40 ml). Spojené organické fáze byly vysušeny Na₂SO₄, přefiltrovány a odpařeny na RVO. Ke světle oranžovému odparku bylo Pasteurovou pipetou přidáno několik kapek EtOH a produkt byl ponechán krystalizovat při laboratorní teplotě. Získané bílé krystaly látky **6** byly odfiltrovány přes fritu S3, prosátý vzduchem a vysušeny mezi listy filtračního papíru.

Výtěžek: 6,12 g (66 %)

¹H NMR (299 MHz, CDCl₃): δ = 7,84 ppm (dd, 2H, ³J_{HH} = 5,54 Hz, ⁴J_{HH} = 3,09 Hz), 7,71 ppm (dd, 2H, ³J_{HH} = 5,50 Hz, ⁴J_{HH} = 3,07 Hz), 3,83 ppm (t, 2H, ³J_{HH} = 6,85 Hz), 3,41 ppm (t, 2H, ³J_{HH} = 6,75 Hz), 2,25 (p, 2H, ³J_{HH} = 6,78 Hz)

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ = 134,08 ppm (2C), 123,33 ppm (2C), 36,72 ppm (1C), 31,64 ppm (1C), 29,81 ppm (1C)

2.3.8 Příprava kyseliny brompyrohroznové (BrP)



V baňce umístěné ve vodní lázni bylo rozpuštěno 2,56 g (29,0 mmol) kyseliny pyrohroznové v 20 ml CH₂Cl₂. Za stálého míchání bylo injekční stříkačkou s plastovou

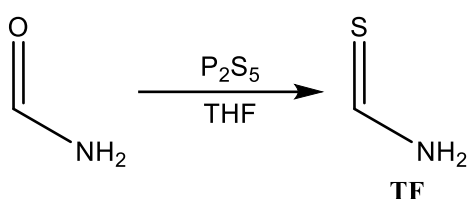
jehlou přikapáno 4,64 g (58,1 mmol, 2 ekv.) Br₂. Reakční směs byla míchána 20 hodin, a poté byla odpařena na RVO za vzniku **BrP** ve formě oranžového oleje, který při teplotě 5 °C tuhne v krystalickou látku.

Výtěžek: 4,70 g (97 %)

¹H NMR (299 MHz, D₂O): δ = 3,53 ppm (s, 2H)

¹³C NMR (75 MHz, D₂O): δ = 35,34 ppm (1C)

2.3.9 Příprava thioformamidu (TF)

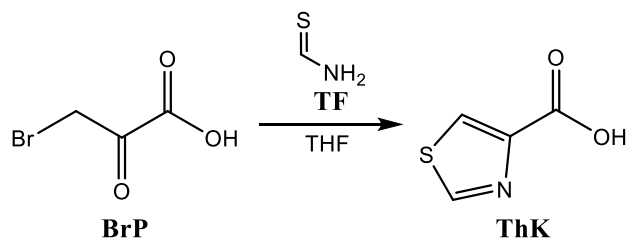


V 250ml baňce bylo smícháno 10 g (222 mmol) formamidu a 100 ml THF. Směs byla vychlazena v lázni voda:led na 0 °C a bylo k ní po malých částech přisypáno 9,86 g (44,4 mmol, 1,00 ekv.) P₂S₅. Směs byla po dobu 20 hodin míchána z 0 °C do laboratorní teploty. Poté byla směs přefiltrována přes vatku a filtrát byl odpařen na RVO. Vznikl **TF** jako žlutá olejovitá kapalina.

Výtěžek: 10,7 g (79 %)

¹H NMR (299 MHz, CDCl₃): 9,45 ppm (dd, 1H, ³J_{HH} = 16,33, 5,52 Hz)

2.3.10 Příprava 4-thiazolkarboxylové kyseliny (ThK)



Ve 20 ml THF bylo rozpuštěno 1,35 g (22,1 mmol, 1,39 ekv.) **TF**. Směs byla umístěna v lázni voda:led. K vychlazené směsi bylo přidáno 2,65 g (15,9 mmol) **BrP** a směs byla míchána po dobu 3 hodin. Produkt byl izolován odsátím na Büchnerově nálevce. Pevná

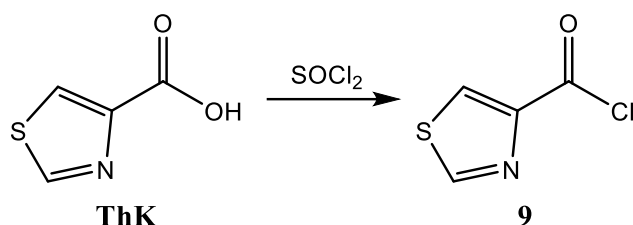
fáze na byla prosáta vzduchem a umístěna mezi listy filtračního papíru. Vznikla **ThK** ve formě bílého prášku.

Výtěžek: 1,80 g (88 %)

$^1\text{H NMR}$ (299 MHz, D_2O): $\delta = 9,10$ ppm (d, 1H, $^4J_{\text{HH}} = 2,07$ Hz), 8,38 ppm (d, 1H, $^4J_{\text{HH}} = 2,03$ Hz)

$^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, D_2O): $\delta = 163,13$ ppm (1C), 156,85 ppm (1C), 145,04 ppm (1C), 129,75 ppm (1C)

2.3.11 Příprava 4-thiazolkarbonyl chloridu (**9**)



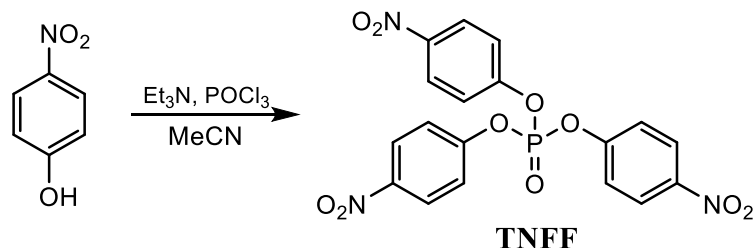
K 4,0 g (27,0 mmol) **ThK** bylo přidáno 26,5 ml (365 mmol, 13,5 ekv.) SOCl_2 . Směs byla zahřívána k varu 2 hodiny v lázni vyhřáté na 80 °C. Po uplynutí 2 hodin byla směs odpařena na RVO v digestoři. Vznikla oranžovo-hnědá pevná látka **9**.

Výtěžek: 3,60 g (90 %)

$^1\text{H NMR}$ (299 MHz, CDCl_3): $\delta = 8,92$ ppm (d, 1H, $^4J_{\text{HH}} = 2,09$ Hz), 8,51 ppm (d, 1H, $^4J_{\text{HH}} = 2,06$ Hz)

$^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CDCl_3): $\delta = 160,73$ ppm (1C), 154,19 ppm (1C), 150,23 ppm (1C), 132,10 ppm (1C)

2.3.12 Příprava tris(4-nitrofenol)fosfátu (TNFF)



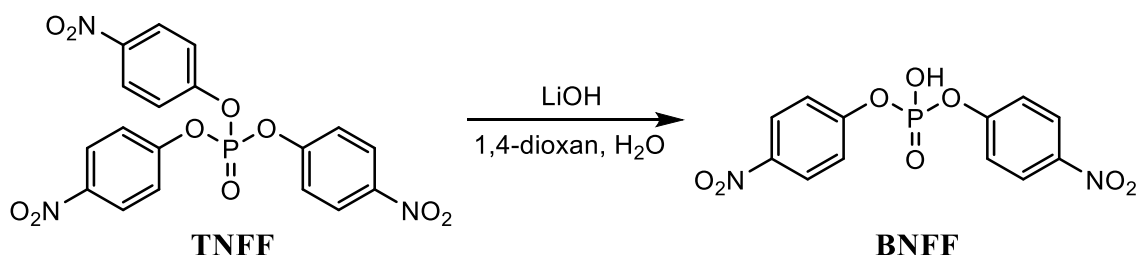
V 32 ml MeCN bylo rozpuštěno 4,47 g (32,2 mmol, 3 ekv.) 4-nitrofenolu a ke směsi bylo přidáno 4,47 ml (32,2 mmol, 3 ekv.) Et₃N. Za stálého míchání a chlazení v lázni voda:led bylo pomalu přikapáno 1,0 ml (10,7 mmol, 1 ekv.) POCl₃ v 10 ml MeCN. Směs byla míchána 1 hodinu při laboratorní teplotě. Poté bylo ke směsi přilito 200 ml vychlazené destilované vody. Vysrážel se **TNFF** ve formě bílé látky, která byla odfiltrována přes Büchnerovu nálevku a vysušena mezi listy filtračního papíru.

Výtěžek: 4,10 g (83 %)

¹H NMR (299 MHz, DMSO): $\delta = 8,36$ ppm (d, 6H, $^3J_{\text{HH}} = 9,05$ Hz), $7,64$ ppm (d, 6H, $^3J_{\text{HH}} = 9,00$ Hz)

³¹P NMR (121 MHz, DMSO): $\delta = -19,89$ ppm (s)

2.3.13 Příprava bis(4-nitrofenol)fosfátu (BNFF)



Bylo odváženo 13,4 g (29,1 mmol) **TNFF**, který byl rozpuštěn ve 100 ml vroucího 1,4-dioxanu. Dále bylo ke směsi přidáno 21,4 ml 3,9M roztoku LiOH a malé množství vody tak, aby byla směs homogenní. Reakční směs se okamžitě zbarvila do žluta. Směs byla míchána 30 min za laboratorní teploty. Následně bylo přidáváno malé množství silného kationového iontoměniče v H⁺ cyklu (Dowex 50) do doby, než se směs odbarvila (neutrální pH, indikace pH papírkem). Iontoměnič byl odfiltrován a promyt malým množstvím destilované H₂O. Filtrát byl odpařen na RVO za vzniku světle žlutého oleje, který byl

naředěn přidavkem H₂O tak, aby hodnota pH naředěného roztoku byla přibližně 2. Následovala extrakce Et₂O. Vodná fáze byla zahřata na 80 °C a silně okyselena pomalým přidáváním koncentrované HCl. Směs byla po vychladnutí odpařena na RVO. Odparek (surový **BNFF**) byl poté rekrystalizován z horké H₂O.

Výtěžek: 3,67 g (37 %)

¹H NMR (299 MHz, DMSO): $\delta = 8,20$ ppm (d, 6H, $^3J_{\text{HH}} = 9,09$ Hz), $7,41$ ppm (d, 6H, $^3J_{\text{HH}} = 8,71$ Hz)

³¹P NMR (121 MHz, DMSO): $\delta = -13,77$ ppm (s)

2.3.14 Příprava komplexu [Cu²⁺(L1)]

Do 3 ml vialky bylo odebráno 28,8 mg ($8,86 \cdot 10^{-2}$ mmol) látky **L1**, která byla rozpuštěna v 0,1 ml EtOH a naředěna 0,2 ml H₂O. Za míchání na magnetické míchačce bylo přikapáno 33,0 mg ($8,89 \cdot 10^{-2}$ mmol, 1,00 ekv.) Cu(ClO₄)₂ · 6H₂O v 0,2 ml H₂O. Směs se okamžitě zbarvila do zelena. Vzniklý roztok byl mírně zakalený. Proto byl obsah vialky rozdělen do tří dalších vialek, naředěn 1 ml H₂O a zahřán nad horkovzdušnou pistolí. Po zahřátí vznikl čirý zelený roztok. Obsah vialek byl spojen a odpařen na RVO. Po odpaření vznikl zelený prášek, který byl ponechán krystalizovat z vody volnou difúzí z acetonu.

Z části zeleného prášku byl připraven vzorek o koncentraci cca 0,75 mM (molární hmotnost byla odhadnuta se zanedbáním množství molekul krystalové vody, elementární analýza nebyla z časových důvodů provedena)

UV–VIS: $\lambda_{\text{max.}} = 630$ nm, $\epsilon_{\lambda} = 55,6$ l · mol⁻¹ · cm⁻¹

3. Diskuze a výsledky

3.1 Příprava 4-thiazolkarboxylové kyseliny (ThK) a reakce jejího chloridu (9)

Prvním úkolem v přípravě ligandu **L1** byla příprava thiazolové kotvy, respektive 4-thiazolkarboxylové kyseliny a následně 4-thiazolcarbonyl chloridu. Kromě postupu uvedeného v syntetické části této práce bylo vyzkoušeno několik postupů (Schéma 6).

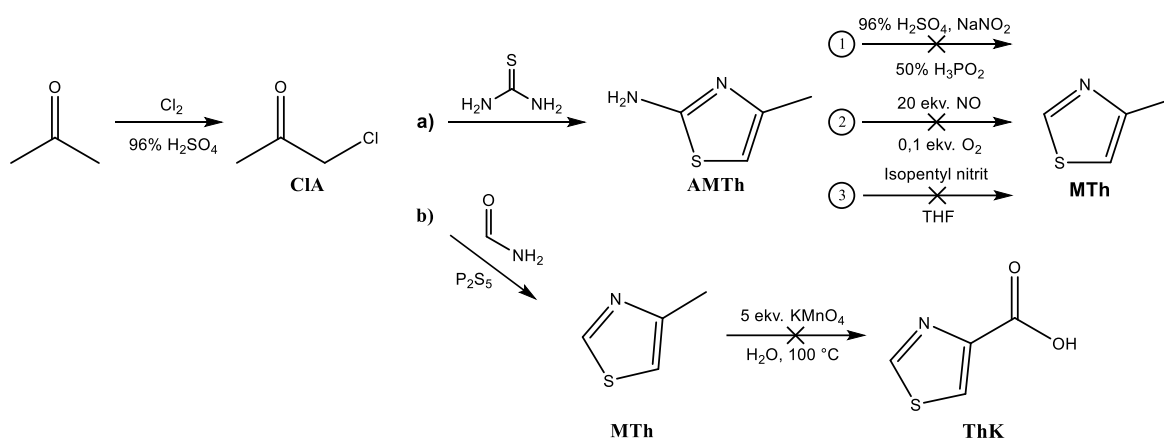


Schéma 6

Prvním krokem byla chlorace acetonu katalyzovaná přidavkem koncentrované H_2SO_4 . Vzhledem ke komerční dostupnosti byl chloroaceton (CIA) později zakoupen. Následovala syntetická cesta a) vedoucí k přípravě 2-amino-4-methylthiazolu (AMTh) reakcí CIA s thiomocovinou. Reakce probíhala s vysokým výtěžkem (92 %) a výsledný produkt měl vysokou čistotu. Pokusy o následnou deaminaci AMTh byly neúspěšné. Cesta číslo 1 prováděná podle patentu^[46] byla neúspěšná. Podle $^1\text{H NMR}$ spekter byla v měřeném vzorku produktu přítomna pouze nezreagovaná výchozí látka.

Způsob číslo 2 vedl přes zavádění oxidu dusnatého do směsi AMTh v THF. Výchozí látka nezreagovala. Pro uskutečnění pokusu číslo 3 podle upraveného postupu^[47] bylo nejprve nutné připravit isopentyl nitrit reakcí isopentanolu s NaNO_2 a koncentrovanou H_2SO_4 .

Reakce 3 byla prováděna v autoklávu a zahřívána na 60°C . Ve výsledné reakční směsi byla podle $^1\text{H NMR}$ spektra přítomna výchozí látka společně s minoritními nečistotami.

V důsledku neúspěšně deaminace byla zvolena syntetická cesta b) vedoucí přes přípravu 4-methylthiazolu (**MTh**) podle literatury^[48]. Záměrem bylo oxidovat methylovou skupinu manganistanem draselným opět podle patentu^[46].

Po několika neúspěšných pokusech byla **ThK** připravena reakcí **BrP** s **TF**. Byl také vyzkoušen postup, kdy se **TF** nepřipravoval odděleně. Tento postup spočíval ve smíchání **BrP** s formamidem a P_2S_5 v THF (*Schéma 7*). Po zpracování reakční směsi bylo naměřeno 1H NMR spektrum, ve kterém nebyl přítomen žádný signál v aromatické oblasti. To znamenalo, že nedošlo k vytvoření heterocyklu, a reakce tím pádem byla neúspěšná.

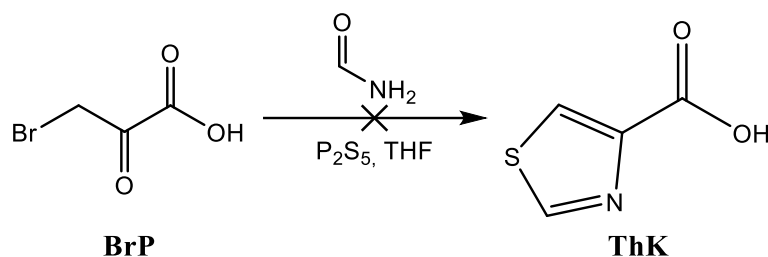
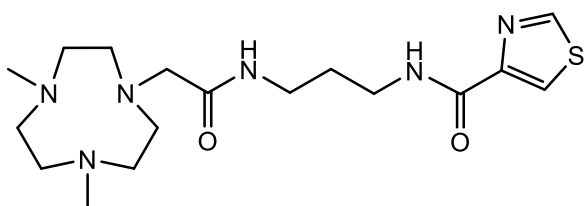


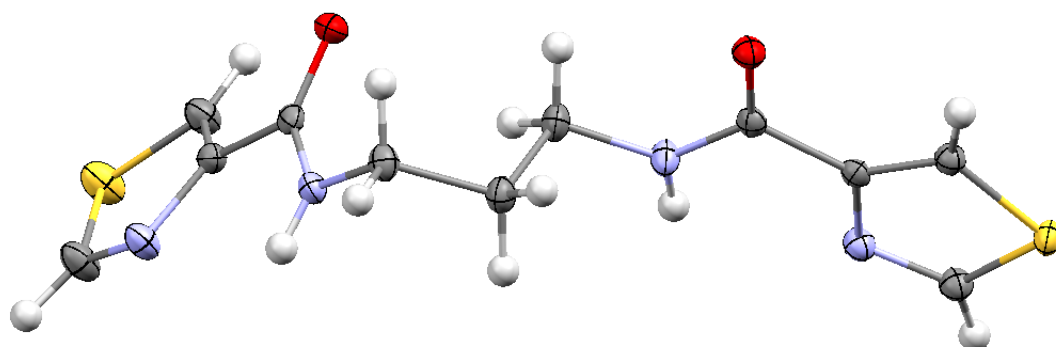
Schéma 7: Neúspěšná příprava ThK

Chlorace připravené **ThK** probíhala v $SOCl_2$ bez přidaného rozpouštědla. Po úspěšné přípravě látky **9** byla dále vyzkoušena její reakce s 1,3-propylendiaminem s cílem připravit *N*-(3-aminopropyl)-4-thiazolkarboxamid. Původním záměrem bylo tento amid připojit na 2-(4,7-dimethyl-1,4,7-triazonan-1-yl)acetylchlorid, a připravit tak ligand zobrazený na *Obr. 11*.



Obr. 11: Původní návrh ligandu

Nicméně reakce látky **9** s 1,3-propylendiaminem vedla primárně k bis-substituovanému amidu, který krystalizoval ve formě bílých jehlicovitých krystalů, kterým byla změřena rentgenová strukturní analýza (*Obr. 12*). Chtěný mono-substituovaný amid byl také izolován, ale výtěžky jeho přípravy byly nízké. Z tohoto důvodu byla zvolena syntéza ligandu **L1** uvedeného v syntetické části.



Obr. 12: RTG strukturní analýza *N,N'*-(propan-1,3-diyl)bis(thiazol-4-karboxamidu)

3.2 Příprava 1-benzyl-1,4,7-triazacyclonanu (3)

Reakce vedoucí k přípravě látky **1** byla prováděna nejen v 1,4-dioxanu (*Schéma 3*), ale i v toluenu s podobnými výtěžky.

Následující reakce látky **1** s benzylbromidem podle literatury^[44] probíhá přes noc. Bylo zjištěno, že lze postup optimalizovat a nechat směs reagovat pouze několik hodin, jelikož tvorba kvartérní amoniové soli **2** je téměř okamžitá.

Po dokončení reakce byla látka **2** odfiltrována přes fritu S3. Bylo rovněž vyzkoušeno i odpaření rozpouštědla přímo z baňky na RVO s podobnými výtěžky následné reakce.

Reakci látky **2** za vzniku látky **3** je nutné provádět ve velmi koncentrovaném roztoku hydroxidu (30% KOH) s EtOH, který zvyšuje rozpustnost výchozí látky. Byla vyzkoušena reakce v 3% roztoku NaOH, která během tří dní neproběhla.

3.3 Příprava 1-benzyl-4,7-dimethyl-1,4,7-triazacyclonanu (4)

Pro přípravu látky **4** Leuckartovou-Wallachovou reakcí byl použit 37% roztok formaldehydu a 99–100% HCOOH. Reakce byla vyzkoušena s různými nadbytky obou

přidaných reaktantů. Bylo zjištěno, že dostačující nadbytky jsou 17,6 ekv. 37% roztoku formaldehydu (1,30 ml/1 mmol) a 20,7 ekv. HCOOH (0,78 ml/1 mmol). Je možné, že HCOOH i formaldehyd není nutné přidávat v takovém nadbytku, avšak menší nadbytek obou reaktantů nebyl vyzkoušen z důvodu, že by došlo ke zmenšení objemu reakční směsi a horší manipulovatelnosti. Reakce probíhala bez problémů s vysokými výtěžky.

3.4 Příprava 1,4-dimethyl-1,4,7-triazacyclononanu (5)

Z důvodu různě dlouhé reakční doby hydrogenace látky **4** bylo vyzkoušeno několik objemových poměrů přidané CH₃COOH a MeOH. Byly vyzkoušeny objemové poměry 1:4, 1:10 a 1:15. Použitý poměr 1:10 byl vhodným kompromisem mezi reakční dobou a následným zpracováním reakční směsi. Hmotnost přidaného Pd/C se vždy pohybovala okolo 10 a více hm. % výchozí látky **4**. Právě přídavek odpovídající 10 hm. % výchozí látky se ukázal jako dostatečný. Reakční doba se pohybovala v rozmezí 1–3 dnů. Byla vyzkoušena i hydrogenace látky **4** ve formě hydrochloridu, která trvala déle než pokud byla do reakční směsi rozpuštěna látka **4** ve formě volného aminu. Důvodem byla nízká rozpustnost hydrochloridu **4** v MeOH. Zpracování reakční směsi po odfiltrování Pd/C probíhalo několika způsoby. Filtrát byl odpařen na RVO a následně byl k odparku přidán 10% roztok NaOH. Nevýhodou tohoto zpracování bylo, že okamžitě došlo k zasolení směsi CH₃COONa, který ztěžoval následnou extrakci do CHCl₃. Bylo vyzkoušeno i odfiltrování vzniklé soli přes fritu S4, která však většinu bílé látky propustila do filtrátu. Ideální zpracování reakční směsi bylo popsáno v syntetické části. Odparek byl několikrát odpařován s větším objemem destilované H₂O za účelem snazšího odpaření nadbytku CH₃COOH. Až poté byl k odparku nalit 10% roztok NaOH. Tímto způsobem nedocházelo k takovému zasolení reakční směsi a produkt při extrakci snadněji přecházel do organické fáze.

3.5 Příprava *N*-(3-brompropyl)ftalimidu (6)

Látka **6** byla připravována i podle alternativního postupu, ve kterém byla reakční směs zpracovávána nalitím do ledové destilované vody a následnou extrakcí do EtOAc. Po vysušení a odpaření spojených organických frakcí na RVO zůstal v baňce malý objem kapaliny obsahující neodpařený DMF a produkt. Pro vyvolání krystalizace bylo přidáno několik kapek ethanolu.

Krystalizace probíhala ze světle oranžové/žluté olejovité kapaliny. U obou popsaných postupů přípravy látky **6** se stávalo, že krystaly produktu byly nažloutlé. V takovém případě byly krystaly nejprve na fritě promyty ethanolem, a poté byly přeneseny do kádinky, kde byly rozpuštěny ve vroucím EtOH. Po rozpuštění krystalů byla směs ponechána chladnout při laboratorní teplotě. Po několika minutách se začaly ze směsi vylučovat bílé krystaly látky **6**.

3.6 Příprava 4,7-dimethyl-1-(3-ftalimidopropyl)-triazacyclononanu (**7**)

Po zpracování reakční směsi a naměření NMR spekter bylo cílem produkt **7** dočistit. Za tímto účelem byla vyzkoušena TLC v několika mobilních fázích (EtOAc, MeOH, MeOH:CH₂Cl₂ (2:10), hexan, aceton) s detekcí Dragendorffovým činidlem. V každé mobilní fázi zůstávala oranžová skvrna látky **7** na startu. Pouze v mobilní fázi NH₃:EtOH (1:5) měla skvrna nenulový retenční faktor. Tato mobilní fáze však nebyla vhodná na čištění látky **7** na sloupci silikagelu z důvodu bazicity NH₃, který by mohl částečně otvírat ftalimid. Z tohoto důvodu byl čištěn až produkt následné reakce.

3.7 Příprava 1-(3-aminopropyl)-4,7-dimethyl-1,4,7-triazacyclononanu (**8**)

Po zahřívání látky **7** v NH₂NH₂·H₂O a EtOH a následném odpaření na RVO vznikl tuhý bílo–hnědý odparek, který byl zpracován dvěma způsoby. První způsob spočíval v povaření odparku ve směsi EtOH:10% roztok KOH (1:1) po dobu 1 dne za účelem úplného otevření ftalhydrazidu, následném odpaření na RVO a extrakci z H₂O do CHCl₃. Druhý způsob je popsán v syntetické části. Odfiltrovaný světle hnědý ftalhydrazid byl ještě před zahříváním k varu v CHCl₃ umístěn v baňce do ultrazvuku na několik minut s cílem jemnějšího rozptýlení suspenze. Po ukončení zahřívání byl ftalhydrazid opět odfiltrován, tentokrát jako světlejší nahnědlý prášek. Zpracování reakční směsi druhým způsobem a následnou extrakcí vedl k vyššímu výtěžku reakce a k větší čistotě produktu oproti prvnímu způsobu.

Reakce vedoucí k přípravě látky **8** vždy probíhala s nízkými výtěžky. Kritickým krokem reakce bylo přidání CHCl₃ k odparku, odfiltrování ftalhydrazidu a odpaření výsledného filtrátu. Při jedné z příprav bylo po odfiltrování ftalhydrazidu a odpaření filtrátu na RVO izolováno 0,10 g hnědého oleje z původně 0,60 g výchozí látky **7**. Je tedy pravděpodobné, že látka **8** zůstává sorbována ve ftalhydrazidu a zcela se neuvolní ani po jeho povaření.

3.8 Příprava ligandu L1

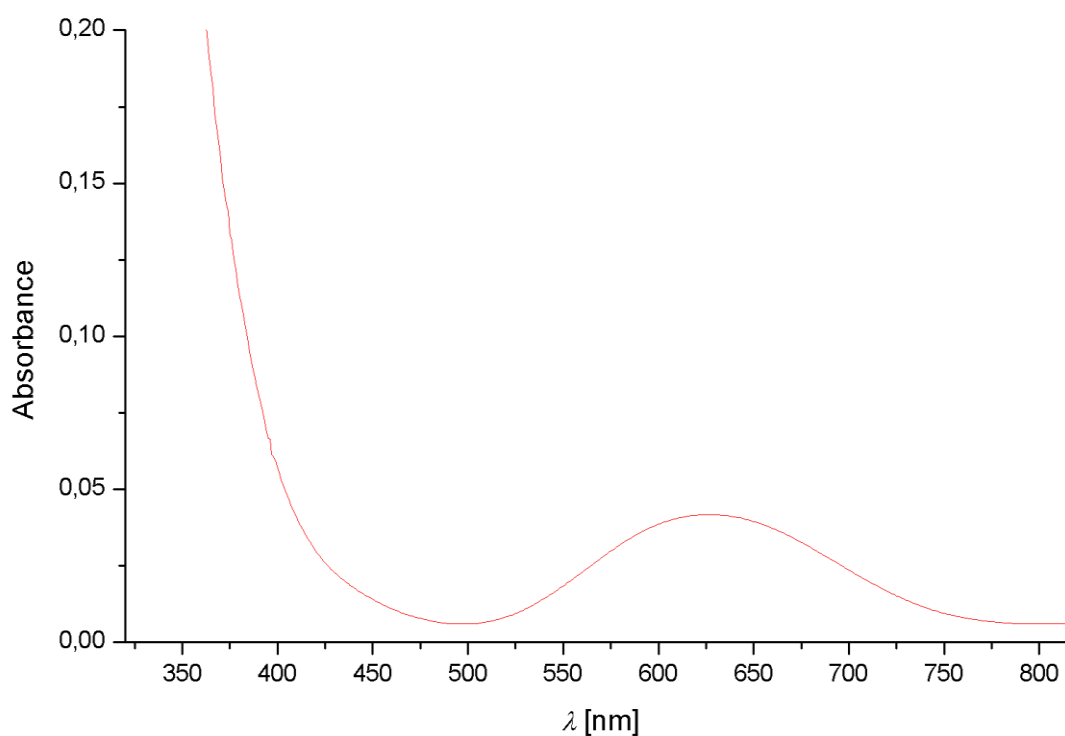
Jako báze při reakci látky **8** s látkou **9** byla použita DIPEA, která kvůli relativně vysoké teplotě varu zůstávala ve směsi přítomna i po odpaření na RVO. Z tohoto důvodu by bylo vhodné použít bázi s nižší teplotou varu jako například Et₃N. Za účelem odstranění báze a přečištění odpařené směsi byla provedena chromatografie na silikagelu. Průběh chromatografie byl sledován pomocí TLC. Čistý ligand **L1** byl izolován s výtěžkem 17 %.

3.9 Příprava BNFF

Původním záměrem bylo připravit **BNFF** z **TNFF** parciální alkalickou hydrolyzou ve vodě podle postupu^[49]. Nicméně **TNFF** se ve vodném roztoku NaOH nerozpouštěl ani při zahřátí reakční směsi k varu a reakce neproběhla. Z tohoto důvodu byl zvolen alternativní postup^[50], ve kterém hydrolyza probíhala ve vroucím 1,4-dioxanu, ve kterém se výchozí **TNFF** rozpustil.

3.10 Měření absorpčního spektra komplexu [Cu²⁺(L1)]

Bylo změřeno absorpční spektrum komplexu [Cu²⁺(**L1**)] v rozsahu 190–1100 nm. Vzhledem k použité koncentraci cca 0,75 mM je absorbance v UV–oblasti velmi vysoká, a proto není v *Grafu 1* UV–část spektra zahrnuta.



Graf 1: Absorpční spektrum komplexu $[\text{Cu}^{2+}(\text{L1})]$

3.11 Měření kinetiky hydrolýzy BNFF

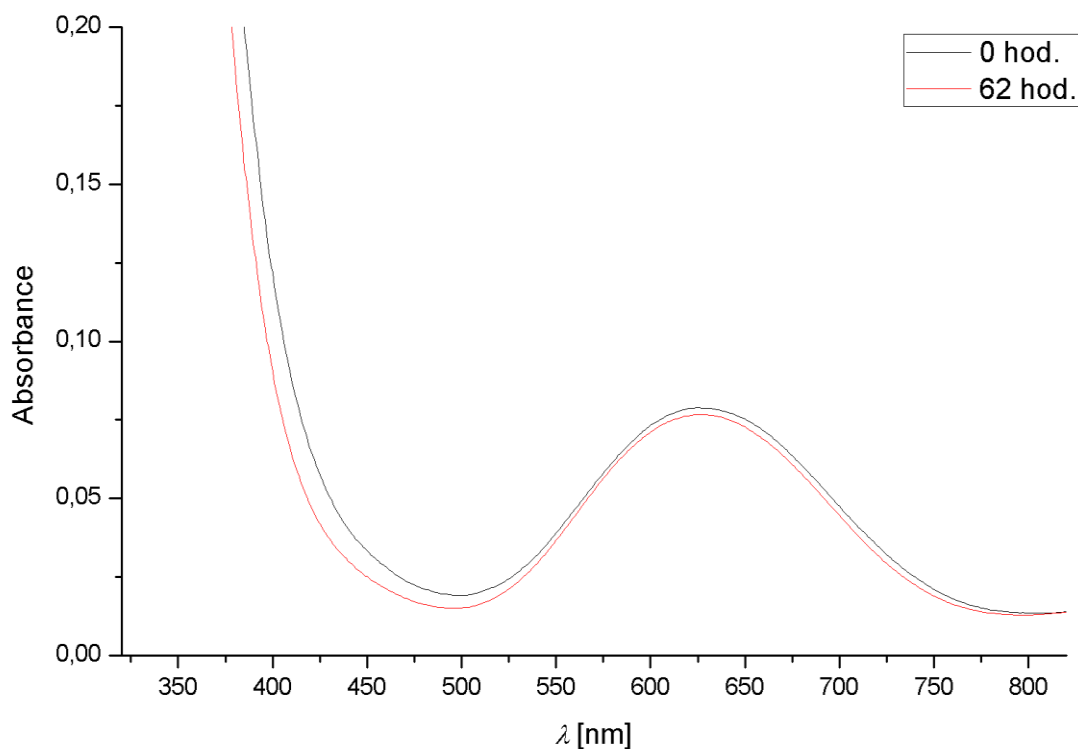
Za účelem měření kinetiky hydrolýzy **BNFF** byly připraveny vzorky se složením uvedeným v *Tabulce 2*. Byly pipetovány zásobní roztoky o koncentracích $c_{([\text{Cu}^{2+}(\text{L1})]} = 10 \text{ mM}$, $c_{(\text{Cu}(\text{ClO}_4)_2)} = 10 \text{ mM}$, $c_{(\text{BNFF})} = 150 \text{ }\mu\text{M}$ a $c_{(\text{MOPS})} = 0,10 \text{ M}$. Průběh reakce byl sledován při $25 \text{ }^\circ\text{C}$ a $50 \text{ }^\circ\text{C}$.

Tabulka 2: Složení měřených roztoků

Složka	Blank		Vzorek 1		Vzorek 2	
	$V [\mu\text{l}]$	$c [\text{mM}]$	$V [\mu\text{l}]$	$c [\text{mM}]$	$V [\mu\text{l}]$	$c [\text{mM}]$
$[\text{Cu}^{2+}(\text{L1})]$	–	–	100	1	–	–
$\text{Cu}^{2+}_{(\text{aq})}$ *	–	–	–	–	100	1
BNFF	100	0,015	100	0,015	100	0,015
MOPS	500	50	500	50	500	50
H_2O	400	–	300	–	300	–

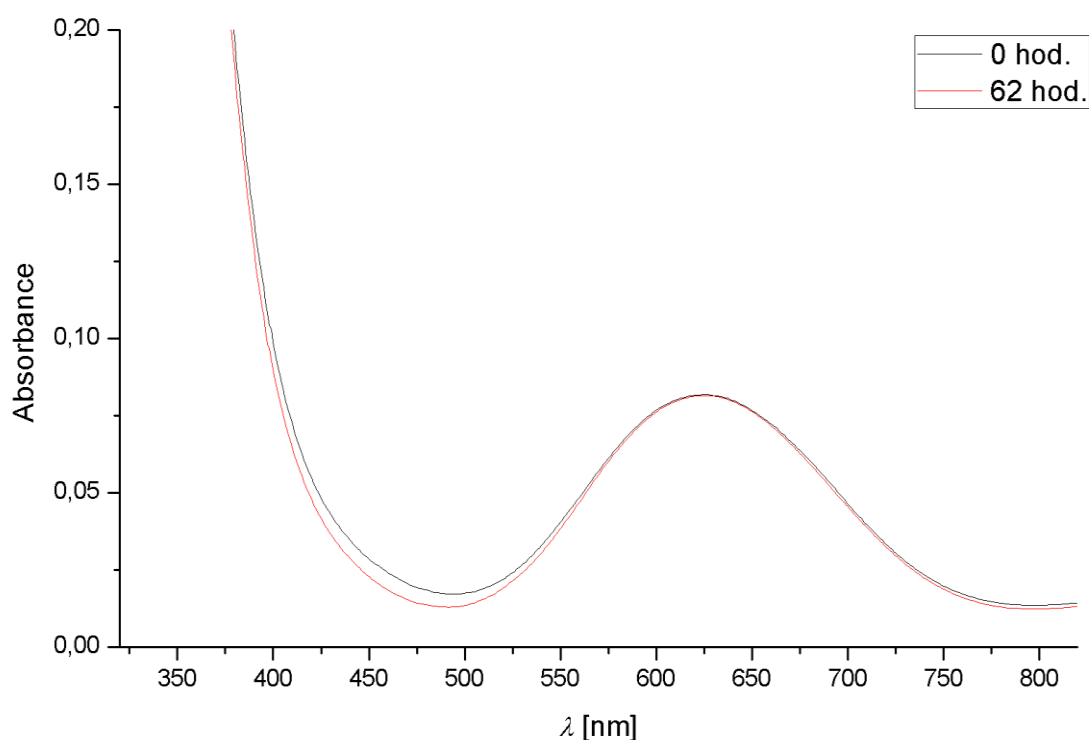
* $\text{Cu}(\text{ClO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

Absorpční spektra *Vzorku 1* o pH = 3,50 byla měřena v intervalu 2 hodin po dobu 62 hodin při teplotě 50 °C. V měřeném časovém úseku nebyla pozorována žádná spektrální změna, která by indikovala hydrolyzu **BNFF** (*Graf 2*).



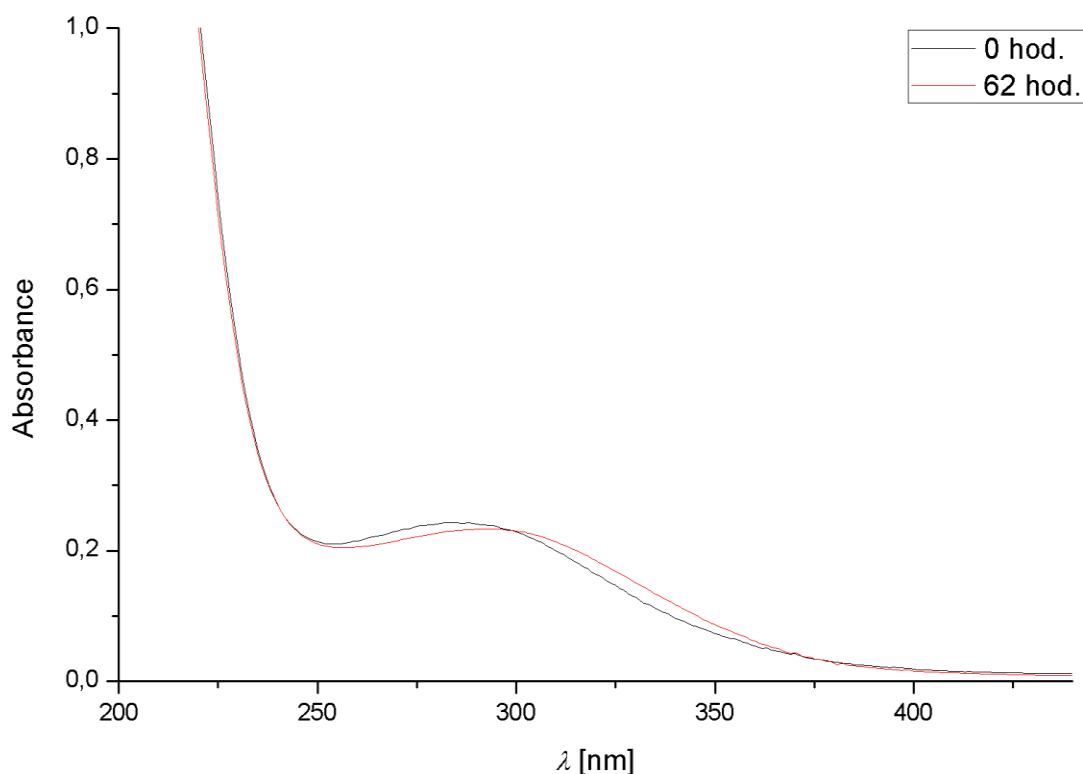
Graf 2: Absorpční spektra – měření hydrolyzy **BNFF** roztokem komplexu [Cu²⁺(**L1**)] (*Vzorek 1*) o pH = 3,50 (pro přehlednost jsou uvedena absorpční spektra naměřená na počátku a na konci měření)

Po ukončení měření bylo pH *Vzorku 1* upraveno přidavkem 24 μl 5% roztoku NaOH na hodnotu 7,40. Průběh reakce byl sledován po dobu 62 hodin (interval měření 2 hodiny) při teplotě 25 °C (*Graf 2*). Opět nebyla zaznamenána žádná významná spektrální změna.



Graf 2: Absorpční spektra – měření hydrolýzy **BNFF** roztokem komplexu [Cu²⁺(**L1**)] o pH = 7,40 (pro přehlednost jsou uvedena absorpční spektra naměřená na počátku a na konci měření)

Absorpční spektra *Vzorku 2* o pH = 4,95 byla měřena za účelem srovnání hydrolytické aktivity aquaiontů Cu²⁺ a komplexu [Cu²⁺(**L1**)]. Průběh reakce byl sledován po dobu 62 hodin (interval měření 2 hodiny) při teplotě 50 °C (*Graf 3*). V měřeném časovém úseku rovněž nebyla pozorována žádná významná spektrální změna.



Graf 3: Absorpční spektra – měření hydrolýzy **BNFF** roztokem aquaiontu Cu^{2+} (Vzorek 2) o $\text{pH} = 4,95$ (pro přehlednost jsou uvedena pouze spektra naměřená na počátku a na konci měření)

Je zjevné, že ve zvoleném rozsahu teplot a pH nedochází k hydrolýze **BNFF**. Byla však prokázána stabilita připraveného měďnatého komplexu – při $\text{pH} = 3,50$ nedocházelo k jeho kyselé katalyzované disociaci. Pro budoucí měření kinetiky bude nutné optimalizovat podmínky a složení měřených vzorků.

4. Závěr

V rámci této bakalářské práce byl připraven ligand **L1** a jeho komplex $[\text{Cu}^{2+}(\text{L1})]$. Dále byl připraven modelový substrát **BNFF**. Hydrolytická aktivita komplexu $[\text{Cu}^{2+}(\text{L1})]$ nebyla za stanovených podmínek a doby měření pozorována. Nicméně byla zavedena metodika pro budoucí měření kinetiky hydrolýzy fosfoesterové vazby.

5. Seznam použitých zkratek

PVC	– polyvinylchlorid
DNA	– deoxyribonukleová kyselina
RNA	– ribonukleová kyselina
mRNA	– mediátorová ribonukleová kyselina
BNFF	– bis(4-nitrofenyl)fosfát
BDNFF	– bis(2,4-dinitrofenyl)fosfát
ENFF	– ethyl-(4-nitrofenyl)fosfát
HPNFF	– 2-hydroxypropyl-4-nitrofenylfosfát
UNFF	– uridin 3' -nitrofenylfosfát
NF	– 4-nitrofenoxidové ionty
NFF	– 4-nitrofenylfosfát
TACN	– 1,4,7-triazacyklononan
Cyklen	– 1,4,7,10-tetraazacyklododekan
Cyklam	– 1,4,8,11-tetraazacyklotetradekan
Bipy	– bipyridin
Tach	– 1,3,5-triaminocyklohexan
Tren	– tris(2-aminoethyl)amin
PEDOT	– poly(3,4-ethyldioxythiofen)
NMR	– nukleární magnetická rezonance
TLC	– thin layer chromatography (chromatografie na tenké vrstvě)
MS	– mass spectrometry (hmotnostní spektrometrie)
R_f	– retenční faktor
RVO	– rotační vakuová odparka
THF	– tetrahydrofuran
EtOH	– ethanol
MeOH	– methanol
DMF	– dimethylformamid
MeCN	– acetonitril
DIPEA	– <i>N,N</i> -diisopropylethylamin
TBAI	– tetrabutylamoniumjodid
Et ₃ N	– triethylamin
EtOAc	– ethyl-acetát
MOPS	– 3-(<i>N</i> -morfolino)propansulfonová kyselina

6. Seznam použité literatury

- [1] Schierholz, J. M., & Beuth, J. Implant infections: a haven for opportunistic bacteria. *Journal of Hospital Infection*. 2001, 49(2), 87–93.
- [2] Rivera, A. M., Strauss, K. W., Zundert, A. A., & Mortier, E.P. The history of peripheral intravenous catheters: how little plastic tubes revolutionized medicine. *Acta anaesthesiologica Belgica*. 2005, 56(3), 271–82.
- [3] Donlan R. M. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerging infectious diseases*. 2002, 8(9), 881–890.
- [4] Donlan, R. M., & Costerton, J. W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews*. 2002, 15(2), 167–193.
- [5] Flemming, H.-C. & Wingender, J. The biofilm matrix. *Nature reviews. Microbiology*. 2010, 8(9), 623–33.
- [6] Musk Jr., D., & Hergenrother, P. Chemical countermeasures for the control of bacterial biofilms: Effective compounds and promising targets. *Current Medicinal Chemistry*. 2006, 13(18), 2163–2177.
- [7] RESEARCH ON MICROBIAL BIOFILMS. *National Institutes of Health (NIH)*. <https://grants.nih.gov/grants/guide/pa-files/pa-03-047.html> [online, citace 8.6.2020]
- [8] Ceri, H., Olson, M. E., Stremick, C., Read, R. R., Morck, D., & Buret, A. The Calgary Biofilm Device: new technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms. *Journal of Clinical Microbiology*. 1999, 37(6), 1771–1776.
- [9] Davies, D. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2003, 2(2), 114–122.
- [10] Stewart, P. S., & William Costerton, J. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *The Lancet*. 2001, 358(9276), 135–138.
- [11] Costerton, J. W., Lewandowski, Z., Caldwell, D. E., Korber, D. R., & Lappin-Scott, H. M. Microbial biofilms. *Annual Review of Microbiology*. 1995, 49(1), 711–745.
- [12] Werner, E., Roe, F., Bugnicourt, A., Franklin, M. J., Heydorn, A., Molin, S., Stewart, P. S. Stratified growth in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*. 2004, 70(10), 6188–6196.
- [13] Gilbert, P., Allison, D. & McBain, A. Biofilms *in vitro* and *in vivo*: do singular mechanisms imply cross-resistance?. *Journal of Applied Microbiology*, 2002, 92: 98–110.
- [14] Wu, H., Moser, C., Wang, H.-Z., Høiby, N., & Song, Z.-J. Strategies for combating bacterial biofilm infections. *International Journal of Oral Science*. 2014, 7(1), 1–7.
- [15] Hughes, G., & Webber, M. A. Novel approaches to the treatment of bacterial biofilm infections. *British Journal of Pharmacology*. 2017, 174(14), 2237–2246.

- [16] Romanò, C. L., Tsuchiya, H., Morelli, I., Battaglia, A. G., & Drago, L. Antibacterial coating of implants: are we missing something? *Bone & Joint Research*. 2019, 8(5), 199–206.
- [17] Chen, Z., Wang, Z., Ren, J., & Qu, X. Enzyme mimicry for combating bacteria and biofilms. *Accounts of Chemical Research*. 2018, 51(3), 789–799.
- [18] Yu, Z., & Cowan, J. A. Metal complexes promoting catalytic cleavage of nucleic acids-biochemical tools and therapeutics. *Current Opinion in Chemical Biology*. 2018, 43, 37–42.
- [19] Raman, N., Thalamuthu, S., Dhiveethuraja, J., Neelakandan, M. A., & Banerjee, S. DNA cleavage and antimicrobial activity studies on transition metal(II) complexes of 4-aminoantipyrine derivative. *Journal of the Chilean Chemical Society*. 2008, 53(1).
- [20] Djoko, K. Y., Goytia, M. M., Donnelly, P. S., Schembri, M. A., Shafer, W. M., & McEwan, A. G. Copper(II)-bis(thiosemicarbazone) complexes as antibacterial agents: insights into their mode of action and potential as therapeutics. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2015, 59(10), 6444–6453.
- [21] Qin, Z., Ou, Y., Yang, L., Zhu, Y., Tolker-Nielsen, T., Molin, S., & Qu, D. Role of autolysin-mediated DNA release in biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis*. *Microbiology*. 2007, 153(7), 2083–2092.
- [22] Mann E. E, Rice K. C, Boles B. R, Endres J. L, Ranjit D, et al. Modulation of eDNA release and degradation affects *Staphylococcus aureus* biofilm maturation. *PLoS ONE*. 2009, 4(6): e5822.
- [23] Schroeder, G. K., Lad, C., Wyman, P., Williams, N. H., & Wolfenden, R. The time required for water attack at the phosphorus atom of simple phosphodiester and of DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2006, 103(11), 4052–4055.
- [24] Westheimer, F. Why nature chose phosphates. *Science*. 1987, 235(4793), 1173–1178.
- [25] Desbouis, D., Troitsky, I. P., Belousoff, M. J., Spiccia, L., & Graham, B. Copper(II), zinc(II) and nickel(II) complexes as nuclease mimetics. *Coordination Chemistry Reviews*. 2012, 256(11-12), 897–937.
- [26] Hegg, E. L., & Burstyn, J. N. Toward the development of metal-based synthetic nucleases and peptidases: a rationale and progress report in applying the principles of coordination chemistry. *Coordination Chemistry Reviews*. 1998, 173(1), 133–165.
- [27] Yu, Xiaoqi, & Ji Zhang. *Macrocyclic polyamines: Synthesis and applications.*, John Wiley and Sons. 2018.
- [28] Hendry, P., & Sargeson, A. M. Metal ion promoted phosphate ester hydrolysis. Intramolecular attack of coordinated hydroxide ion. *Journal of the American Chemical Society*. 1989, 111(7), 2521–2527.
- [29] Sissi, C., & Palumbo, M. Effects of magnesium and related divalent metal ions in topoisomerase structure and function. *Nucleic Acids Research*. 2009, 37(3), 702–711.

- [30] Peana, M. & Zoroddu, M. & Medici, S. & Nurchi, V. & Crisponi, G. & A. The essential metals for humans: a brief overview. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 2019, 195, 120–129.
- [31] Fry, F. H., Fischmann, A. J., Belousoff, M. J., Spiccia, L., & Brügger, J. Kinetics and mechanism of hydrolysis of a model phosphate diester by $[\text{Cu}(\text{Me}_3\text{tacn})(\text{OH}_2)_2]^{2+}$ ($\text{Me}_3\text{tacn} = 1,4,7\text{-Trimethyl-1,4,7-triazacyclononane}$). *Inorganic Chemistry*. 2005, 44(4), 941–950.
- [32] Bím, D., Rulíšek, L., Hodačová, J. Syntetické modely metaloenzymů katalyzující štěpení fosfodiesterové vazby. *Chem. Listy*. 2015, 109, 658–665.
- [33] Jones, D. R., Lindoy, L. F., & Sargeson, A. M. Hydrolysis of phosphate esters bound to cobalt(III). Kinetics and mechanism of intramolecular attack of hydroxide on coordinated 4-nitrophenyl phosphate. *Journal of the American Chemical Society*. 1983, 105(25), 7327–7336.
- [34] De Rosch, M. A., & Trogler, W. C. Hydrolysis of phosphodiester with nickel(II), copper(II), zinc(II), palladium(II), and platinum(II) complexes. *Inorganic Chemistry*. 1990, 29(13), 2409–2416.
- [35] Mewis, R. E., & Archibald, S. J. Biomedical applications of macrocyclic ligand complexes. *Coordination Chemistry Reviews*. 2010, 254(15-16), 1686–1712.
- [36] Chaudhuri P., Wieghardt K.. The chemistry of 1,4,7-triazacyclononane and related tridentate macrocyclic compounds. *John Wiley and Sons, Inc.*, 1987.
- [37] Harris, E. D. Copper homeostasis: The role of cellular transporters. *Nutrition Reviews*. 2009, 59(9), 281–285.
- [38] Deck, K. M., Tseng, T. A., & Burstyn, J. N. Triisopropyltriazacyclononane copper(II): An efficient phosphodiester hydrolysis catalyst and DNA cleavage agent. *Inorganic Chemistry*. 2002, 41(4), 669–677.
- [39] Belousoff, M. J., Battle, A. R., Graham, B., & Spiccia, L. Syntheses, structures and hydrolytic properties of copper(II) complexes of asymmetrically N-functionalised 1,4,7-triazacyclononane ligands. *Polyhedron*. 2007, 26(2), 344–355.
- [40] Deal, K. A., & Burstyn, J. N. Mechanistic studies of dichloro(1,4,7-triazacyclononane)copper(II)-catalyzed phosphate diester hydrolysis. *Inorganic Chemistry*. 1996, 35(10), 2792–2798.
- [41] Kirby, A. J., & Younas, M. The reactivity of phosphate esters. diester hydrolysis. *Journal of the Chemical Society B: Physical Organic*. 1970, 510.
- [42] Mantione, D. & del Agua, Isabel & Sanchez-Sanchez, Ana & Mecerreyes, D. Poly(3,4-ethylenedioxythiophene) (PEDOT) derivatives: Innovative conductive polymers for bioelectronics. 2017, *Polymers*. 9. 354.
- [43] Sakunpongpitorn, P., Phasuksom, K., Paradee, N., & Sirivat, A. Facile synthesis of highly conductive PEDOT:PSS via surfactant templates. *RSC Advances*. 2019, 9(11), 6363–6378.

- [44] Holub, J., Meckel, M., Kubíček, V., Rösch, F., & Hermann, P. Gallium(III) complexes of NOTA-bis (phosphonate) conjugates as PET radiotracers for bone imaging. *Contrast Media & Molecular Imaging*. 2014, 10(2), 122–134.
- [45] Špánek, J. Koordinační sloučeniny jako kontrastní látky pro ^{19}F -MRI. *Univerzita Karlova v Praze*. 2018, Praha.
- [46] Bi, H., Zhi, C., Zhang, Y. Preparation of thiabendazole. CN 104557902 A, 2015.
- [47] Röder L, Nicholls A. J., Baxendale I. R. Flow Hydrodediazonation of aromatic heterocycles. *Molecules*. 2019, 24(10):1996.
- [48] Ganapathi, K., Venkataraman, A. Chemistry of the thiazoles. *Proceedings of the Indian Academy of Sciences - Section A*. 1945, 22(6), 362–378.
- [49] Bansal, H. S. Bis(p-nitrophenyl) hydrogen phosphate. *Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis*. 2001.
- [50] Moffatt, J. G. A new method of phosphorylation and the synthesis of some phosphate esters of biological interest (T). *University of British Columbia*. 1956.