

**Univerzita Karlova  
Přírodovědecká fakulta**

**ANORGANICKÁ CHEMIE**



## **DIPLOMOVÁ PRÁCE**

**KOORDINAČNÍ CHEMIE FARMAK**

**COORDINATION CHEMISTRY OF PHARMACEUTICALS**

Bc. Zuzana Malová

Vedoucí práce/školitel:

Prof. RNDr. Ivan Lukeš, CSc.

Konzultanti: doc. RNDr. Jan Kotek CSc.

Praha, 2020

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem zadanou závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její část nebyla použita k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 14.08.2020

Podpis:

Bc. Zuzana Malová

## **Pod'akovanie**

V prvej rade by som sa chcela pod'akovať môjmu školiteľovi prof. Ivanovi Lukešovi za vedenie práce a trpezlivosť preukázanú počas jej prípravy. Tiež by som sa chcela pod'akovať kolektívu vedenia nášho laboratória, doc.Vojtovi Kubíčkovi, doc. Janovi Kotkovi a prof. Petrovi Hermannovi za cenné rady počas experimentálnej časti či už sa jednalo o rady pri syntéze alebo vyhodnocovaní výsledkov. Za pomoc a rady pri potenciometrických meraniach by som sa chcela pod'akovať RNDr. Jane Havlíčkovej. Pod'akovanie tiež patrí aj RNDr. Ivane Císařovej, ktorá namerala XRD získanej látky.

V neposlednej rade by som chcela pod'akovať všetkým z laboratória č. 19, ktorí mi zlepšili prácu príjemnou a priateľskou atmosférou, hlavne Margaréte a Lucke. Taktiež pod'akovanie patrí aj ľuďom, ktorí ma podporovali mimo laboratórium a to hlavne mojím rodičom, všetkým súrodencom a priateľovi Jeníkovi za povzbudzovanie pri štúdiu.

## **Abstrakt**

Súčasné možnosti diagnostiky neurodegeneratívnych chorôb sú iba obmedzené a v klinickej praxi chýbajú. Táto práca je zameraná na užitie pozitronovej emisnej tomografie s použitím izotopu  $^{64}\text{Cu}(\text{II})$ . Pre tento účel boli navrhnuté dve kontrastné látky obsahujúce ligand ku koordinácií  $\text{Cu}(\text{II})$  a derivát thioflavínu T ako fluorescenčnú značku a zároveň cieleňú časť molekuly. Štruktúra derivátu thioflavínu T bola charakterizovaná röntgenoštruktúrnou analýzou. Derivát thioflavínu T má vysokú afinitu k vznikajúcim amyloidom a po naviazaní do ich štruktúry má zosilnené fluorescenčné vlastnosti. Navrhnuté ligandy sú tetraazacykly. V prvom prípade ide o diamid, kedy derivát thioflavínu T je súčasťou makrocyclického kruhu. Druhý vybraný ligand je spojený s derivátom thioflavínu T cez linker.

### **Kľúčové slová:**

komplexy; farmaka; prechodné kovy

## **Abstract**

Present methods for diagnosis of neurodegenerative diseases are rather limited and in clinical practise are missing. This thesis is focused on utilization of the positron emission tomography using isotope  $^{64}\text{Cu}(\text{II})$ . For the project, two contrast agents were proposed containing ligand for Cu (II) coordination and thioflavine T derivative as fluorescent dye, also as a targeting compound. Structure of the thioflavine T derivative was defined by X-ray structural analysis. The selected fluorescent dye has a high affinity for incipient amyloids and, when bound to their structure, has enhanced fluorescent properties. The proposed ligands are tetraazacyclic. The first one is a diamide, where the thioflavin T derivative is part of a macrocyclic ring. The second selected ligand is linked to the thioflavin T derivative via a linker.

### **Key words:**

complexes; pharmaceuticals; transition metals

## Zoznam skratiek

5-HT1A	sérotonínový receptor 5-hydroxytryptamínu, podjednotka 1
5-HT2A	sérotonínový receptor 5-hydroxytryptamínu, podjednotka 2
[ <sup>11</sup> C]-MP4A	<i>N</i> - <sup>11</sup> C-metylpiperidyl-4-yl acetát
[ <sup>11</sup> C]-PMP	<i>N</i> - <sup>11</sup> C-metylpiperidín-4-yl propionát
[ <sup>18</sup> F]6-fluoro-L-DOPA	6-[ <sup>18</sup> F]-fluoro-3,4-dihydroxy-fenylalanín
[ <sup>18</sup> F]BAY 94-9172	[ <sup>18</sup> F]fluórbetabén
[ <sup>18</sup> F]FDDNP	(2-(1-{6-[(2-[ <sup>18</sup> F]fluoroetyl(metyl)amino]-2-naftyl}-2-etylidén)-malonitril
[ <sup>18</sup> F]FDG	[ <sup>18</sup> F]-2-fluoro-2-deoxyglukóza
A30P	mutácia proteínu $\alpha$ -synucleinu spôsobujúca zmenu alanínu v pozícií 30 na prolín
A53T	mutácia proteínu $\alpha$ -synucleinu spôsobujúca zmenu alanínu v pozícií 53 na treonín
AADC	aromatická aminokyselinová dekarboxyláza
AD	Alzheimerova choroba
APP	amyloidný proteínový prekursor
BBB	hematoencefalická bariéra
CJD	Creutzfeldt-Jakobova choroba
CT	počítačová tomografia
DCC	<i>N,N'</i> -dicyklohexylkarbodiimid
DCM	dichlórmetán
diad	diisopropylazodikarboxylát
DIPEA	<i>N,N</i> -diizopropyletylamín
E22 $\Delta$	neprítomnosť glutamovej kyseliny v pozícií 22 u proteínu APP
E22K	zámena glutamovej kyseliny v pozícií 22 u proteínu APP za lyzín
EDC	1-etyl-3-(3-dimetylaminopropyl)karbodiimid
ER	endoplasmatické retikulum
EtOAc	etylacetát
EtOH	etanol
GFP	zelený fluorescenčný proteín
HD	Huntingtonova choroba
Hex	hexán

mAChRs	muskarínové acetylcholinové receptory
MCI	mierna kognitívna porucha
MeCN	acetonitril
MeOH	metanol
MRI	zobrazovanie magnetickou rezonanciou
MS	hmotnostná spektrometria
nAChRs	nikotinické acetylcholinové receptory
NFT	intracelulárna neurofibrilárna spleť
NMR	nukleárna magnetická rezonancia
OR	štyrikrát sa opakujúca sekvencia ôsmich aminokyselín
PD	Parkinsonova choroba
PET	pozitronová emisná tomografia
PiB	Pittsburghská zlúčenina B
polyQ	sekvencia za sebou idúcich glutamínov
PrP	prionový proteín
PrP <sup>Sc</sup>	prionový proteín v $\beta$ -štruktúre
$R_f$	retenčný faktor
ROS	reaktívne formy kyslíka
RVO	rotačná vákuová odparka
RT	laboratórna teplota
SPECT	jednofotónová emisná výpočtová tomografia
THF	tetrahydrofurán
ThT	thioflavín T
TFA	trifluoroctová kyselina
TLC	chromatografia na tenkej vrstve

# Obsah

<b>1 TEORETICKÝ ÚVOD .....</b>	<b>10</b>
1.1 NEURODEGENERATÍVNE CHOROBY .....	10
1.2 DIAGNOSTIKA A TERAPIA NEURODEGENERATÍVNYCH CHORÔB.....	13
1.2.1 Vlastnosti a diagnostika pomocou thioflavínu T .....	13
1.2.2 Terapia neurodegeneratívnych chorôb.....	15
1.3 POZITRÓNOVÁ EMISNÁ TOMOGRAFIA (PET).....	16
1.3.1 [ <sup>11</sup> C]PET.....	17
1.3.2 [ <sup>18</sup> F]PET.....	18
1.3.3 PET a neurodegeneratívne choroby .....	18
1.3.4 Prehľad využívaných rádioligandov.....	19
<b>2 CIEĽ PRÁCE .....</b>	<b>24</b>
<b>3 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ.....</b>	<b>26</b>
3.1 ZOZNAM POUŽITÝCH CHEMIKÁLIÍ .....	26
3.2 METÓDY CHARAKTERIZÁCIE LÁTOK .....	26
3.2.1 Chromatografia na tenkej vrstve (TLC).....	26
3.2.2 Vysokoučinná kvapalinová chromatografia (HPLC).....	26
3.2.3 FLASH chromatografia .....	27
3.2.4 Nukleárna magnetická rezonancia (NMR).....	27
3.2.5 Hmotnostná spektrometria (MS) .....	27
3.2.6 Röntgenoštruktúrna analýza (XRD) .....	27
3.2.7 Potenciometria .....	27
3.2.8 UV-Vis titrácie.....	28
3.3 SYNTETICKÁ ČASŤ .....	29
3.3.1 Príprava derivátu thioflavínu T.....	29
3.3.2 Pokus o prípravu 4-(benzo[d]thiazol-2-yl)-3-metoxyanilínu (1a), prevzaté z ref <sup>13</sup> .....	30
3.3.3 Pokus o prípravu 4-(benzo[d]oxazol-2-yl)-3-metoxyanilínu (1b), prevzaté z ref <sup>30</sup> .....	31
3.3.4 Syntéza 2-(4-nitrofenyl)benzo[d]thiazolu (2), prevzaté z ref <sup>31</sup> .....	32
3.3.4.1 Charakterizácia 2-(4-nitrofenyl)benzo[d]thiazolu .....	32
3.3.5 Syntéza 4-(benzo[d]thiazol-2-yl)anilínu (3).....	33
3.3.5.1 Redukcia pomocou chloridu cinnatého, prevzaté z ref <sup>32</sup> .....	33
3.3.5.2 Redukcia pomocou železných pilín v prostredí chloridu vápenatého, prevzaté z ref <sup>33</sup> .....	33



3.3.5.3 Redukcia pomocou paládia na uhli v prostredí vodíku, prevzaté z ref <sup>84</sup> .....	34
3.3.5.4 Charakterizácia 4-(benzo[d]thiazol-2-yl)anilínu .....	35
3.3.6 Príprava ligandu L1 .....	36
3.3.6.1 Syntéza reaktantov pre testovanie cyklizácie.....	36
3.3.6.2 Testovanie cyklizačných reakcií.....	37
3.3.7 Syntéza 2,6-bis(ftalimidometyl)pyridínu (4), prevzaté z ref <sup>85</sup> .....	38
3.3.7.1 Charakterizácia 2,6-bis(ftalimidometyl)pyridínu .....	38
3.3.8 Syntéza 2,6-bis(aminometyl)pyridínu (5), prevzaté z ref <sup>85</sup> .....	39
3.3.8.1 Charakterizácia 2,6-bis(aminometyl)pyridínu.....	39
3.3.9 Syntéza 2,6-bis(chlóracetamidmetyl)pyridínu (6), prevzaté z ref <sup>86</sup> .....	40
3.3.9.1 Charakterizácia 2,6-bis(chlóracetamidmetyl)pyridínu.....	40
3.3.10 Syntéza di-terc-butyl-2,2'-(fenylazandiyl)diacetátu (7), prevzaté z ref <sup>87</sup> .....	41
3.3.10.1 Charakterizácia di-terc-butyl-2,2'-(fenylazandiyl)diacetátu .....	41
3.3.11 Syntéza 2,2'-(fenylazandiyl)dioctovej kyseliny (8).....	42
3.3.11.1 Bazická hydrolyza, prevzaté z ref <sup>88</sup> .....	42
3.3.11.2 Kyslá hydrolyza, prevzaté z ref <sup>89</sup> .....	42
3.3.11.3 Charakterizácia 2,2'-(fenylazandiyl)dioctovej kyseliny .....	43
3.3.12 Príprava 2,2'-(fenylazandiyl)diacetyl chloridu (9) prevzaté z ref <sup>90</sup> .....	44
3.3.12.1 Charakterizácia 2,2'-(fenylazandiyl)diacetyl chloridu.....	44
3.3.13 Testovanie cyklizačných reakcií ako podklad pre prípravu ligandu L1.....	45
3.3.13.1 Postup 1.....	45
3.3.13.2 Postup 2.....	46
3.3.13.3 Postup 3.....	46
3.3.13.4 Postup 4.....	47
3.3.14 Príprava ligandu L2 .....	48
3.3.15 Príprava ((1,4,8,11-tetraazacyklotetradekan-1-yl)metyl)(4-nitrobenzyl)fosfínovej kyseliny (11).....	49
3.3.15.1 Charakterizácia ((1,4,8,11-tetraazacyklotetradekan-1-yl)metyl)(4-nitrobenzyl)-fosfínovej kyseliny .....	49
3.3.16 Príprava ((1,4,8,11-tetraazacyklotetradekan-1-yl)metyl)(4-aminobenzyl)-fosfínovej kyseliny (12).....	50
3.3.16.1 Charakterizácia ((1,4,8,11-tetraazacyklotetradekan-1-yl)metyl)(4-aminobenzyl)-fosfínovej kyseliny .....	50
3.3.17 Príprava ((1,4,8,11-tetraazacyklotetradekan-1-yl)metyl)(4-isothiokyanato-benzyl)fosfínovej kyseliny (13), prevzaté z ref <sup>91</sup> .....	51
3.3.17.1 Charakterizácia ((1,4,8,11-tetraazacyklotetradekan-1-yl)metyl)(4-isothiokyanato-benzyl)fosfínovej kyseliny .....	51

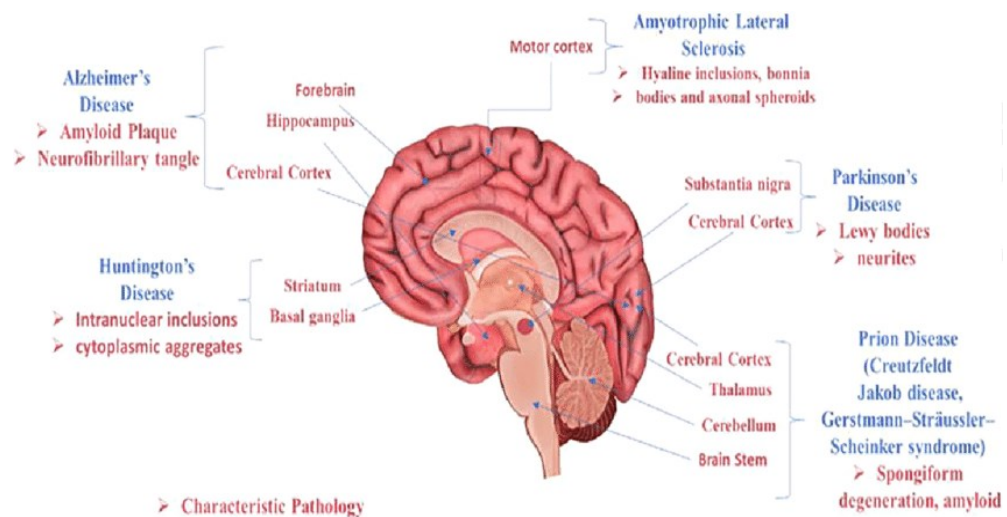
3.3.18 Príprava ligandu L2 (14), prevzaté z ref <sup>#2</sup> .....	52
3.3.17.1 Charakterizácia ligandu L2.....	52
<b>4 VÝSLEDKY A DISKUSIA .....</b>	<b>53</b>
4.1 PRÍPRAVA FLUORESCENČNEJ ZNAČKY .....	53
4.2 POKUSY O CYKLIZÁCIU MODELOVEJ LÁTKY PRE PRÍPRAVU LIGANDU L1.....	55
4.3 PRÍPRAVA LIGANDU L2 .....	57
4.4 VÝSLEDKY TITRÁCIÍ MODELOVEJ LÁTKY 12 PRE L2.....	59
<b>5 ZÁVER .....</b>	<b>64</b>
<b>6 POUŽITÁ LITERATÚRA.....</b>	<b>65</b>
<b>PRÍLOHY PRILOŽENÝCH NMR SPEKTIER.....</b>	

# 1 Teoretický úvod

## 1.1 Neurodegeneratívne choroby

Podľa portálu Web of Science je uvedenej téme venovaná veľká pozornosť. Len za prvý polrok 2020 bolo publikovaných 3756 článkov z toho 1202 prehľadných článkov na tému neurodegeneratívnych ochorení. Témou prionových chorôb sa v prvom polroku 2020 zaoberalo už 330 článkov. Použitá literatúra v úvode tejto práce je vybraná v súlade s témou práce ako aj s primeranou úrovňou spracovania.

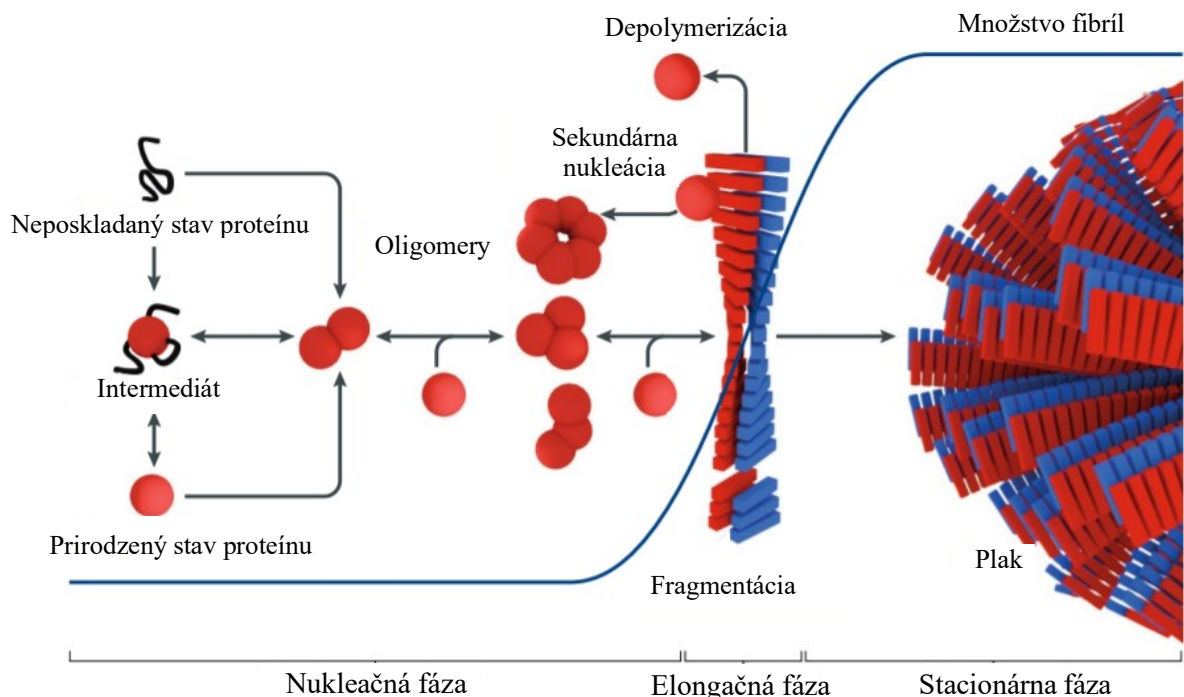
Neurodegeneratívne choroby sú charakterizované akumuláciou  $\beta$ -skladaných listov, ktoré vznikajú z pôvodných proteínov s čiastočne definovanou štruktúrou  $\alpha$ -helixu. Zatiaľ je známych 50 rôznych proteínov či peptidov, tiež nazývaných amyloidné proteínové prekurzory (APP), ktoré sa skladajú do tzv. amyloidných fibríl a následne agregujú do tzv. extracelulárnych plakov. Tie sú spájané s viac ako 25 neurodegeneratívnymi chorobami.<sup>1</sup> Tieto útvary sa nachádzajú v neurónoch a oblastiach mozgu, charakteristickú pre výskyt jednotlivých chorôb (obrázok 1).<sup>2</sup> Zmiených viac ako 50 APP dáva vzniku celej rady ochorení v závislosti na sekvencií aminokyselín v depozitu. Patria sem choroby ako je Alzheimerova choroba (AD), zmeny v prionových proteínoch (PrP), ktoré vyvolávajú Creutzfeldt-Jakobovu chorobu (CJD), či Huntingtonova (HD) a Parkinsonova choroba (PD).<sup>3,4</sup>



Obrázok 1: Miesta výskytu amyloidov podľa jednotlivých neurodegeneratívnych chôrb, podľa ref.<sup>2</sup> V prípade prionových chorôb sa jedná o oblasť thalamu, mozgovej kôry, mozočku a mozgového kmeňa. Preto tiež prvé príznaky prionových chorôb sú napr. poruchy koordinácie, úzkosť a nespavosť u Creutzfeldt-Jakobovej choroby<sup>4</sup>, u fatálnej rodinnej nespavosti sa jedná o permanentnú únavu, za ktorou nasleduje kóma až smrť.<sup>5</sup>

Vznik amyloidových fibril nie je obmedzený len na neurodegeneratívne choroby. Prvý krát bol pozorovaný pred viac ako 400 rokmi v pečeni. Tvar vzniknutých amyloidových fibril závisí na pôvodných APP a ako už bolo povedané, charakterizovaných je viac ako 50 útvarov. Amyloidné fibrily vykazujú spoločnú štruktúru, v ktorej sa  $\beta$ -skladané listy v každom protofilamente zarovnávajú kolmo na dlhú osu vlákna. Protofilament je komponent amyloidného vlákna so štruktúrou striedavého  $\beta$ -skladaného listu, ktorý sa kríži spolu s ďalšou protofibrilou. Vo všetkých prípadoch amyloidy adaptujú štruktúru kanonického striedavého  $\beta$ -skladaného listu s charakteristickým opakovaním 4,7 – 4,8 Å po osi vlákna a poskytujú veľké rozpätie amyloidných štruktúr, ktorých rozmanitosť môže poskytnúť vysvetlenie náročnosti prípravy potenciálnych liečiv.<sup>1,6</sup>

Medzi faktory ovplyvňujúce chybné poskladanie proteínov patria somatické alebo genetické mutácie, starnutie, zmeny v bunecnom prostredí ako je teplota, pH, oxidatívny stres a prítomnosť iónov kovov.<sup>2</sup> Avšak čo zapríčiňuje nastúp ochorenia rovnako ako mechanizmus vzniku plakov ostáva stále neznáme. Jeden z posledných názorov na mechanizmus je prezentovaný v ref. 1 a je schématicky znázornený na obrázku 2.<sup>1</sup>



Obrázok 2: Mechanizmus prevzatý z ref<sup>1</sup>, zahrňuje tri fáze – lag fáza (nukleačná fáza), fáza exponenciálneho rastu (elongačná fáza) a obdobie stabilnej hladiny amyloidov (stacionárna fáza). Kinetika formácie amyloidov závisí na koncentrácii monomerov daného prekursoru ako aj agregáčného jadra.<sup>6,7</sup> V priebehu lag fáze vznikajú stabilné oligomery, ktorých tvorba je považovaná za termodynamicky nestabilný proces a je teda krok udávajúci rýchlosť procesu tvorby amyloidov.<sup>6</sup>

Niektoré choroby sa spájajú s postupujúcim vekom a zahrňujú agregáciu neusporiadaných proteínov ako je tomu u AD a PD, kde mutácie amyloidogénnych prekursorov ako je  $\alpha$ -synuclein A30P alebo A53T u PD a mutácia prekursorov A $\beta$  variant E22 $\Delta$  či E22K u AD môže viesť k skorému nástupu chorôb.<sup>1</sup> Mutácia E22K je zámena náboju v pozícii 22 a to zámena kyseliny glutamovej za lyzín. Mutácia E22 $\Delta$  spôsobuje odstránenie kyseliny glutamovej v pozícii 22.<sup>8</sup> U iných chorôb môže dôjsť k expanzií amyloidogénnej sekvencie ako je tomu u chorôb trinukleotidového opakovania, čo spôsobuje poly-glutamínovo (polyQ) spojenú ataxiu ako je tomu u HD.<sup>1,6</sup>

Priony sú proteíny o molekulovej hmotnosti okolo 250 Da a majú v organizme celú radu fyziologických funkcií vrátane transportu a distribúcie iónov prechodných kovov.<sup>9</sup> V prípade prionových ochorení je doba nástupu choroby ovplyvňovaná dĺžkou štyrikrát sa opakujúcej sekvencie ôsmich aminokyselín, ktorých každá časť obsahuje jeden histidín (OR segment z angl. „*octarepeat*“) a jeho agregáciou s Cu(II) iónmi. Tento OR segment viaže Cu(II) pomocou štyroch histidínov a práve predĺžovanie OR segmentu je spájané s nástupom choroby v mladšom veku.<sup>9,10</sup> Kontrastom sú *in vivo* štúdie, ktorých podstatou je, že dochádza k neskoršiemu nástupu prionových chorôb v prípade odstraňovania Cu(II) pomocou ich chelatacie.<sup>10,11</sup>

Medzi ďalšie otázky v súvislosti s nástupom choroby patrí: ako sú agregáty rozpoznávané chaperónmi a inými bunkovými komponentami a ako a prečo agregáty saturujú celulárne chaperóny a degradačné siete. Model cytotoxicity spojenej s amyloidmi zahŕňa inhibíciu proteazomálnej degradácie, narušenie autofágie, poruchy mitochondriálnej funkcie, produkciu reaktívnych druhov kyslíka (ROS), či narušenie membrán vrátane mitochondriálnej, endoplazmatického retikula (ER), lyzozómov a plazmatickej membrány.<sup>1,6</sup> Závažnosť kognitívneho poklesu u pacientov s AD nekoreluje s tvorbou plakov, čo naznačuje, že choroba je spôsobená pre-amyloidnými agregátmi. Početné *in vitro* testy naznačujú, že za cytotoxicitou stoja oligomery, ktoré dokážu tiež narušiť membrány.<sup>1,6</sup>

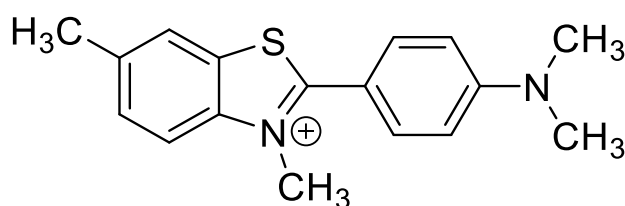
## 1.2 Diagnostika a terapia neurodegeneratívnych chorôb

Zistenie molekulovej stavby amyloidných fibríl môže byť jeden z dôležitých krokov k príprave terapeutických látok založených na zameranie samotných fibríl alebo na proces ich tvorby.<sup>1</sup>

Bolo testovaných tisíce látok ako potenciálne liečivá založených na stabilizácii alfa štruktúry<sup>12</sup>, zabráneniu agregácie a tým aj vzniku plakov<sup>2</sup>, či ovplyvnenie koncentrácie iónov prechodných kovov použitím chelatačných činidiel.<sup>13</sup> I keď rada testovaných látok bola účinná *in vitro*, testovanie *in vivo* tak úspešné nebolo. Tiež chýba diagnostika *in vivo*. Tvorba plakov nevytvára žiadne protilátky, ktorých koncentrácia by sa dala sledovať, a tak diagnostika *in vivo* je obmedzená na chovaní pacienta. Jednoznačná je iba diagnostika *post mortem* na základe histologického vyšetrenia extracelulárnych amyloidných plakov a intraneuronálnych neurofibrilárnych klobiek s použitím fluorescenčných farbív.<sup>6</sup> Prvý popis amyloidovej choroby, AD, pomocou fluorescenčného značenia bol v roku 1901 Aloisom Alzheimerom *post mortem* pomocou kongo červene.<sup>1</sup> Bohužiaľ od tejto doby nedošlo k zásadnému obratu, avšak miesto kongo červene sa používajú iné fluorescenčné činidlá. V roku 1959 bol popísaný thioflavín T (ThT) ako potenciálna fluorescenčná značka pre histologické stanovenia amyloidov. Ďalšími využívanými fluorescenčnými značkami je zelený fluorescenčný proteín (GFP) a jeho deriváty, ktoré sú neustále modifikované pre zlepšenie jeho fotofyzikálnych vlastností.<sup>6</sup> Iba malý pokrok v tejto oblasti zaznamenali zobrazovacie metódy ako je MRI či PET.

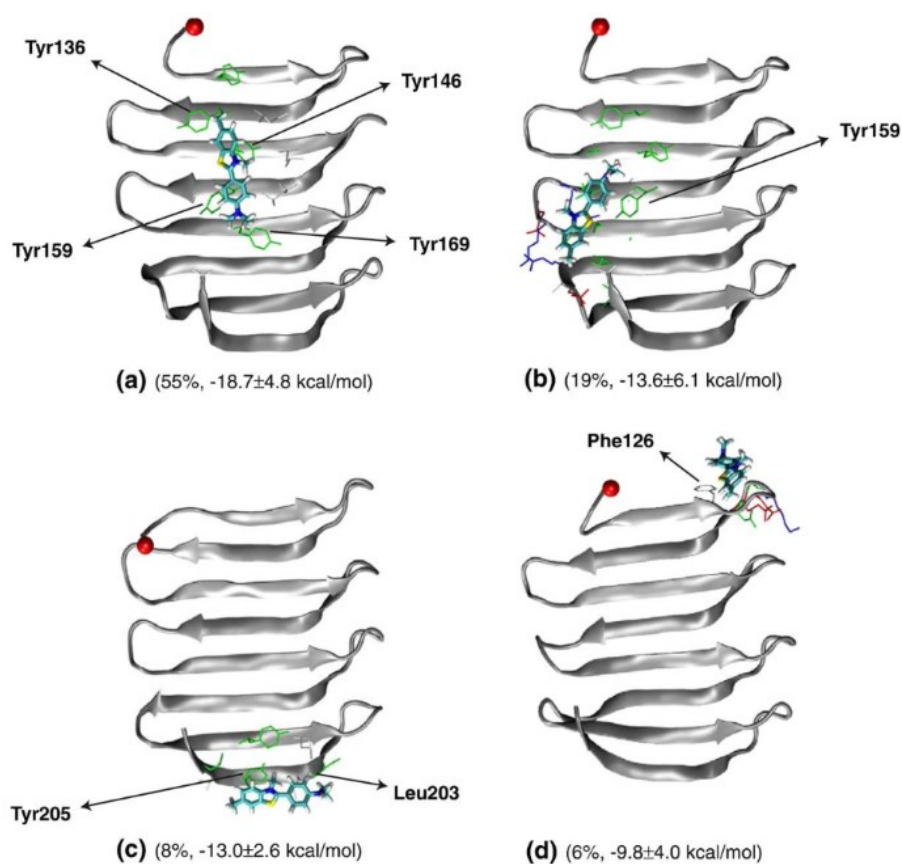
### 1.2.1 Vlastnosti a diagnostika pomocou thioflavínu T

Thioflavín T, *obrázok 3*, je fluorescenčná značka založená na benzothiazolovom kruhu, ktorá sa využíva pri *post mortem* histologických analýzach u AD k charakterizácii prítomnosti fibríl amyloidov *in vitro*.<sup>11</sup> Pre využitie *in vivo* je testovaná rada modifikácií, založených na ThT štruktúre, ktorá by mohla jednoduchšie prejsť cez hematoencefalickú bariéru (BBB) a tiež by mala dlhšiu životnosť.<sup>11</sup>



Obrázok 3: Thioflavín T.

ThT po naviazaní na amyloidné vlákna, *obrázok 4*, vykazuje významné zvýšenie intenzity fluorescencie ako aj veľký posun exitačného maxima, z 385 na 450 nm, a emisného maxima, z 455 na 482 nm.<sup>14</sup> Charakteristické zvýšenie fluorescencie vyplýva z vyrušenia zhášacích efektov. Voľný ThT obsahuje dva planárne kruhy, ktoré sa vzájomne otáčajú a tým tlmia fluorescenciu. Po naviazaní ThT na štruktúru kanonického  $\beta$ -skladaného listu sa ThT interkaluje do povrchu drážok bočného reťazca laminovaných  $\beta$ -skladaných listov prebiehajúcich rovnobežne s dlhou osou vlákna, *obrázok 4*. V dôsledku tohto naviazania je vzájomná rotácia zakázaná, čo umožňuje delokalizáciu  $\pi$  elektrónov cez oba aromatické kruhy.<sup>6</sup>



*Obrázok 4: Prehľad väzbových miest pre ThT na amyloidy, prevzaté z ref.<sup>15</sup> Na obrázku sú 4 možnosti väzbových miest pre ThT na štruktúre jednovrstvových  $\beta$ -skladaných listoch. A) Väzba na vrchole piatich po sebe idúcich bočných reťazcov tyrozínu cez  $\beta$ -vlákna. B) Väzba na serotonin a threonín. C) Väzba na hornom okraji jednovrstvových  $\beta$ -skladaných listoch a väzba na dolnom okraji je na D). Nadbytok a väzbová energia a Born/povrchová plocha generalizovaná molekulárnou mechanikou je uvedená pre každú zo štyroch štrukturálnych superrodín a je uvedená v zátvorkách. Pri výpočtoch neboli započítané entropické výrazy (napr. translácia, rotácia a zmena konformačnej entropie rozpustenej látky po väzbe). N-koniec je znázornený červenou bodkou. Zobrazené sú iba povrchové bočné reťazce ( modré – pozitívne nabité; červené – negatívne nabité a čierne – hydrofóbne). Atómy C,N,S a H od ThT sú zafarbené tyrkysovo, modro, žlto a bielo.<sup>15</sup>*

ThT sa neviaže na proteíny v pôvodnom štruktúrnom tvare a teda v takom prípade nevykazuje žiadnu fluorescenciu, čo zabezpečuje, že ThT a jeho deriváty sú praktickou značkou pre rýchlu a spoľahlivú identifikáciu amyloidných fibríl v infikovanom tkanive.<sup>16</sup> Pre tieto vlastnosti bolo ThT zavedené ako štandardná fluorescenčná značka pre monitorovanie procesu fibrilácie amyloidogénnych peptidov v reálnom čase.<sup>6</sup> Jednou z hlavných modifikácií bolo odstránenie metylovej skupiny na dusíku v heterocyklickej časti ThT, čím bol umožnený prechod cez BBB a zvýšená afinita k fibrilám amyloidov. Zmenou dimetylamínofenylovej časti za fenol či anilín umožňuje väzbu iónu kovu, v prípade použitia jódu môže byť takýto derivát ThT použitý u jednofotónovej emisnej výpočtovej tomografie (SPECT).<sup>11</sup>

### 1.2.2 Terapia neurodegeneratívnych chorôb

Neurodegeneratívne choroby sú fatálne a v súčasnej dobe nie je k dispozícii účinná liečba. Objav nových terapií založených na malých molekulách sa spoliehal na testovanie rozdelenia kultivovaných bunkových línií, ktoré šíria priony v štruktúre  $\beta$ -skladaného listu (PrP<sup>Sc</sup>, z angl. „*scrapie prion protein*“), ako aj na zvieracích modeloch infikovaných prionmi.<sup>17</sup> Najpokročilejšie sú pokusy o zníženie hladín PrP<sup>Sc</sup> inhibíciou jeho produkcie alebo zvýšením jeho odbúravania, kedy na testy látok s antiprionovou aktivitou boli použité infikované myšie neuroblastómové bunky ScN2a.<sup>18</sup> Medzi známe malé molekuly s antiprionovou aktivitou patria kongo červeň, akridiny, difenyloxazoly a difenylthiazoly, pyrazolony, indol-3-glyoxylamid a hlavne 2-aminothiazoly.<sup>17-19</sup> Tiež aj thioflavín T a jeho deriváty sú deriváty testovaných liečiv alebo cielených kontrastných látok.

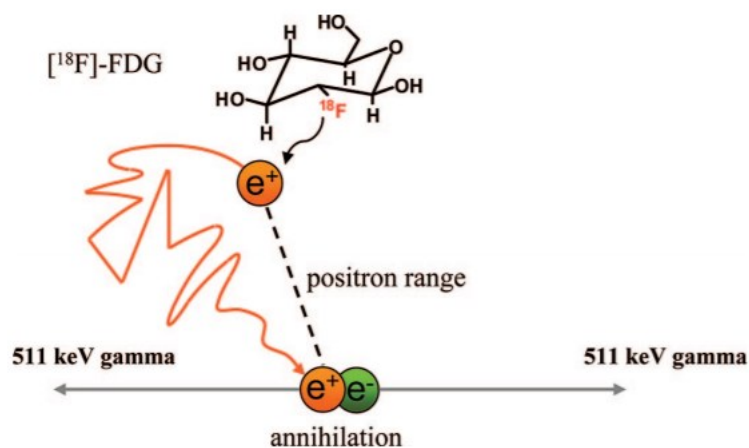


### 1.3 Pozitronová emisná tomografia (PET)

V súčasnej dobe je diagnostika neurodegeneratívnych ochorení umožnená kombináciou klinických testov spolu s biomarkermi, ako je zobrazenie mozgu či analýzou z mozgomiechovej tekutiny. V prípade zobrazenia mozgu je využívané zobrazovanie magnetickou rezonanciou (MRI), ktoré je založené na vysokopriestorovom rozlíšení a vysokom kontraste mäkkých tkanív. MRI sa často používa pri podozreniach na neurodegeneratívne ochorenia na vylúčenie iných neneurodegeneratívnych príčin pre pozorované symptómy, ako sú vaskulárne ochorenia a mozgové nádory. Niektoré vzorce atrofie mozgu navyše môžu podporovať klinickú diagnostiku rôznych neurodegeneratívnych ochorení.<sup>20</sup>

PET má kľúčovú úlohu v diagnostike a porozumení neurologických patofyziológií. Jedná sa o neinvazívnu molekulárnu zobrazovaciu techniku, ktorá zahrňuje prítomnosť rádiových farmák, ktoré sa po prechode cez BBB viažu na špecifický molekulárny cieľ, ako je transportér či receptor, čím je umožnená funkcia sledovania ich zmien. V súčasnosti je používaná rada rádioaktívne označených ligandov, ktoré umožňujú neurozobrazovanie u neurodegeneratívnych patológiách, ako je PD, AD a HD.<sup>21</sup>

Výhodou použitia PET na diagnostiku oproti MRI je jeho vyššia citlivosť (u PETu až  $10^{-9}$  –  $10^{-12}$  mol, oproti MRI kde je citlivosť iba  $10^{-5}$  mol). Detekcia patológie na molekulárnom rozhraní umožňuje citlivejšiu či dokonca skoršiu diagnózu. Tieto choroby začínajú patobiochemickými procesmi, ktoré vedú k morfológickým zmenám viditeľným na MRI až po určitom časovom období.<sup>20</sup> Pre potreby PET a SPECT bolo pripravených a *in vivo* vyskúšaných mnoho rádioznačených derivátov konga červene, chrysamínu-G a iných.<sup>1,6,22</sup> Zatiaľ čo mnoho z nich vykazovalo vysokú afinitu k amyloidom, mnohým z nich pri prechode cez BBB prekážala prítomnosť polárnych funkčných skupín.<sup>22</sup>



Obrázok 5: Princíp PETu, prevzaté z ref.<sup>23</sup> Základným princípom PET zobrazovania je koincidenčná detekcia fotónov ( $2 \times 511 \text{ keV}$ ), ktoré sú produkované anihiláciou emitujúceho pozitronu s elektrónom v prostredí. Vhodnosť rádionuklidu pre PET určujú jeho fyzikálne vlastnosti, ako je kinetická energia pozitronov. Najčastejšie využívané rádionuklidy sú  $^{18}\text{F}$  ( $t_{1/2} = 109,74 \text{ min}$ ),  $^{11}\text{C}$  ( $t_{1/2} = 20,48 \text{ min}$ ),  $^{68}\text{Ga}$  ( $t_{1/2} = 68,00 \text{ min}$ ) a  $^{64}\text{Cu}$  ( $t_{1/2} = 762 \text{ min}$ ).<sup>24</sup>

Aj v prípade rádiofarmak musia byť dodržané Lipinského pravidlá pre prípravu ligandov s potenciálom prechodu cez BBB. V úvahu sú brané dva dôležité faktory a to, početnosť vodíkových väzieb ligandu s vodou a molekulárna hmotnosť daného liečiva. Obecne počet vodíkových väzieb s vodou nesmie byť vyšší ako desať. A z tohto dôvodu rádiofarmaká založené na peptidoch, ktoré majú vysoký počet vodíkových väzieb neprechádzajú BBB. Molekulová hmotnosť by mala byť menšia ako 600 Da, látka by mala mať planárnu štruktúru a byť bez náboja. V prípade rádiofarmak pre PET sa okrem výpočtových metód používa aj oktanol/voda rozdeľovací koeficient P. K prechodu rádiofarmaka cez BBB sú optimálne hodnoty log P medzi 2 až 3,5. Dôležitý je tiež čas vymývania rádiofarmaka z krvi a nešpecifických väzieb mimo cieľ. Slabo viažuci sa rádioligand na plazmové proteíny je zásadný iba ak je prítomný voľný podiel rádioligandu pre difúziu z vaskulárneho priestoru. Podiel nešpecifických väzieb by mal byť čo najmenší, aby bol zachovaný vysoký podiel rádiofarmaka na cieľ.<sup>23</sup>

### 1.3.1 [ $^{11}\text{C}$ ]PET

Hlavnou výhodou  $^{11}\text{C}$  je, že môže byť nahradený stabilný atóm uhlíku v molekule a nedôjde k zmene jej štruktúry, a teda sa zachovávajú aj biochemické a biofyzikálne vlastnosti molekuly. Vzhľadom k relatívne krátkemu polčasu rozpadu ( $t_{1/2} = 20,48 \text{ min}$ ) sa využíva hlavne k označeniu zlúčenín s krátkym biologickým polčasom rozpadu. Oproti využívaniu  $^{18}\text{F}$ ,  $^{11}\text{C}$  umožňuje viacnásobné vyšetrenie v jednom subjekte s krátkymi

časovými intervalmi. Vzhľadom na krátky polčas rozpadu musí byť meranie prevedené v krátkej dobe a tiež musí byť použité dostatočné množstvo rádiofarmaka. Na druhú stranu jeho nevýhodou je, že zlúčeniny musia byť produkované iba v centrách s cyklotrónovým a rádiochemickým vybavením a zmienené veľké množstvo rádionuklidu vzhľadom k jeho polčasu.<sup>23</sup>

### 1.3.2 [<sup>18</sup>F]PET

Fluór môže reagovať s radou organických a anorganických zlúčenín. Môže reagovať ako elektrofil ( $F^+$ , ktorého prekurzor je [<sup>18</sup>F]F<sub>2</sub>), či ako nukleofil ( $F^-$ , ktorého prekurzor je [<sup>18</sup>F]<sup>-</sup>). Z potenciálnych PET rádionuklidov je <sup>18</sup>F preferovaný vzhľadom k jeho praktickému polčasu rozpadu ( $t_{1/2} = 109,74$  min), jednoduchej produkcii a priaznivým fyzikálnym vlastnostiam, ako je čistý rozpad a nízkoemisná energia.<sup>24</sup> U prípravy rádiofarmák sa najčastejšie zameňa v molekule <sup>18</sup>F za vodík či hydroxylovú skupinu, vzhľadom na to, že sterické parametre fluóru sú podobné ako u vodíku (van der Waalove polomery fluóru a vodíku sú 1,35 Å a 1,20 Å). Vysoká elektronegativita fluóru však vedie k získavaniu liečiv so zmenenou lipofilicitou a biologickými vlastnosťami. V niektorých prípadoch môžu dokonca fluórové analógy zlúčenín vykazovať vyššiu účinnosť v porovnaní s nefluórovanými. Zámenou atómu vodíku za fluór v alifatickej pozícii vedie k zníženiu lipofilicity, zatiaľ čo zámena v arylovej pozícii vedie k jej zvýšeniu.<sup>23</sup>

### 1.3.3 PET a neurodegeneratívne choroby

Využitie počítačovej tomografie (CT) v spojení s PET je zobrazovacia technika, ktorá poskytuje presnú mapu na korekciu atenuácie a anatomický obraz. Okrem toho CT sken získaný bezprostredne pred PET skenom umožňuje súčasné vyhodnotenie možných štrukturálnych abnormalít (ako je mŕtvica), ktoré sú často sekundárnymi príčinami demencie.<sup>8</sup>

Diagnostika symptómov neurodegeneratívnych chorôb je obzvlášť náročná hlavne v rannom štádiu ochorenia. Dôvodom je väčšia strata kognitívnych funkcií pred odhalením choroby. Bežné testovanie prebieha na štandardizovaných neuropsychologických testoch.<sup>25</sup> Patofyziológia AD je v týchto dňoch centrom veľkého výskumu, pričom  $\beta$ -amyloidové peptidy A $\beta$ -40 a A $\beta$ -42 sú najčastejšie metabolity APP. PET zobrazovanie  $\beta$ -amyloidov je veľkým pokrokom v diagnostike AD, taktiež sa urýchljuje vývoj anti-amyloidných liečiv za predpokladu, že sú k dispozícii vhodné zobrazovacie látky.<sup>23</sup>

PET štúdie dráh neurotransmitterov môže priniesť informácie o patofyziologických mechanizmoch u rôznych neurodegeneratívnych ochorení. Hovoríme o troch dráhach a každá choroba napadá primárne inú dráhu: dopaminergická, serotonergická a cholinergická.<sup>23,26</sup>

Dopaminergická dráha má svoju úlohu v množstve porúch mozgu, ako je schizofrénia, PD a iné poruchy spojené s pohybom.<sup>23,26</sup>

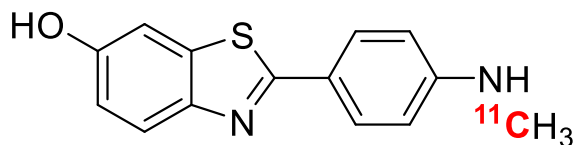
Serotonergická dráha je tiež zapojená do množstva neurologických a psychiatrických ochorení ako je depresia, úzkosť, schizofrénia či AD. Aj keď je pre tento systém známych viac ako 16 typov receptorov, PET zobrazovacie látky existujú iba pre typ 5-hydroxytryptamínu podjednotky 1 (5-HT1A) a podjednotky 2 (5-HT2A), ktoré sú prítomné vo vysokej hustote v hipokampusu a neokortikálnej oblasti mozgu.<sup>23</sup> *Post mortem* štúdie poukazujú na veľké straty sérotoninových receptorov 5-HT1A a 5-HT2A v amygdale a hipokampe u AD pacientov.<sup>26</sup>

Cholinergická dráha sa tiež zapája do množstva neurologických a psychiatrických chorôb ako je depresia a kognitívne a pamäťové ochorenia ako je AD, mierna kognitívna porucha (MCI) či PD. Sú známe dve hlavné triedy acetylcholinových receptorov: nikotinické a muskarínové. Zatiaľ čo nikotinické acetylcholinové receptory (nAChRs) sú prístupné cez iónové kanály zložené z 5 podjednotiek, muskarínové acetylcholinové receptory (mAChRs) fungujú cez sprážené G-proteíny a operujú cez sekundárnych poslov.<sup>23,26</sup>

#### 1.3.4 Prehľad využívaných rádioligandov

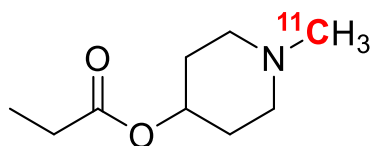
V prípade [<sup>11</sup>C]PET diagnostiky je mnoho štúdií, ktoré poukazujú na sľubné výsledky *in vivo* a *in vitro* za použitia neutrálnych derivátov.<sup>27</sup> *In vivo* zobrazovanie amyloidov sa stáva vyhľadávanou technikou pre získavanie informácií o amyloidných plakoch v tele pacienta. Jednou z testovaných látok je aj Pittsburghská zlúčenina B (PiB), *obrázok 6*. Je to derivát ThT s označením <sup>11</sup>C, ktorý vykazuje vysokú afinitu k Aβ fibrilám, avšak nevykazuje afinitu k difúznym plakom a intracelulárnej neurofibrilárnej spleti (NFT).<sup>23,26</sup> Retencia [<sup>11</sup>C]PiB silno koreluje s *post mortem* prítomnosťou amyloidných depozitov tvorených Aβ plakov u pacientov s AD a je teda schopné rozlíšiť AD od neamyloidogénnych neurodegeneratívnych chorôb. [<sup>11</sup>C]PiB sa viaže s vysokou afinitou k štruktúre β-skladaného listu Aβ plakov a taktiež nepreukazuje aktivitu s inými abnormálne konformovanými proteínmi ako sú tau kľbká či α-synukleinové Lewyho útvary.<sup>23,28</sup> Využitie [<sup>11</sup>C]PiB je vzhľadom k jeho vysokej afinite k β-amyloidom a možnosti rýchleho

skenovania, približne 60-90 minút po vpichnutí rádiofarmaka, využívané *in vivo* vo väčšine PET centier po svete.<sup>26</sup>

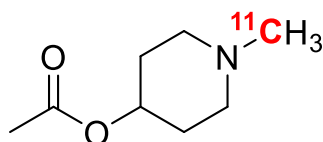


Obrázok 6: Pittsburghská zlúčenina s označením <sup>11</sup>C.

U cholinergickej dráhy sa v prípade PET využívajú buď označené analógie acetylcholínu ako substráty pre acetylcholinesterázu na sledovanie jej aktivity *in vivo* alebo látky označené rádionuklidmi pre nAChRs. Príkladom analógie acetylcholínu pre PET zobrazovanie sú *N*-<sup>11</sup>C-metylpiperidín-4-yl propionát ([<sup>11</sup>C]-PMP), obrázok 7, a *N*-<sup>11</sup>C-metylpiperidyl-4-yl acetát ([<sup>11</sup>C]-MP4A), obrázok 8, ktoré sledujú aktivitu acetylcholinesterázy a jej pokles v prípade pacientov s ochorením AD. U pacientov PD je aktivita acetylcholinesterázy ešte nižšia ako u pacientov s AD, čo môže naznačovať ešte vážnejší deficit v cholinergickej dráhe. U pacientov AD a PD bola popísaná korelácia medzi testami pozornosti ako je číslicové rozpätie a aktivita kortikálnej acetylcholinesterázy za použitia <sup>11</sup>C-PMP. Bolo pozorované zníženie aktivity acetylcholinesterázy u pacientov MCI, ktorá sa neskôr rozvinula do AD, čo naznačuje, že zmeny aktivity acetylcholinesterázy môžu predchádzať rozvoju klinickej AD.<sup>26</sup> Látky označené rádionuklidmi pre nAChRs sú nikotínové deriváty, epibatidínové a azetidínové deriváty a 3-pyridylové éterové deriváty. Znížená kortikálna <sup>11</sup>C-nikotínová väzba u AD pacientov významne koreluje so zhoršenou kognitívnou funkciou, ako je zníženie pozornosti. V prípade merania <sup>11</sup>C-nikotínovej väzby pomocou PET pred a po podaní liečby s inhibítormi cholinesterázy bol pozorovaný zvýšený počet kortikálnych nicínových receptorov čo významne korelovalo so zlepšením pozornosti u AD pacientov.<sup>26</sup>

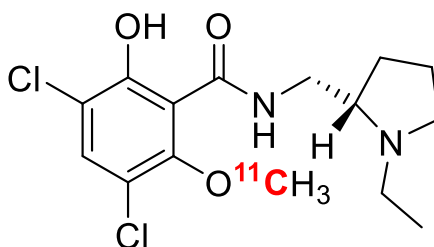


Obrázok 7: *N*-metylpiperidín-4-yl propionát s označením <sup>11</sup>C.



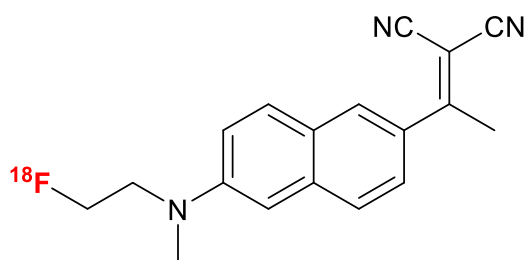
Obrázok 8: N-metylpiperidyl-4-yl acetát s označením <sup>11</sup>C.

U diagnostiky [<sup>11</sup>C]PET je zástupcom pre dopaminergickú dráhu <sup>11</sup>C-raklopid, obrázok 9. Jedná sa o D<sub>2</sub> receptorového antagonistu, ktorý sa využíva hlavne na detekciu známok nigrostriatálnej degenerácie pomocou PET. U pacientov s ranným štádiom PD je pomocou <sup>11</sup>C-raklopidu pozorovaná zvýšená väzba na D<sub>2</sub> receptory a naopak po podaní liečby L-dopou je pozorované zníženie väzby na raklopid.<sup>26</sup>

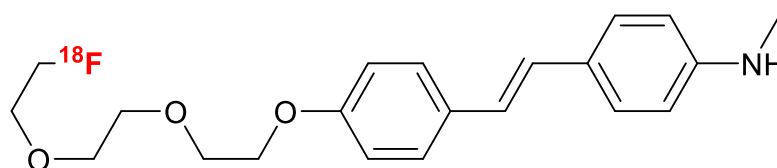


Obrázok 9: Raklopidu s označením <sup>11</sup>C.

V prípade <sup>18</sup>F bol na detekciu neurodegeneratívnych chorôb typu AD ako prvý použitý naftalénový derivát [<sup>18</sup>F]FDDNP ((2-(1-{6-[(2-[<sup>18</sup>F]fluoroetyl(metyl)amino]-2-naftyl}-2-etylidén)malonitril), obrázok 10. Táto látka sa viazala ako na β-amyloidy tak aj na NFT a poukazovala na kognitívne zmeny u pacientov s AD. Taktiež sa viazala na PrP<sup>Sc</sup> v histologických rezoch *post mortem* u pacientov s CJD a v *in vivo* testoch u pacientov s prionovými chorobami.<sup>26</sup> Avšak medzi novšie testovanými rádioligandami sa nachádza napríklad [<sup>18</sup>F]fluórbetabén, obrázok 11, ktorý je známy pod skratkou [<sup>18</sup>F]BAY 94-9172. Ten vykazuje vysokú afinitu k β-amyloidným plakom, ktoré detekuje už v rannom štádiu nástupu choroby<sup>23</sup>, avšak v porovnaní s [<sup>11</sup>C]PiB má stále menšie rozdiely medzi pacientami AD a kontrolou na zdravých jedincoch.<sup>26</sup>

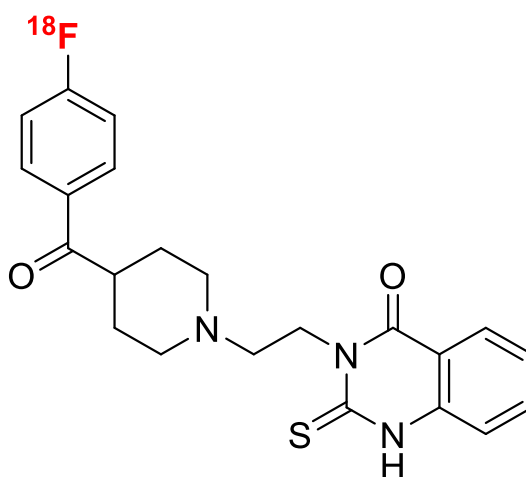


Obrázok 10: 2-(1-{6-[(2-fluoroetyl(metyl)amino]-2-naftyl}-2-etylidén)malonitril s označením  $^{18}\text{F}$ , známy pod komerčnou značkou ako [ $^{18}\text{F}$ ]FDDNP.



Obrázok 11: Fluórbetabén s označeným  $^{18}\text{F}$ , využívaný pod komerčnou skratkou [ $^{18}\text{F}$ ]BAY 94-9172.

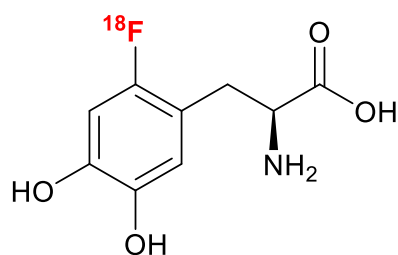
Využitie [ $^{18}\text{F}$ ]PET nachádza uplatnenie aj pri serotonergickej dráhe. *In vivo* PET štúdie poukazujú na stratu niektorých podjednotiek 5-HT receptorov v prípade AD, kedy [ $^{18}\text{F}$ ]-altanserín, obrázok 12, indikátor pre 5-HT<sub>2A</sub> receptor, vykazuje 40% zníženie väzbového potenciálu u pacientov AD a to najmä v amygdala-hipokamovom komplexe.<sup>26</sup>



Obrázok 12: Altanserín s označením  $^{18}\text{F}$ .

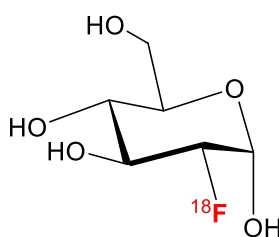
V prípade [ $^{18}\text{F}$ ]PET diagnostiky však môžeme hovoriť o dvoch reprezentatívnych rádioligandoch. Jedným z nich je zástupca rádioligandov pre dopaminergický systém a to [ $^{18}\text{F}$ ]6-fluoro-L-DOPA (6- $^{18}\text{F}$ -fluoro-3,4-dihydroxy-fenylalanín), obrázok 13, ktorý sa používa k vyšetrovaniu presynaptickej neuronálnej degenerácie dopaminergického systému, konkrétne kapacity neurónov k syntéze dopamínu. V prípade PD pacientov bolo pozorované

zníženie absorpcie striatálneho [ $^{18}\text{F}$ ]6-fluoro-L-DOPA bez rozdielov medzi skupinami. Deficit syntézy dopamínu bol pozorovaný aj u demencie spôsobenej Lewyho útvarmi a to aj v štádiu, keď ešte nebol prítomný parkinsonizmus. Avšak takúto koreláciu nebolo možné preukázať u pacientov s poruchou AD. V prípade AD bola pozorovaná strata striálnych dopamínových receptorov  $D_1$  aj keď táto strata nebola pozorovaná u receptorov  $D_2$  pri meraní  $^{11}\text{C}$ -raklopridom, stále boli pozorované zmeny spájané s AD príznakmi správania.<sup>26</sup> [ $^{18}\text{F}$ ]6-fluoro-L-DOPA prechádza BBB mechanizmom aktívneho transportu a je transformovaná na [ $^{18}\text{F}$ ]6-fluorodopamín cez neuronálnu aromatickú aminokyselinovú dekarboxylázu (AADC). Významný pokles v spätnej absorpcii (z angl. „uptake“) [ $^{18}\text{F}$ ]6-fluoro-L-DOPA indikuje pokles hustoty presynaptických dopaminergických neurónových zakončení, ako bolo preukázané v PET štúdiách.<sup>23</sup>



Obrázok 13: 6-fluoro-3,4-dihydroxy-fenylalanín s označeným  $^{18}\text{F}$ . Látka sa komerčne nazýva [ $^{18}\text{F}$ ]6-fluoro-L-DOPA.

Druhým príkladom je [ $^{18}\text{F}$ ]-2-fluoro-2-deoxyglukóza ([ $^{18}\text{F}$ ]FDG), obrázok 14, ktorá sa využíva na štúdium metabolizmu glukózy a je to najznámejšie a najúspešnejšie rádiofarmakum.<sup>20,25</sup> Jedná sa o analóg glukózy, kedy dochádza k jej fosforylácii hexokinázou a FDG ostane uväznené v neurónoch čo dovoľuje zobrazovanie metabolického pomeru glukózy v mozgu. Charakteristické znaky pozmeneného metabolizmu pozorovaného pomocou FDG PET zlepšuje klinickú diagnostiku AD.<sup>8,25</sup> Interpretácia takto získaných dát však môže byť klamlivá pokiaľ je metabolizmus glukózy pozmenený z dôvodu traumy, záchvatov či vaskulárnych ochorení. Taktiež môže ísť o vrodené artefakty, ktoré môžu simulovať prítomnosť AD počas zobrazovania.<sup>25</sup>



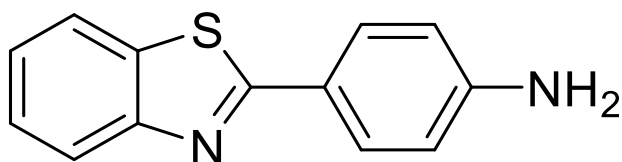
Obrázok 14: 2-fluoro-2-deoxyglukóza s označeným  $^{18}\text{F}$ .



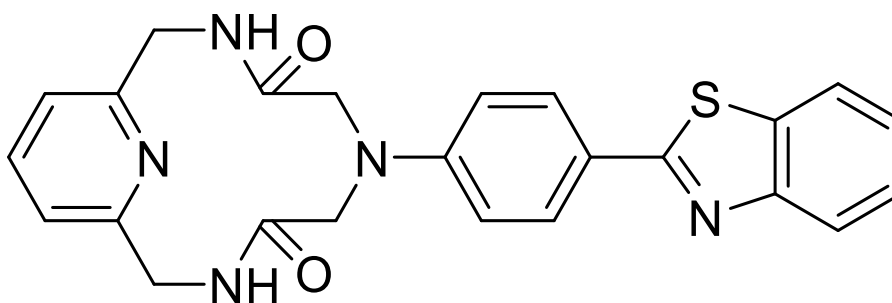
## 2 Cieľ práce

Cieľom bolo navrhnúť a pripraviť kontrastnú látku pre rádiodiagnostické metódy, ktorá by obsahovala cieleňú (targetizujúcu) časť molekuly a súčasne fluorescenčnú značku na sledovanie zmien *in vitro* a ďalej chelatačnú časť molekuly pre komplexáciu rádionuklidov  $^{64}\text{Cu}(\text{II})$ .

Ako cieleňá časť molekuly bol vybraný derivát thioflavínu T, *obrázok 15*, ktorý má afinitu ku vznikajúcim amyloidom a zároveň po naviazaní do ich štruktúr má zosilnené fluorescenčné vlastnosti.



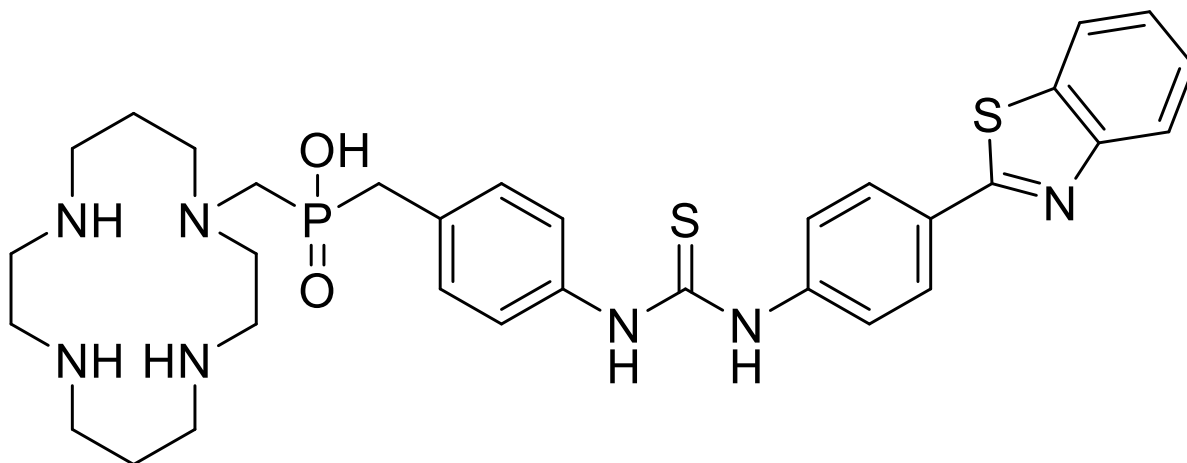
Obrázok 15: Navrhnutá fluorescenčná značka, derivát thioflavínu T.



Obrázok 16: Navrhnutá kontrastná látka **L1**.

Pre komplexáciu  $\text{Cu}(\text{II})$  boli navrhnuté tetraazacyklické ligandy spojené s derivátom thioflavínu T. V prvom prípade to bol diamid (**L1**), *obrázok 16*. Ako je viditeľné z obrázku 15 a 16 amín z thioflavínu je súčasťou makrocyklického kruhu. Po koordinácii  $\text{Cu}(\text{II})$  iónov sú amidové skupiny deprotonizované a výsledná molekula je elektroneutrálna. To spolu s predpokladanou planárnou štruktúrou spĺňa Lipinského pravidlá.

Ako alternatíva bola navrhnutá štruktúra obsahujúca fluorescenčnú skupinu, a chelatačný ligand spojené cez thiomocovinu, tzv. linker. Jedná sa o spojenie derivátu cyklámu, ktorý obsahuje naviazanú metyl(aminobenzylfosfínovú) kyselinu s derivátom thioflavínu T (**L2**). Spojenie je sprostredkované cez thiomocovinu. Navrhnutá molekula **L2** je znázornená na obrázku 17.



Obrázok 17: Navrhnutá kontrastná látka **L2**.

## 3 Experimentálna časť

### 3.1 Zoznam použitých chemikálií

Všetky použité chemikálie a rozpúšťadla boli zakúpené u komerčných predajcov, a to najmä Sigma-Aldrich, Fluka, Penta, Lach-Ner a CheMaTech. Chemikálie ani rozpúšťadlá neboli ďalej čistené či sušené, pokiaľ nie je uvedené priamo v experimente.

### 3.2 Metódy charakterizácie látok

#### 3.2.1 Chromatografia na tenkej vrstve (TLC)

Chromatografia na tenkej vrstve prebiehala na stacionárnej fáze silikagélu, ktorý je nanosený na hliníkových doštičkách, *TLC Silica gel 60 F<sub>254</sub>* (Merck). Hodnoty  $R_f$  sú uvedené vždy na jedno desatinné miesto. Použité mobilné fázy sú vždy uvedené v samotnom experimente. Detekcia stôp bola pomocou UV lampy Mineralight® ( $\lambda_1 = 254$  nm a  $\lambda_2 = 366$  nm) na vlnovej dĺžke uvedenej v popise jednotlivých experimentov. V samotnom experimente je uvedené pokiaľ bola použitá iná detekcia, ako pomocou UV lampy.

#### 3.2.2 Vysokoúčinná kvapalinová chromatografia (HPLC)

Čistota pripravovaných látok bola kontrolovaná tiež za použitia analytického HPLC, s UV detekciou o 254 a 210 nm. Použitá kolóna pre reverznú fázu bola plnená stacionárnou fázou Reprosil-C18 Gold. Pre preparatívne HPLC bola zvolená UV detekcia o 254 nm. Použitá kolóna pre reverzibilnú fázu bola plnená stacionárnou fázou Reprosil-C8 Gold. V oboch prípadoch bola na vymývanie použitá zmes deionizovanej vody (Milipore) (A), acetonitrilu (Rotisolv, HPLC grade) (C) a 0,1% vodný roztok trifluóroctovej kyseliny (B). Zloženie zmesi bolo postupne menené podľa *tabuľky 1*.

*Tabuľka 1: Podmienky pre vymývanie kolóny na zistenie čistoty pripravovaných látok pomocou analytického a preparatívneho HPLC.*

P24				P34			
čas (min.)	A (%)	B (%)	C (%)	čas (min.)	A (%)	B (%)	C (%)
0	90	10	0	0	85	10	5
2	90	10	0	5	0	10	90
12	0	10	90	10	0	10	90
14	0	10	90	11	85	10	5
15	90	10	0	21	85	10	5

### 3.2.3 FLASH chromatografia

Flash chromatografia bola použitá ako jedna z purifikačných metód použitím absorpčných maxím ako detekcie pre zber frakcií. Jednalo sa o použitie systému Büchi Sepacore Flash System s jemným silikagélom (40 – 63  $\mu\text{m}$ ) od firmy Fluka.

### 3.2.4 Nukleárna magnetická rezonancia (NMR)

NMR spektrá látok zo syntetickej časti tejto práce boli namerané na spektrometre Varian VNMRS 300 a Bruker Ascend 400. K príprave vzoriek boli použité 5 mm kyvety. Na týchto spektrometroch boli merané experimenty s jadrami  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  a  $^{31}\text{P}$ . Vzorky boli merané pri teplote 25 °C. Chemické posuny ( $\delta$ ) sú uvedené v ppm a interakčné konštanty ( $J$ ) sú uvedené v jednotkách Hertz. Spracovanie spektier prebehlo v programe MestReNova. Pre referencovanie boli použité chemické posuny zbytkových rozpúšťadiel.<sup>29</sup>

### 3.2.5 Hmotnostná spektrometria (MS)

Hmotnostné spektrá boli namerané na zariadení Bruker ESQUIRE 300, ako ionizátor bol použitý elektrosprej (ESI), ktorý slúžil ako zdroj iónov pre pozitívny aj negatívny mód. Analýza prebiehala pomocou iónovej pasty umožňujúcej detekciu iónov. Vzorky boli pripravené o váhe v rozmedzí 1 – 10 mg ako rozpúšťadlo bol použitý MeOH. Meranie bolo prevedené Mgr. Ondrejom Zemkom.

### 3.2.6 Röntgenoštruktúrna analýza (XRD)

Röntgenoštruktúrna analýza monokryštálov bola meraná na difraktometru Nonius Kappa s CCD plošným detektorom Bruker ApexII. Použitá röntgenová lampa bola s Mo-anódou a grafitovým monochromátorom. Počas merania bolo chladenie na 120 K pomocou tekutého dusíku. Meranie bolo prevedené RNDr. Ivanou Císařovou CSc. a štruktúry boli spresnené doc. RNDr. Janom Kotkom, Ph.D.

### 3.2.7 Potenciometria

Zásobný roztok ligandu bol pripravený rozpustením 122 mg látky **12** v deionizovanej vode. Následne bola stanovená analytická koncentrácia počas titrácie spolu s protonizačnými konštantami v programe OPIUM. Potenciometrické titrácie boli prevedené na pH metru PHM 240 MeterLab, automatickej byrety ABU900 ovládanej počítačom a kombinovanej sklenenej elektródy GK 2401B Radiometer Analytical.

Titracie typu „in-cell“ boli merané v titračnej cele s objemom 5 ml v deionizovanej vody za konštantnej teploty 25°C, udržiavanej dvojplášťovými nádobkami pripojenými k termostatu. Počas kalibračných a titračných meraní bol v aparátúre udržiavaný konštantný prúd argónu. Počiatočné dávkovanie vstupných zložiek (ligand, kov, HCl s (NMe<sub>4</sub>)Cl a H<sub>2</sub>O) bolo pomocou byriet s mikrometrickou skrutkou s presnosťou ±0,001 ml. Cela bola pred každou kalibráciou ako aj titraciou dvakrát vypláchnutá destilovanou vodou, jedenkrát acetónom a vysušená. Automatická byreta bola pred každým meraním resetovaná na presný objem. Počas titrácie bola sledovaná koncentrácia voľných iónov H<sup>+</sup> kombinovanou argenchloridovou elektródou ako elektrochemický potenciál. Každá titrácia bola vykonaná aspoň trikrát a zrovnateľnosť jednotlivých titrácií bola udržiavaná pomocou kalibrácie vykonanej vždy pred a po titracii.

Konštanty stability látky **12**-Cu(II) komplexu typu [LM] boli získané metódou „out-of-cell“ titrácie. Jednotlivé body titrácie boli namiešané do samotných baničiek o objemu 1 ml. Baničky boli uzatvorené a roztoky v nich ponechané pri laboratórnej teplote po dobu 1 týždňa a následne bol zmeraný potenciál každej z nich pomocou nakalibrovannej elektródy. Meranie prebiehalo v oblasti pH 1,5 – 4,0. Konštanty a štandardné odchýlky boli vypočítané pomocou programu OPIUM.

### 3.2.8 UV-Vis titrácie

UV-Vis titrácie boli prevedené na získanie konštanty stability komplexu [HLM] pre látku **12** s Cu(II) v rozmedzí pH 0,0 – 1,5. Bolo pripravených 15 baničiek. Do samostatných baničiek boli namiešané jednotlivé hodnoty pH ( $\Delta$  pH 0,1) o celkovom objeme 1 ml. Pre prípravu boli použité zásobné roztoky, ktoré boli použité aj pri potenciometrických stanoveniach a žiadané pH bolo dosiahnuté pomocou zásobného roztoku HCl o koncentrácií 1,0 a 2,0 M. Koncentrácia ligandu bola 2,5mM. Baničky boli ponechané pri laboratórnej teplote po dobu 1 týždňa. Následne boli premerané pH jednotlivých bodov na pH metri Jenway 3505 a absorpčné spektrá boli namerané na spektrofotometri Specord 50 Plus (Analytik Jena AG). Merania prebiehali v kyvetách o optickej dĺžke 10 mm. Sledovaná bola oblasť v rozsahu 400 – 1100 nm a absorpčné maximum bolo nájdené pri 591 nm. Konštanty stability a zastúpenie jednotlivých častíc boli vyhodnotené spolu s dátami potenciometrických titrácií získaných metódou „out-of-cell“ a to pomocou programu OPIUM.

### 3.3 Syntetická časť

#### 3.3.1 Príprava derivátu thioflavínu T

Pre prípravu fluorescenčnej značky boli testované dva postupy:

- priama syntéza:

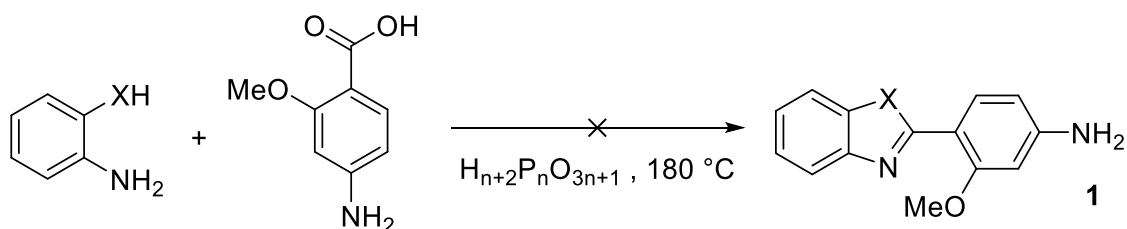


Schéma 1: Schéma pre prípravu látky **1**.  $X = S$  v prípade látky **1a**, prebraté z ref.<sup>13</sup> V prípade látky **1b** je  $X = O$ , prebraté z ref.<sup>30</sup>

- syntéza v dvoch krokoch:

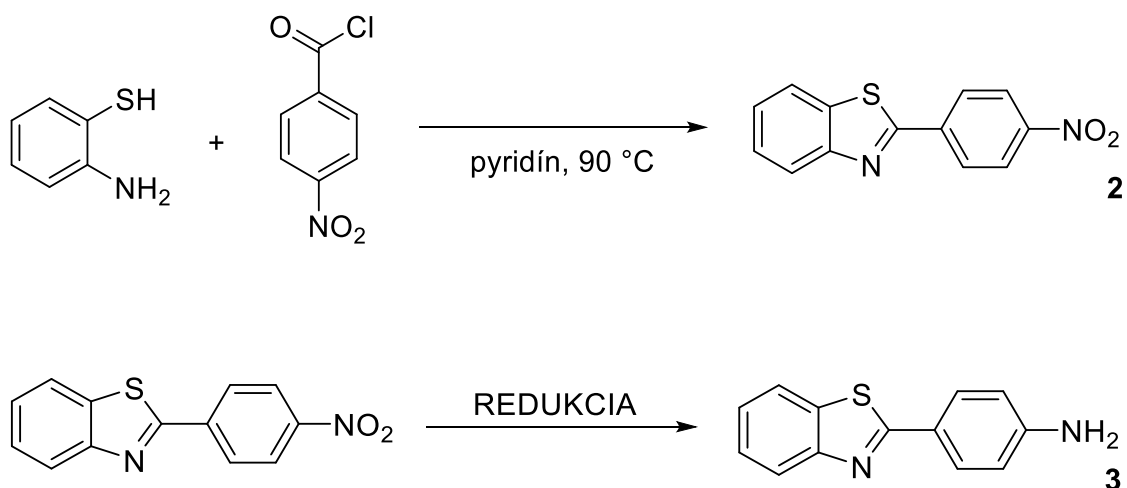
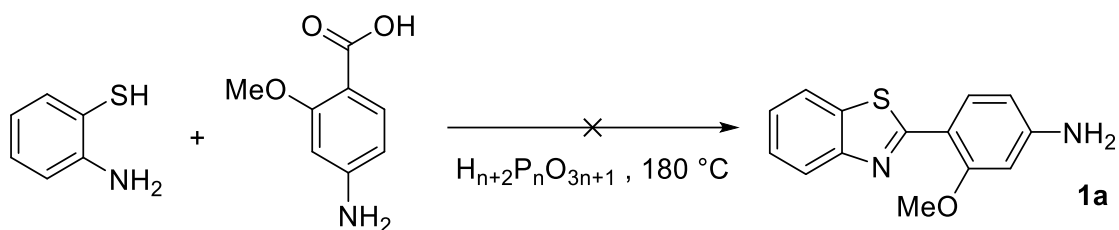


Schéma 2: súhrnná schéma syntézy fluorescenčnej značky: 4-(benzo[d]thiazol-2-yl)anilínu. Príprava 2-(4-nitrofenyl)benzo[d]thiazolu (látko **2**) prebraté z ref.<sup>1</sup>, príprava 4-(benzo[d]thiazol-2-yl)anilínu (látko **3**) bola vyskúšaná redukciami pomocou: a)  $\text{SnCl}_2$  v prostredí bezvodého etanolu a pri teplote  $70^\circ\text{C}$ , prebraté z ref.<sup>2</sup>, b)  $\text{Fe}$  pilín a  $\text{CaCl}_2$  v prostredí etanol:voda v pomere 9:1 a pri teplote  $60^\circ\text{C}$ , prebraté z ref.<sup>3</sup>, c)  $\text{Pd/C}$  v autokláve v prostredí  $\text{H}_2$  (7 bar) a dichlórmetáne pri laboratórnej teplote, prebraté z ref.<sup>4</sup>

### 3.3.2 Pokus o prípravu 4-(benzo[*d*]thiazol-2-yl)-3-metoxyanilínu (1a), prevzaté z ref<sup>13</sup>



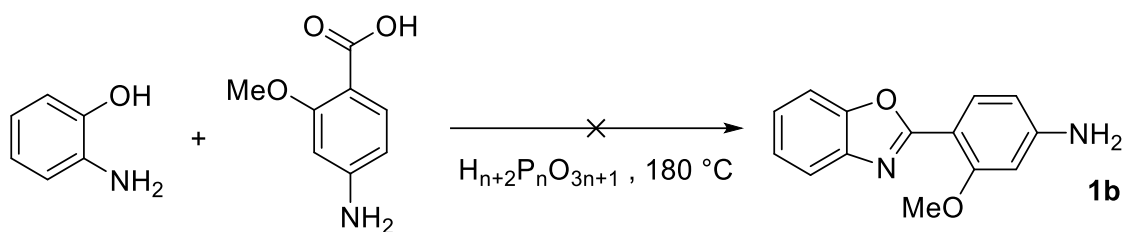
4-amino-2-metoxybenzoová kyselina (10,0 mmol; 1,67 g, 1,0 ekv.) bola navážená spolu s kyselinou polyfosforečnou (5,0 g) v banke, prefúknutej argónom. Reakčná zmes bola zahriata na teplotu 180 °C a následne bol do zmesi v rozmedzí 30 minút po kvapkách pridaný 2-aminothiofenol (10,0 mmol; 1,32 g, 1,0 ekv.). Reakčná zmes bola následne miešaná po dobu 4 hod.

Po schladení na laboratórnu teplotu (RT) bola reakčná zmes neutralizovaná 10% roztokom  $K_2CO_3$  (približne 100 ml), kedy vznikala zrazenina. Po dosiahnutí pH okolo 8, monitorované univerzálnym pH papierikom, bola reakčná zmes prefiltrovaná a zrazenina rozpustená v EtOAc a ponechaná kryštalizácií cez noc pri RT a ďalšiu noc v chladničke.

Po nameraní  $^1H$  NMR spektra získaného pevného produktu v  $CDCl_3$  neboli prítomné chemické posuny, ktoré by poukazovali na prítomnosť produktu podľa použitej literatúry.<sup>13</sup>

Následne sa otestovali zmeny v reakčných podmienkach pre prípravu látky **1a**. Najskôr bola predĺžená reakčná doba a zmes bola monitorovaná pomocou TLC vždy po 2 hod. po dobu 8 hod. a to za použitia Hex:EtOAc (8:1). Ako štandardy boli použité reaktanty a zmes, ktorá bola získaná po prvom experimente. Reakčná zmes bola ponechaná následne miešaniu cez noc avšak TLC po 24 hod. nevykazovalo iné výsledky ako použitý štandard z prvého experimentu.

### 3.3.3 Pokus o prípravu 4-(benzo[d]oxazol-2-yl)-3-metoxyanilínu (1b), prevzaté z ref<sup>30</sup>



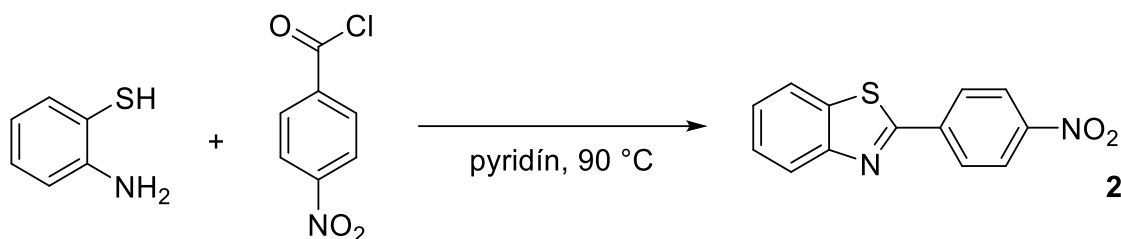
4-amino-2-metoxybenzoová kyselina (10,0 mmol; 1,67 g, 1,0 ekv.) spolu s 2-aminofenolom (10,0 mmol; 1,09 g, 1,0 ekv.) a kyselinou polyfosforečnou (5,0 g) bola navážená v banke a prefúknutá argónom, aby bola zaistená inertná atmosféra. Reakčná zmes bola miešaná pri teplote  $180\text{ }^\circ\text{C}$  po dobu 4 hodín a potom monitorovaná TLC platničkou za použitia Hex:EtOAc (8:1) ako mobilnej fázy.

Reakčná zmes bola najskôr zneutralizovaná pomocou 10% roztoku  $K_2CO_3$  (približne 100 ml) pokiaľ nebolo dosiahnuté pH okolo 8, sledované univerzálnym pH papierikom. Následne bola zmes extrahovaná etylacetátom ( $2 \times 40\text{ ml}$ ) a organická časť bola ešte premytá nasýteným roztokom NaCl ( $2 \times 40\text{ ml}$ ). Organická časť bola presušená bezvodým  $Na_2SO_4$  a zahustená na rotačnej vákuovej odparke (RVO). Nasledovalo delenie vzniknutej zmesi na silikagélu použitím rovnakej mobilnej fázy ako pri TLC monitorovaní – Hex:EtOAc (8:1). Delenie podalo dve frakcie, avšak ani jedna nepodala  $^1H$  NMR spektrum, ktoré by korelovalo so žiadaným produktom.

Postup bol opakovaný niekoľko krát k dosiahnutiu lepších reakčných podmienok. Jednalo sa o predlžovanie reakčnej doby, zmeny pomeru vstupujúcich látok či zmeny množstva rozpúšťadla. Avšak žiadaný produkt nebol dosiahnutý a schému syntézy fluorescenčnej značky bola upravená cez medziprodukt.



### 3.3.4 Syntéza 2-(4-nitrofenyl)benzo[*d*]thiazolu (2), prevzaté z ref<sup>31</sup>



*Para*-nitrobenzoyl chlorid (30,0 mmol; 5,57 g) bol rozpustený v pyridíne (40 ml) za zvýšenej teploty, pri 90 °C. Ten bol potom pridávaný prikvapkávaním k 2-aminothiofenolu (30,0 mmol; 3,3 ml) po dobu 30 minút. Keď bol pridaný všetok *para*-nitrobenzoyl chlorid v pyridíne, tak bola ponechaná reakčná zmes k miešaniu pod refluxom po dobu 1 hod. Následne bola reakčná zmes vybratá z olejového kúpeľa a ponechaná tak, aby sa ochladila na RT.

Potom bola zmes preliata do destilovanej vody (200 ml). Vzniknutá zrazenina bola prefiltrovaná na Büchnerovom lieviku, premytá destilovanou vodou, rozpustená na výhrevnom hniezde v etanole (96 % etanol, 4 % voda) a ponechaná kryštalizovať po dobu 4 dní. Výsledný produkt bol potom zase prefiltrovaný cez Büchnerov lievik.

Získaná látka bola žltej farby a vzniknuté kryštály boli príliš malé na získanie informácií z XRD. Bola odobraná vzorka na NMR spektrometriu pre jadrá <sup>1</sup>H a <sup>13</sup>C. Výťažok bol 5,51 g, 72 %.

#### 3.3.4.1 Charakterizácia 2-(4-nitrofenyl)benzo[*d*]thiazolu

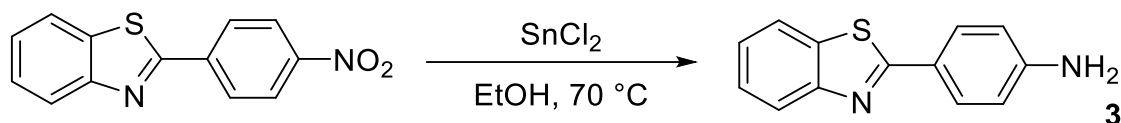
<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 8,37 (d, *J* = 8,5 Hz, 2H), 8,28 (d, *J* = 8,6 Hz, 2H), 8,14 (d, *J* = 8,1 Hz, 1H), 7,97 (d, *J* = 8,0 Hz, 1H), 7,56 (t, *J* = 7,6 Hz, 1H), 7,47 (t, *J* = 7,6 Hz, 1H).

Teplota topenia: 230,9 °C je zhodná s uvedenou teplotou v publikácií.<sup>31</sup>

<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 164,91, 154,95, 149,05, 139,08, 128,17, 127,04, 126,28, 124,46, 123,76, 121,80.

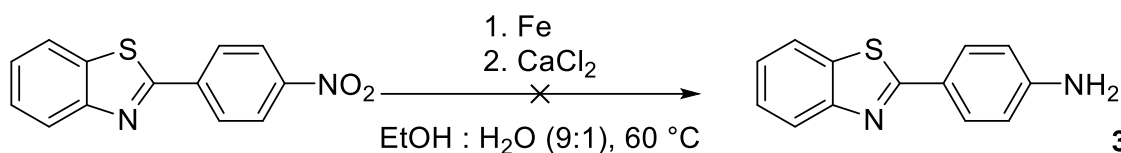
### 3.3.5 Syntéza 4-(benzo[d]thiazol-2-yl)anilínu (3)

#### 3.3.5.1 Redukcia pomocou chloridu cínatého, prevzaté z ref<sup>32</sup>



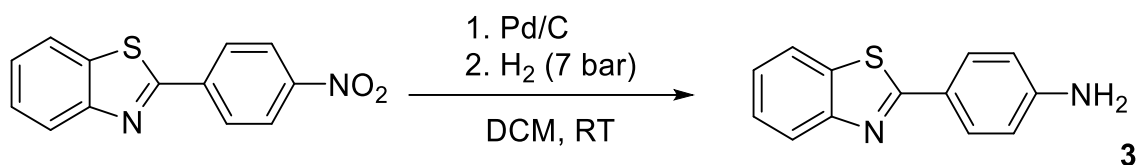
Postup bol zopakovaný podľa použitej literatúry<sup>32</sup> bez poskytnutia produktu a preto boli zmenené podmienky reakcie. Najskôr sa jednalo o zmenu času a reakcia bola monitorovaná pomocou TLC za použitia mobilnej fáze Hex:EtOAc (8:1). Reakčná zmes bola monitorovaná po 8 hodinách po dobu 4 dní, kedy na TLC bola vždy prítomná rovnako veľká škvrna na  $R_f = 0,3$ , čo odpovedalo vznikajúcemu žiadanému produktu, avšak pri následnom spracovaní a nameraní <sup>1</sup>H spektra na NMR spektrometri bola viditeľná majoritná prítomnosť použitých reaktantov. Preto boli podmienky upravené na iný pomer reaktantov, a to z pôvodného 1:5 na 1:10 a ponechaná reakčná doba 4 dni. Zmes bola následne spracovaná pomocou stĺpcovej chromatografie na silike za použitia mobilnej fáze Hex:EtOAc (8:1). Mobilná fáza bola graduálne menená na polárnejšiu. Od látky získanej u  $R_f = 0,3$  bolo odparené rozpúšťadlo a pripravená vzorka do kyvety na <sup>1</sup>H NMR spektrometriu. <sup>1</sup>H NMR spektrum poukazovalo na prítomnosť žiadaného produktu. Avšak výťažok z reakčnej zmesi nebol dostatočný ani po takto upravených podmienkach a preto boli vyskúšané iné možnosti redukcie.

#### 3.3.5.2 Redukcia pomocou železných pilín v prostredí chloridu vápenatého, prevzaté z ref<sup>33</sup>



Postup bol reprodukován podľa použitej literatúry.<sup>33</sup> Po spracovaní reakčnej zmesi s následnou detekciou pomocou <sup>1</sup>H NMR spektrometrie neboli prítomné charakteristické posuny pre požadovaný produkt, čo bolo potvrdené aj pomocou hmotnostnej spektrometrie.

### 3.3.5.3 Redukcia pomocou paládia na uhlí v prostredí vodíku, prevzaté z ref<sup>β4</sup>



2-(4-nitrofenyl)benzo[*d*]thiazol (1,95 mmol; 0,50 g) bol rozpustený spolu s 10% ekvivalentom paládia na uhlí (0,050 g) v dichlórmetáne (20 ml) (DCM). Banka bola vložená do autoklávu a ten bol prefúknutý argónom a napustený vodíkom (7,0 bar). Autokláv bol pripevnený na magnetickú miešačku a reakčná zmes bola miešaná pri RT po dobu 36 hodín. Po 24 hodinách klesol tlak vodíku v autokláve na 3,0 bar a preto bol opäť dofúknutý na 7,0 bar.

Po 36 hodinách bola reakcia ukončená a prebytočné paládium na uhlí bolo odstránené cez mikrofilter. DCM bol odparený na RVO, nasledovalo monitorovanie reakčnej zmesi <sup>1</sup>H NMR spektrometriou v CDCl<sub>3</sub>, kedy sa v reakčnej zmesi nachádzal ako aj žiadaný produkt, tak aj reaktant. Preto bola reakčná zmes rozdelená na FLASH chromatografií za použitia mobilnej fáze DCM ako fáze A, fáza B bola zmes DCM:MeOH (100:1). Z oboch mobilných fáz, A ako aj B, bolo pridávané gradientovo, pričom produkt bol získaný pri použití oboch rozpúšťadiel 1:1 a pri vlnovej dĺžke 366 nm.

Následne bolo odparené rozpúšťadlo zo získaných frakcií s produktom. Získaná látka bola žltej farby. Boli odobrané vzorky na NMR spektrometriu pre jadrá <sup>1</sup>H a <sup>13</sup>C. <sup>1</sup>H NMR spektrum je uvedené v prílohe 1 a <sup>13</sup>C NMR spektrum je uvedené v prílohe 2. Charakterizácia látky bola aj pomocou XRD difrakcie na monokryštáli, kedy sa produkt podarilo rekryštalizovať z MeOH pri RT. Výťažok činil 0,18 g, 41 %.

Reakcia bola opakovaná pri ponechaní reakčnej zmesi v autokláve po dobu 4 dní, pri dofukovaní vodíku na tlak 7,0 bar každých 24 hod. Po odstránení paládia na uhlí mikrofiltrom a odparení rozpúšťadla na RVO bola opäť pripravená vzorka na <sup>1</sup>H NMR spektrometriu, ktorá poukazovala na prítomnosť samotného produktu. Redukcia tak podala 100% výťažok.

#### 3.3.5.4 Charakterizácia 4-(benzo[d]thiazol-2-yl)anilínu

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 8,02 (d,  $J = 8,1$  Hz, 1H), 7,92 (d,  $J = 7,9$  Hz, 2H), 7,87 (d,  $J = 8,1$  Hz, 1H), 7,47 (t,  $J = 7,3$  Hz, 1H), 7,34 (t,  $J = 7,3$  Hz, 1H), 6,76 (d,  $J = 8,6$  Hz, 2H), 3,91 (s, 2H).

$^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 169,53, 153,66, 143,59, 134,08, 129,18, 126,08, 124,41, 122,44, 121,35, 114,74.

### 3.3.6 Príprava ligandu L1

#### 3.3.6.1 Syntéza reaktantov pre testovanie cyklizácie

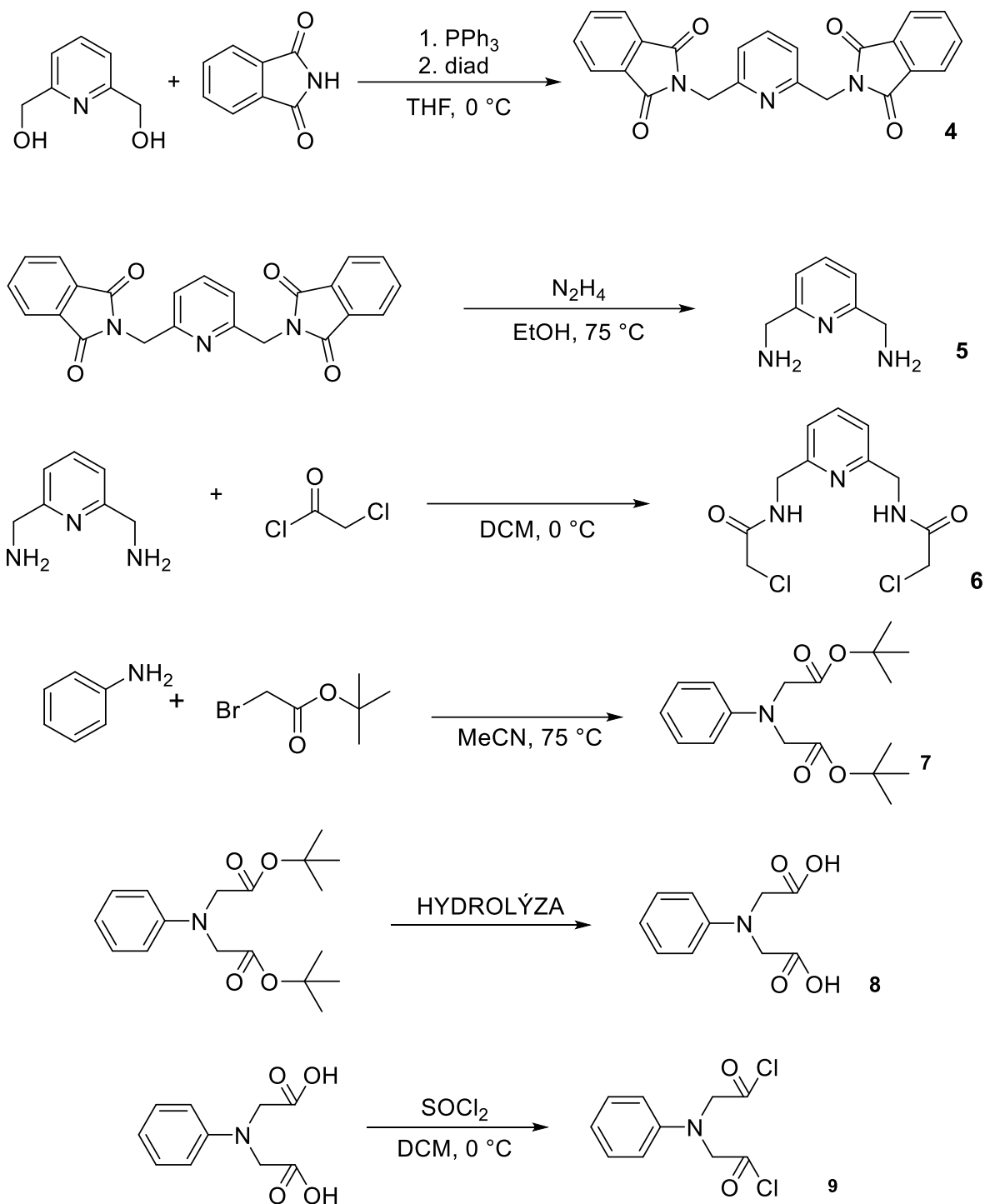


Schéma 3: Postupná schéma plánovanej syntézy modelovej látky 6-(4-(benzo[d]thiazol-2-yl)fenyl)-3,6,9-triaza-1(2,6)-pyridinacyklodekafán-4,8-dión (látko 10) pre optimalizáciu podmienok pre prípravu L1. Postup syntézy 2,6-bis(ftalimidometyl)pyridínu (látko 4) a 2,6-bis(aminometyl)pyridínu (látko 5) je prevzatý z ref.<sup>35</sup> Postup prípravy 2,6-bis(chlóracetamidmetyl)pyridínu (látko 6) bol

prevzatý z ref.<sup>36</sup> Postup prípravy dietyl 2,2'-(fenylazandiyl)diacetátu (látka 7) bol prevzatý z ref.<sup>37</sup> Postup prípravy 2,2'-(fenylazandiyl)diocetovej kyseliny (látka 8) bol prevzatý a upravený z ref.<sup>38</sup> a ref.<sup>39</sup> Postup prípravy 2,2'-(fenylazandiyl)diacetylchloridu (látka 9) bol prevzatý z ref.<sup>40</sup>

### 3.3.6.2 Testovanie cyklizačných reakcií

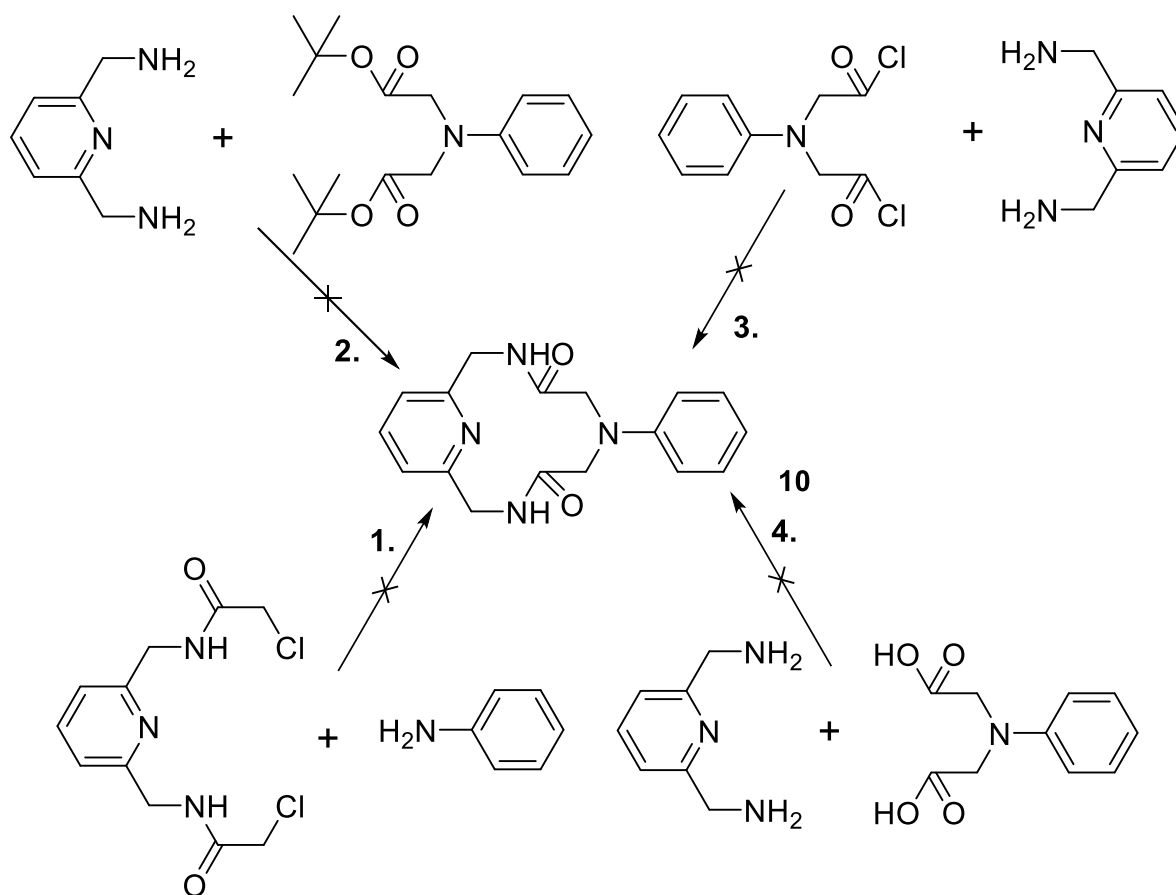
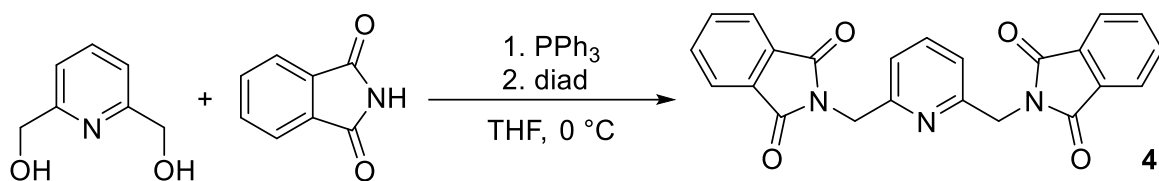


Schéma 4: Vyskúšané reakčné postupy pre prípravu modelovej látky **10**, pre optimalizáciu prípravy **L1**. Postupy boli modifikované na základe znalostí reaktivity chloridov (postup **1.** a **3.**) a esterov karboxylových kyselín (postup **2.**) ako aj samotných kyselín (postup **4.**). Reaktanty boli pripravené podľa postupov z použitej literatúry<sup>36-40</sup> a do reakcie vstupovali ako čisté látky. Taktiež všetky použité rozpúšťadlá boli dopredu presušené, aby sa zamedzilo prístupu nečistôt. Každá reakcia prebiehala za inertnej atmosféry.

### 3.3.7 Syntéza 2,6-bis(ftalimidometyl)pyridínu (4), prevzaté z ref<sup>35</sup>



Trifenylfosfín (36,5 mmol; 9,55 g; 2,0 ekv.) bol spolu s ftalimidom (38,32 mmol; 5,61 g; 2,1 ekv.) a s 2,6-bis(metanol)pyridínom (18,25 mmol; 2,54 g; 1,0 ekv.) rozpustený v suchom tetrahydrofuráne (THF) (200 ml) v banke za prístupu argónu, aby bola zabezpečená inertná atmosféra a za teploty 0 °C v ľadovom kúpeli. Následne bol pridávaný po dobu 30 min. diisopropylazodikarboxylát (diad) (45,83 mmol; 9,0 ml; 2,5 ekv.), ktorý bol dopredu rozpustený v 10 ml suchého THF za inertnej atmosféry. Takto pripravená reakčná zmes bola ponechaná ohriatiu na RT a miešaniu na magnetickej miešačke cez noc.

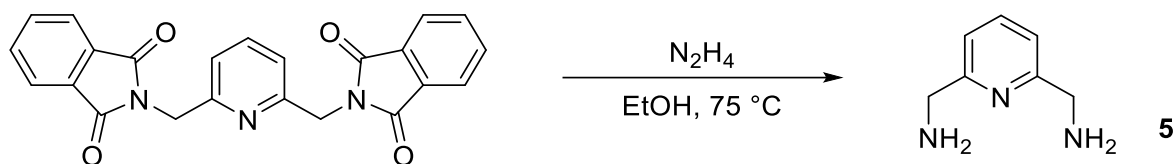
Následujúci deň bola reakcia zastavená a vzniknutá zrazenina oddelená od rozpúšťadla pomocou filtrácie na Büchnerovom lieviku. Zrazenina bola rozpustená v ultrazvuku v zmesi rozpúšťadiel DCM:THF (8:1, 270 ml) po dobu 15 min. Následne bola reakčná zmes opäť prefiltrovaná na frite, kde produkt ostal v podobe bieleho prášku.

Z tohto prášku bola odobraná vzorka na NMR spektrometriu pre jadrá <sup>1</sup>H, kedy meranie bolo prevedené v CDCl<sub>3</sub>. Výtťažok bol 4,71 g, 65 %.

#### 3.3.7.1 Charakterizácia 2,6-bis(ftalimidometyl)pyridínu

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 7,80 – 7,65 (m, 8H), 7,59 (t, *J* = 7,8 Hz, 1H), 7,12 (d, *J* = 7,6 Hz, 2H), 4,92 (s, 4H).

### 3.3.8 Syntéza 2,6-bis(aminometyl)pyridínu (5), prevzaté z ref<sup>35</sup>



Získaný produkt predchádzajúcej reakcie, 2,6-bis(ftalimidometyl)pyridín (11,84 mmol; 4,68 g; 1,0 ekv.) bol rozpustený v 120 ml absolútneho etanolu. Pri refluxe bol pridaný hydrazín (118,4 mmol; 5,84 ml; 10,0 ekv.). Reakčná zmes bola miešaná pri refluxe po celú noc, kedy sa vytvorila v reakčnej zmesi biela zrazenina.

Reakčná zmes bola potom ochladená na RT a zrazenina odfiltrovaná. Zo získaného filtrátu bolo odparené rozpúšťadlo na RVO a reakčná zmes bola rozpustená v 150 ml  $\text{CHCl}_3$  a vzniknutá zrazenina bola opäť prefiltrovaná. Získaný filtrát bol presušený bezvodým  $\text{MgSO}_4$ . Produkt bol následne získaný odparením rozpúšťadla na RVO kedy bol získaný žltý olej, ktorý kryštalizoval pri ochladení v chladničke.

Zo získaného produktu bola odobraná vzorka na NMR spektrometriu pre jadrá  $^1\text{H}$  a  $^{13}\text{C}$ . Výťažok reakcie bol 0,70 g, 43 %.

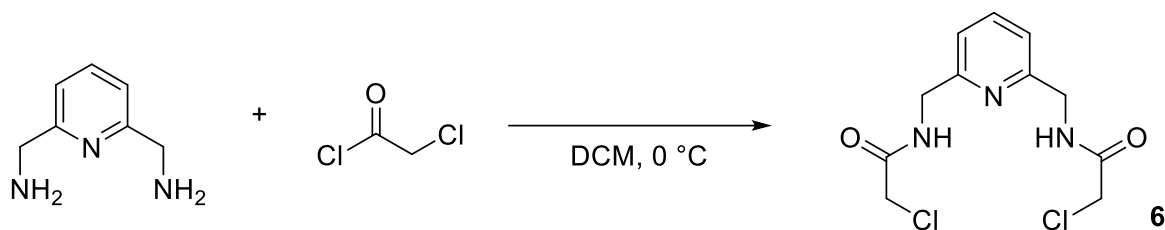
#### 3.3.8.1 Charakterizácia 2,6-bis(aminometyl)pyridínu

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$ : 7,68 (t,  $J = 7,7$  Hz, 1H), 7,25 (d,  $J = 7,7$  Hz, 2H), 3,77 (s, 4H), 2,28 (bs, 4H).

$^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$ : 162,71, 137,21, 118,98, 47,86.



### 3.3.9 Syntéza 2,6-bis(chlóracetamidmetyl)pyridínu (6), prevzaté z ref<sup>36</sup>



2,6-bis(aminometyl)pyridín (1,50 mmol; 0,20 g; 1,0 ekv.) bol rozpustený v 20 ml DCM v ľadovom kúpeli za teploty 0 °C. K tomuto roztoku bol postupne po dobu 10 minút pridávaný chlóracetylchlorid (3,00 mmol; 0,24 ml; 2,0 ekv.). Reakčná zmes bola ponechaná ohriatiu na RT a miešaniu na magnetickej miešačke cez noc.

Nasledujúci deň bol žiadaný produkt extrahovaný do nasýteného roztoku NaHCO<sub>3</sub> (približne 30 ml) a odtiaľ opäť do DCM (3 × 20 ml). Organické časti boli následne premyté ešte roztokom solanky a presušené bezvodým MgSO<sub>4</sub>, ktoré bolo potom z roztoku odfiltrované. Zo získaného filtrátu bol DCM odparený na RVO. Získaný produkt bol olej oranžovej farby.

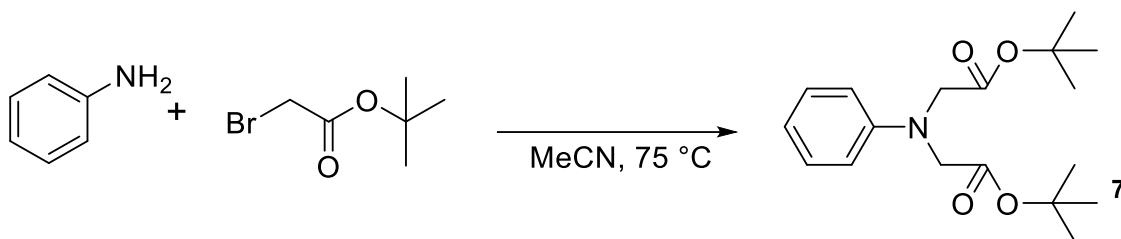
Zo získaného produktu bola odobraná vzorka na NMR spektrometriu pre jadrá <sup>1</sup>H a <sup>13</sup>C. Výťažok reakcie bol 0,21 g, 33 %.

#### 3.3.9.1 Charakterizácia 2,6-bis(chlóracetamidmetyl)pyridínu

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 7,68 (t, J = 7,7 Hz, 1H), 7,25 (d, J = 7,7 Hz, 2H), 3,77 (s, 4H), 2,28 (bs, 4H).

<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 166,10, 155,43, 137,83, 120,61, 44,40, 42,71.

### 3.3.10 Syntéza di-*tert*-butyl-2,2'-(fenylazandiyl)diacetátu (7), prevzaté z ref<sup>37</sup>



Anilín (10,74 mmol; 0,98 ml; 1,0 ekv.) bol rozpustený v 70 ml suchého MeCN spolu s KI (32,22 mmol; 5,55 g; 3,0 ekv.) a K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (53,70 mmol; 7,42 g; 5,0 ekv.) za inertnej atmosféry za prístupu argónu. Reakčná zmes bola potom zahriata k refluxu a po dobu 30 minút bol pridaný *tert*-butyl-2-bromoacetát (53,70 mmol; 7,92 ml; 5,0 ekv.). Reakčná zmes bola ponechaná miešaniu za refluxu po dobu 24 hod.

Následne bol odstránený MeCN na RVO a reakčná zmes bola rozpustená do destilovanej vody. Potom bola reakčná zmes extrahovaná do CHCl<sub>3</sub> (3 × 40 ml). Organické časti boli presušené bezvodým Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Síran odfiltrovaný a CHCl<sub>3</sub> odparený na RVO. Nasledovalo čistenie stĺpcovou chromatografiou v prostredí CHCl<sub>3</sub>:EtOAc (10:1) s *R<sub>f</sub>* = 0.6.

Zo získaného produktu bola odobraná vzorka na NMR spektrometriu pre jadrá <sup>1</sup>H a <sup>13</sup>C. Výťažok reakcie bol 2,88 g, 83 %.

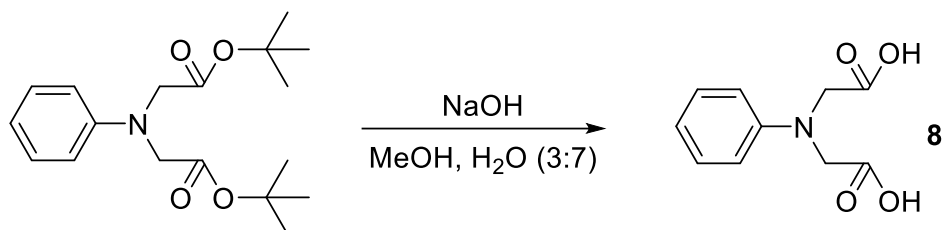
#### 3.3.10.1 Charakterizácia di-*tert*-butyl-2,2'-(fenylazandiyl)diacetátu

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 7,20 (t, *J* = 7,98 Hz, 2H), 6,73 (t, *J* = 7,35 Hz, 1H), 6,57 (d, *J* = 7,98 Hz, 2H), 4,00 (s, 4H), 1,45 (s, 18H)

<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 170,34, 148,45, 129,22, 117,89, 112,34, 81,28, 54,51, 28,08.

### 3.3.11 Syntéza 2,2'-(fenylazandiyl)diocetovej kyseliny (8)

#### 3.3.11.1 Bazická hydrolyza, prevzaté z ref<sup>8</sup>

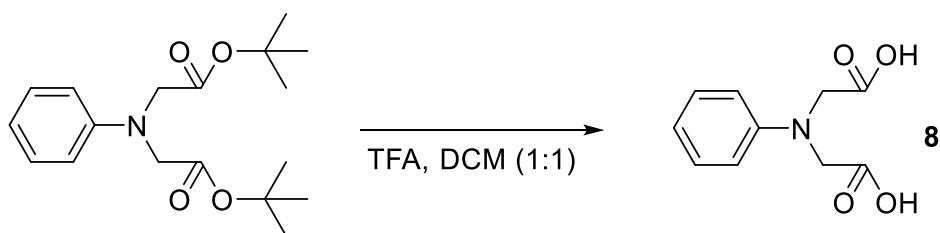


Di-*tert*-butyl-2,2'-(fenylazandiyl)diacetát (5,50 mmol; 1,77 g, 1,0 ekv.) bol navážený spolu s NaOH (24,2 mmol; 0,968 g; 4,4 ekv.). Potom bola banka prefúknutá argónom a bolo pridaných 15 ml MeOH spolu s 35 ml H<sub>2</sub>O. Reakčná zmes bola miešaná za inertnej atmosféry cez noc.

Nasledujúci deň boli rozpúšťadlá odparené na RVO a reakčná zmes rozpustená do destilovanej vody a extrahovaná CHCl<sub>3</sub> (3 × 40 ml). Pozbierané vodné časti boli odparené na RVO.

Zo získaného produktu bola odobraná vzorka na NMR spektrometriu pre jadrá <sup>1</sup>H a <sup>13</sup>C. Výťažok reakcie bol 0,46 g, 40 %.

#### 3.3.11.2 Kyslá hydrolyza, prevzaté z ref<sup>9</sup>



Di-*tert*-butyl-2,2'-(fenylazandiyl)diacetát (3,14 mmol; 1,00 g) bol navážený do banky, ktorá bola následne prefúknutá argónom a ponorená do ľadového kúpeľa s teplotou 0 °C. Potom bolo pridaných 6 ml DCM a 6 ml TFA, a reakčná zmes miešaná za inertnej atmosféry cez noc.

Nasledujúci deň boli odparené rozpúšťadlá a premerané spektrá NMR <sup>1</sup>H a <sup>13</sup>C. Zistená prítomnosť nečistôt viedla k deleniu na stĺpcovej chromatografii za použitia mobilnej fázy Hex:EtOAc (3:1).

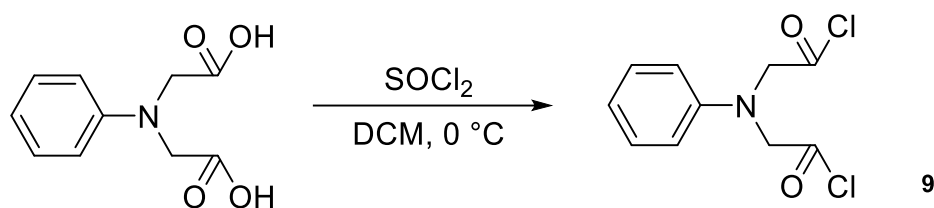
Zo získaného produktu bola odobraná vzorka na NMR spektrometriu pre jadrá  $^1\text{H}$  a  $^{13}\text{C}$ . Výťažok reakcie bol 0,23 g, 35 %.

### 3.3.11.3 Charakterizácia 2,2'-(fenzylazandiyl)diocetovej kyseliny

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$ : 7,19 (t,  $J = 8,02$  Hz, 2H), 6,74 (t,  $J = 7,33$  Hz, 1H), 6,59 (d,  $J = 8,02$  Hz, 2H), 4,01 (s, 4H).

$^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$ : 170,25, 148,12, 129,16, 117,82, 112,27, 54,51.

### 3.3.12 Príprava 2,2'-(fenylazandiyl)diacetyl chloridu (9) prevzaté z ref<sup>40</sup>



2,2'-(fenylazandiyl)diocetová kyselina (1,13 mmol; 0,20 g, 1,0 ekv.) bola rozpustená v 5 ml suchého DCM za prívodu argónu v ľadovom kúpeľi. Postupne bol pridávaný SOCl<sub>2</sub> (1,13 mmol; 0,10 ml; 1,0 ekv.) rozpustený v 5 ml suchého DCM. Reakčná zmes bola ponechaná k otepleniu na RT a miešaná cez noc.

Nasledujúci deň bolo koevaporáciou s H<sub>2</sub>O a EtOH odparené rozpúšťadlo a prebytok SOCl<sub>2</sub> na RVO. Detekcia prítomnosti produktu bola na analytickom HPLC na programe P34, s prítomnosťou jedného píku.

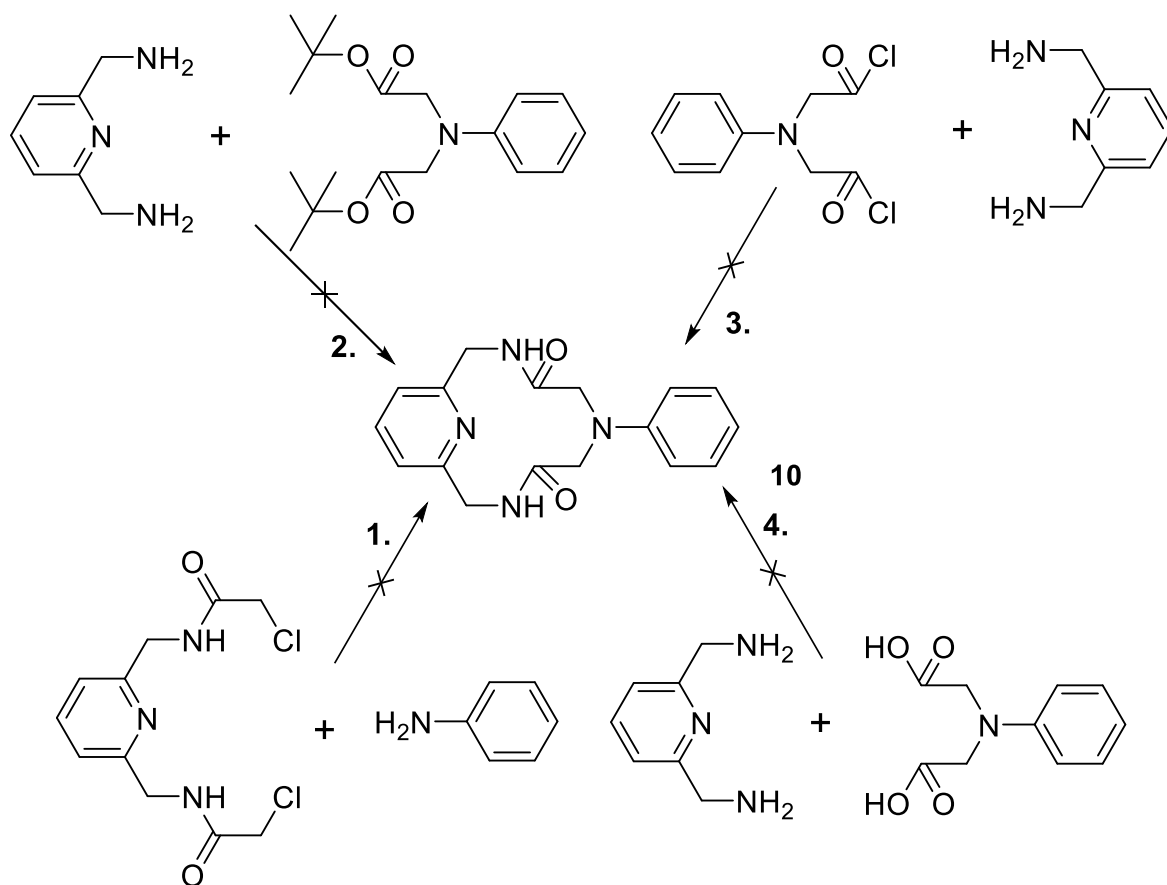
Zo získaného produktu bola odobraná vzorka na NMR spektrometriu pre jadrá <sup>1</sup>H a <sup>13</sup>C. Výťažok reakcie bol 0,215 g, 77 %.

#### 3.3.12.1 Charakterizácia 2,2'-(fenylazandiyl)diacetyl chloridu

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, D<sub>2</sub>O) δ: 7,19 (t, *J* = 8,02 Hz, 2H), 6,75 (t, *J* = 7,33 Hz, 1H), 6,61 (d, *J* = 8,02 Hz, 2H), 4,94 (s, 4H).

<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 168,20, 141,93, 126,16, 119,04, 113,04, 70,26.

### 3.3.13 Testovanie cyklizačných reakcií ako podklad pre prípravu ligandu L1



#### 3.3.13.1 Postup 1.

*N,N'*-(pyridín-2,6-diylbis(metylen))bis(2-chloroacetamid) (1,0 ekv.) bol navážený spolu s  $K_2CO_3$  (10,0 ekv.) a tetrametylamóniumbromidom (1,0 ekv.) a rozpustený v 24 ml suchého MeCN za inertnej atmosféry. Reakčná zmes bola zahriata k refluxu (75 °C). Anilín (0,5 ekv.) bol rozpustený v 20 ml suchého MeCN a pomocou lineárnej pumpy bol pridaný do reakčnej zmesi v priebehu 8 hodín – prietok na lineárnej pumpe bol nastavený na 2,5 ml za hodinu. Reakcia bola monitorovaná pomocou MS a analytickým HPLC programom P34 a to vždy po 24 hodinách po dobu týždňa a to bez sledovanej zmeny. MS analýza potvrdila, že nedošlo k vzniku produktu.

Reakcia bola následne opakovaná za rozpustenia *N,N'*-(pyridín-2,6-diylbis(metylen))bis(2-chloroacetamid) (1,0 ekv.), LiBr (2,1 ekv.) a  $Na_2CO_3$  (9,0 ekv.) v 5 ml suchého MeCN za inertnej atmosféry. Reakčná zmes bola privedená k refluxu (75 °C) a následne bol pridaný anilín (1,01 ekv.) rozpustený v 1,5 ml suchého MeCN. Táto reakčná zmes bola tiež ponechaná miešaniu po dobu týždňa a monitorovaná analytickým HPLC programom 34 bez vzniku žiadaného produktu.

### 3.3.13.2 Postup 2.

Di-*terc*-butyl-2,2'-(fenylazandiyl)diacetát (1,0 ekv.) bol rozpustený v 20 ml čerstvo presušenom EtOH a privedený k refluxu (70 °C) pod inertnou atmosférou. 2,6-bis-(aminometyl)pyridín (1,0 ekv.) bol rozpustený v 20 ml EtOH a lineárnou pumpou pridaný do reakčnej zmesi v priebehu 12 hodín s prietokom 2,0 ml za hodinu. Reakčná zmes bola monitorovaná TLC platničkou v Hex:EtOAc (8:1) a DCM:MeOH (10:1). V oboch prípadoch sa po týždni začali ukazovať nové fláky avšak bola viditeľná aj prítomnosť reaktantov. Reakčná zmes bola spracovaná na zistenie možných produktov po týždni pomocou odparenia na RVO.

Následne bola prevedená HPLC-MS analýza, ktorá poukazovala na prítomnosť žiadaného produktu vo stopovom množstve oproti iným vznikajúcim produktom či reaktantom. Preto nasledovali pokusy o optimalizáciu reakcie v podobe zmeny rozpúšťadla, pre dosiahnutie vyššej teploty, medzi vyskúšanými boli: metanol (reflux pri 60 °C), dimetylsulfoxid (reflux pri 180 °C), izopropanol (reflux pri 80 °C), avšak žiadne z vyskúšaných rozpúšťadiel neposkytovalo produkty a pri kontrole na HPLC (P34) a <sup>1</sup>H NMR boli prítomné iba reaktanty. Druhou možnosťou bolo vyskúšať rýchlosť pridávania reaktantov do reakčnej zmesi. Di-*terc*-butyl 2,2'-(fenylazandiyl)diacetát (1,0 ekv.) bol rozpustený v 10 ml čerstvo presušenom EtOH. Tiež 2,6-bis-(aminometyl)pyridín (1,0 ekv.) bol rozpustený v 10 ml EtOH. Oba reaktanty boli pridávané lineárnou pumpou (2 ml/hod) do banky, v ktorej bolo 20 ml suchého EtOH privedeného k refluxu pod inertnou atmosférou. Reakcia po 2 týždňoch poskytla opäť iba stopové množstvo produktu v zmesi reaktantov a polymérnych produktov, ktoré bolo možné identifikovať iba na HPLC-MS. Ďalej bola vyskúšaná reakcia v menšom zriedení bez lineárnej pumpy, kedy oba reaktanty v pomere 1:1 boli rozpustené v 10 ml suchého EtOH za inertnej atmosféry avšak reakcia vôbec neprebehla.

### 3.3.13.3 Postup 3.

2,2'-(fenylazandiyl)diacetylchlorid (1,0 ekv.) bol navážený spolu s LiBr (2,0 ekv.) a Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (9,0 ekv.) a rozpustený v 6,0 ml suchého MeCN za inertnej atmosféry a reakčná zmes bola privedená k refluxu (75 °C). Postupne v priebehu 30 minút bol pridaný 2,6-bis-(aminometyl)pyridín (1,02 ekv.) rozpustený v 6,0 ml MeCN. Taktiež bol vyskúšaný postup rozpustenia 2,2'-(fenylazandiyl)diacetylchloridu (1,0 ekv.) a 2,6-bis-(aminometyl)pyridínu (1,0 ekv.) v 6,0 ml suchého THF za inertnej atmosféry privedené k refluxu (60 °C). Postupne

sa v priebehu 45 minút pridával *N,N*-diizopropyletylamín (2,0 ekv.) (DIPEA) rozpustený v 6,0 ml suchého THF.

Obe reakčné zmesi boli ponechané miešaniu 1 týždeň monitorované analytickým HPLC (P34) a to vždy po 24 hodinách a to bez sledovanej zmeny. Následná MS analýza potvrdila, že nedošlo k vzniku produktu ani v jednom prípade.

#### 3.3.13.4 Postup 4.

Posledný postup využíval znalosti prípravy peptidovej väzby za použitia 2,2'-(fenylazandiyl)dioctovej kyseliny, 2,6-bis-(aminometyl)pyridínu a dehydratačného činidla. V prvom prípade vyskúšanej reakcie bola 2,2'-(fenylazandiyl)dioctová kyselina (1,0 ekv.) spolu s 2,6-bis-(aminometyl)pyridínom (1,0 ekv.) a *N,N'*-dicyklohexylkarbodiimid (DCC) (2,0 ekv.) rozpustená v 5,0 ml DCM. Reakčná zmes bola miešaná v ľadovom kúpeli a ponechaná k otepleniu na RT pri miešaní po dobu 4 dní. V druhom prípade bola 2,2'-(fenylazandiyl)dioctová kyselina (1,0 ekv.) spolu s 2,6-bis-(aminometyl)pyridínom (1,0 ekv.) a 1-etyl-3-(3-dimetylamínopropyl)karbodiimid (EDC) (2,0 ekv.) rozpustená v 5,0 ml DCM. Reakčná zmes bola miešaná v ľadovom kúpeli a ponechaná k otepleniu na RT pri miešaní po dobu 4 dní. V oboch prípadoch sa na TLC platničke začali ukazovať rôzne škvrny okrem reaktantov – použitá mobilná fáza bola Hex:EtOAc (2:1).

Obe reakcie boli potom zriedené 15 ml EtOAc a extrahované 1M HCl (10 ml), nasýteným roztokom NaHCO<sub>3</sub> (10 ml) a solankou (10 ml). Organická fáza bola následne presušená bezvodým MgSO<sub>4</sub>, prefiltrovaná a odparená na RVO. Vzhľadom, na reakcie v malom množstve reaktantov a veľké množstvo pík na analytickom HPLC (P34) reakčná zmes nebola ďalej delená. Bolo prevedené HPLC – MS, ktoré poukazuje na prítomnosť produktov v stopovom množstve v oboch prípadoch.



### 3.3.14 Príprava ligandu L2

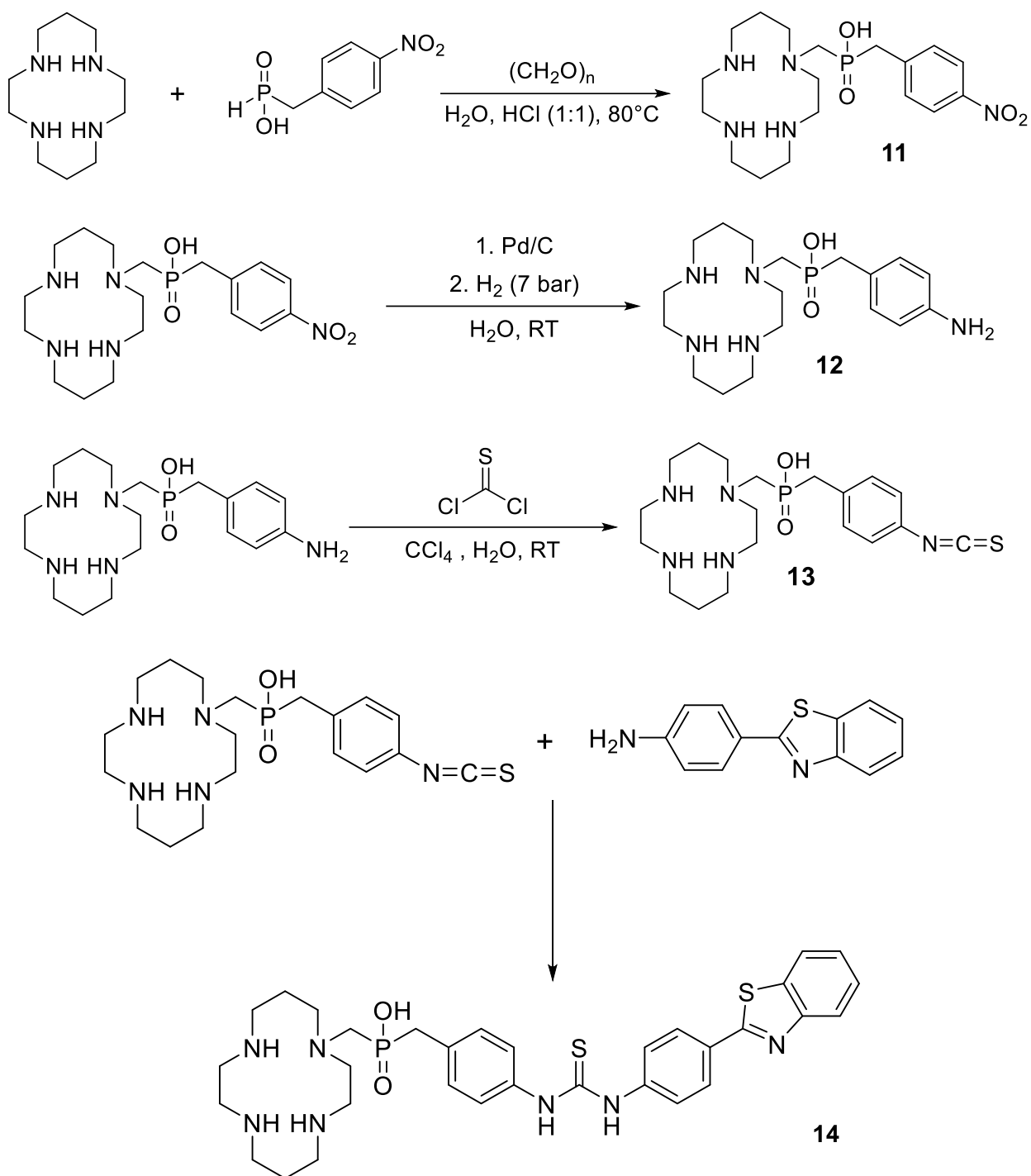
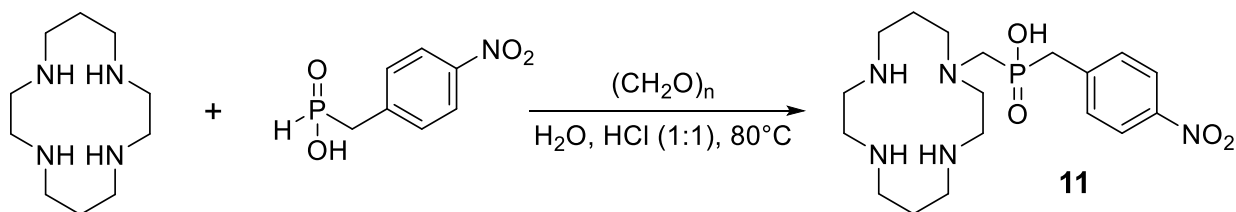


Schéma 5: Postupná schéma plánovanej syntézy ligandu L2 (látka 14). Postup syntézy ((1,4,8,11-tetraazacyklotetradekan-1-yl)metyl)(4-nitrobenzyl)fosfínovej kyseliny (látka 11) bol prevzatý zo skúseností v laboratóriu, ako aj postup prípravy ((1,4,8,11-tetraazacyklotetradekan-1-yl)metyl)(4-aminobenzyl)fosfínovej kyseliny (látka 12). Postup prípravy ((1,4,8,11-tetraazacyklotetradekan-1-yl)metyl)(4-isothiokyanatobenzyl)fosfínovej kyseliny (látka 13) bol prevzatý z ref.<sup>41</sup> Postup prípravy ligandu L2 bol prevzatý z ref.<sup>42</sup>

### 3.3.15 Príprava ((1,4,8,11-tetraazacyklotetradekan-1-yl)metyl)(4-nitrobenzyl)fosfínovej kyseliny (11)



Cyklám (10,79 mmol; 2,16 g; 3,0 ekv.) bol spolu s (4-nitrobenzyl)fosfínovou kyselinou (10,79 mmol; 2,17 g; 3,0 ekv.) rozpustený v 80 ml rozpúšťadiel  $\text{H}_2\text{O}:\text{HCl}$  (pomer 1:1). Následne bol do banky pridaný paraformaldehyd (3,60 mmol; 0,110 g; 1,0 ekv.) a banka bola uzavretá a utesnená parafilmom. Potom bola teplota olejového kúpeľa nastavená na  $80^\circ\text{C}$ . Reakčná zmes bola takto ponechaná miešaniu po dobu 3 dní pričom vždy po 24 hod. bola monitorovaná odobratím vzorky do NMR kyvety na pozorovanie zmeny chemických posunov reaktantov a vznikajúcich produktov pomocou  $^{31}\text{P}$  NMR.

Po troch dňoch bola reakcia zastavená a rozpúšťadlá odstránené na RVO. Následne bola reakčná zmes koevaporovaná v prostredí  $\text{H}_2\text{O}:\text{EtOH}$  (1:1) pokiaľ bola v reakčnej zmesi prítomná  $\text{HCl}$  – monitorovanie univerzálnym pH papierikom. Po odstránení  $\text{HCl}$  zo zmesi bola zmes rozdelená na ionexu, anexu. V  $\text{OH}^-$  cyklu bol regenerovaný nezreagovaný cyklám a produkt bol získaný 50% kyselinou octovou, ktorá bola odstránená RVO. Získaná bola zmes látok s majoritným zastúpením žiadaného produktu, čo potvrdilo  $^{31}\text{P}$  NMR, ktorá bola použitá do nasledujúceho kroku bez ďalšieho čistenia. Spektrum  $^1\text{H}$  NMR je uvedené v prílohe 3, spektrum  $^{13}\text{C}$  NMR je uvedené v prílohe 4 a spektrum  $^{31}\text{P}$  NMR je uvedené v prílohe 5. Výťažok bol 1,37 g, 92%.

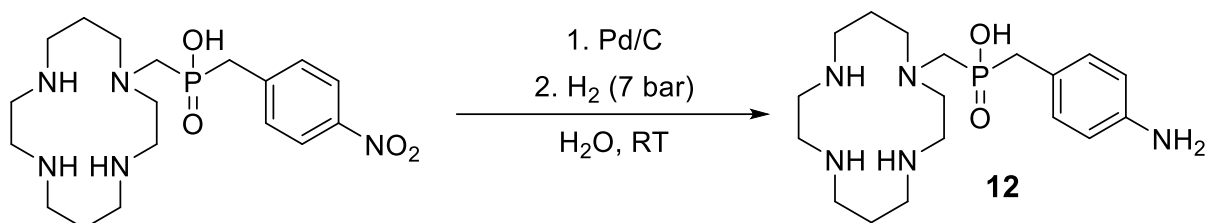
#### 3.3.15.1 Charakterizácia ((1,4,8,11-tetraazacyklotetradekan-1-yl)metyl)(4-nitrobenzyl)-fosfínovej kyseliny

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$ : 8,11 (d,  $J = 8,4$  Hz, 2H), 7,43 (d,  $J = 8,4$  Hz, 2H), 3,49 – 2,39 (m, 22H), 1,85 (s, 3H).

$^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$ : 145,53, 142,64, 130,16, 123,10, 56,47, 53,87, 52,54, 51,09, 47,88, 47,57, 46,08, 45,68, 45,01, 43,72, 24,15, 22,49.

$^{31}\text{P}$  NMR (121 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$ : 33,59, 33,14, 31,80, 29,58 ( $^{31}\text{P}$  NMR žiadaného produktu je 31,80).

### 3.3.16 Príprava ((1,4,8,11-tetraazacyklotetradekan-1-yl)metyl)(4-aminobenzyl)-fosfínovej kyseliny (12)



((1,4,8,11-tetraazacyklotetradekan-1-yl)metyl)(4-nitrobenzyl)fosfínová kyselina (1,14 mmol; 0,47 g; 1.0 ekv.) bola navážená spolu s 10% ekvivalentom paládia na uhlí (0,047 g) a rozpustená vo vodnom prostredí (20 ml). Banka bola následne vložená do autoklávu. Ten bol prefúknutý argónom, a potom bol napustený vodíkom (7,0 bar). Autokláv bol pripevnený na magnetickú miešačku a reakčná zmes bola ponechaná miešaniu pri RT po dobu 48 hodín.

Po 48 hodinách bola reakcia ukončená a prebytočné paládium na uhlí bolo odstránené cez mikrofilter. Voda bol odparená na RVO. Následne bola odobraná vzorka na <sup>31</sup>P NMR. Reakčná zmes bola delená na stĺpcovej chromatografii s mobilnou fázou EtOH:NH<sub>3</sub> (3:1), ktorá bola gradientovo menená až na 1:1. *R<sub>f</sub>* produktu bolo 0,1.

Zo získaného produktu bola odobraná vzorka na NMR spektrometriu pre jadrá <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C a <sup>31</sup>P. Spektrum <sup>1</sup>H NMR je uvedené v prílohe 6, spektrum <sup>13</sup>C NMR je uvedené v prílohe 7 a spektrum <sup>31</sup>P NMR je uvedené v prílohe 8. Výťažok reakcie bol 0,218 g, 50 %.

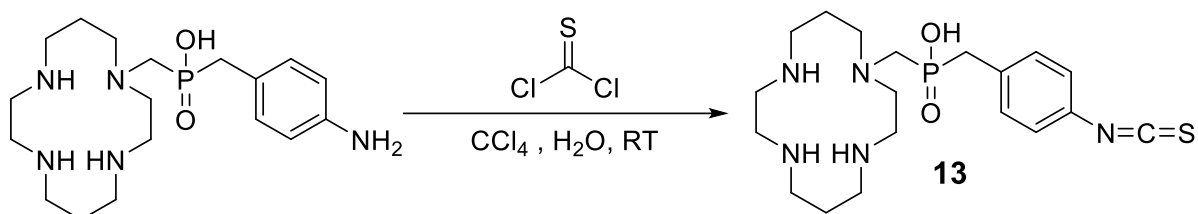
#### 3.3.16.1 Charakterizácia ((1,4,8,11-tetraazacyklotetradekan-1-yl)metyl)(4-aminobenzyl)-fosfínovej kyseliny

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, D<sub>2</sub>O) δ: 7,12 (d, *J* = 8,2 Hz, 2H), 6,83 (d, *J* = 8,2 Hz, 2H), 3,53 – 2,48 (m, 22H), 1,96 – 1,63 (m, 5H).

<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, D<sub>2</sub>O) δ: 144,32, 130,36, 124,92, 116,68, 56,21, 53,87, 48,86, 48,46, 46,42, 45,15, 44,50, 24,84, 22,81.

<sup>31</sup>P NMR (121 MHz, D<sub>2</sub>O) δ: 35,69.

### 3.3.17 Príprava ((1,4,8,11-tetraazacyklotetradekan-1-yl)metyl)(4-isothiokyanatobenzyl)fosfínovej kyseliny (13), prevzaté z ref<sup>41</sup>



((1,4,8,11-tetraazacyklotetradekan-1-yl)metyl)(4-aminobenzyl)fosfínová kyselina (0,26 mmol; 0,10 g; 1,0 ekv.) bola navážená do plastovej vialky a rozpustená v 1,5 ml H<sub>2</sub>O a pH bolo upravené na 2-3 koncentrovanou HCl, detekované univerzálnym pH papierikom. V ďalšom kroku bol pridaný thiofosgén (0,312 mmol; 27  $\mu$ l, 1,2 ekv.) rozpustený v 1,5 ml CCl<sub>4</sub>. Plastová vialka bola uzavretá a zaizolovaná parafilmom. Reakčná zmes bola ponechaná miešaniu v horizontálnej polohe po dobu 48 hodín.

Po 48 hodinách bola reakcia ukončená a vodná fáza bola extrahovaná CCl<sub>4</sub> (2  $\times$  5 ml) a následne aj EtOAc (2  $\times$  5 ml). Po odparení na RVO bola prevedená analytická HPLC analýza na programe P24. Vzhľadom na prítomnosť množstva produktov bola vybratá metóda preparatívneho HPLC na delenie produktov s použitím programu P24.

Zo získaného produktu bola odobraná vzorka na NMR spektrometriu pre jadrá <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C a <sup>31</sup>P. Vzhľadom na prítomnosť viacerých produktov bola použitá charakterizácia hlavne z <sup>13</sup>C NMR spektier. Spektrum <sup>1</sup>H NMR je uvedené v prílohe 9, spektrum <sup>13</sup>C NMR je uvedené v prílohe 10 a spektrum <sup>31</sup>P NMR je uvedené v prílohe 11. Výťažok reakcie bol 49 mg, 44 % a bol priamo použitý v nasledujúcom kroku syntézy.

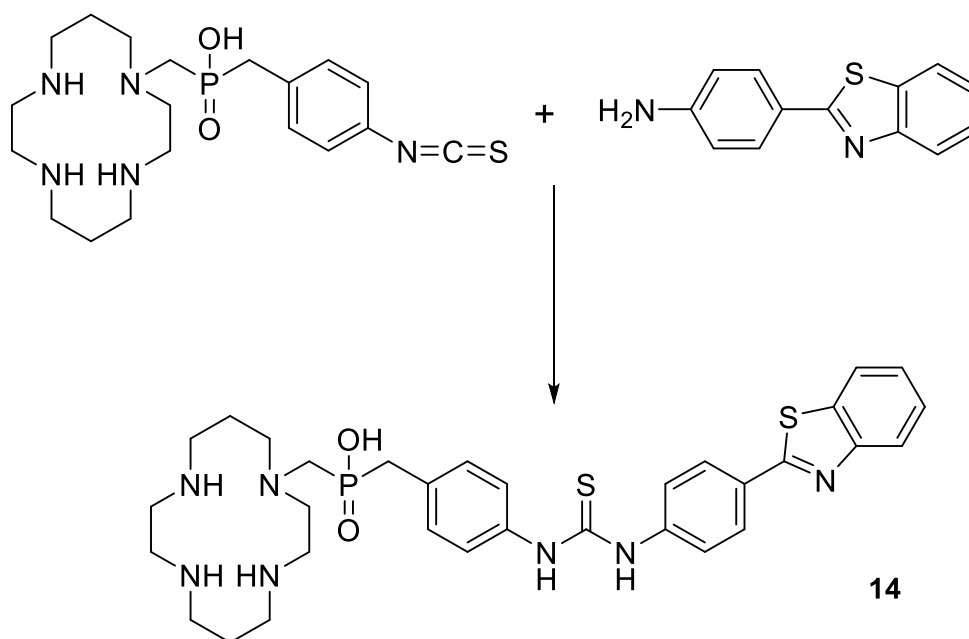
#### 3.3.17.1 Charakterizácia ((1,4,8,11-tetraazacyklotetradekan-1-yl)metyl)(4-isothiokyanatobenzyl)fosfínovej kyseliny

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$ : 7,18 (q,  $J$  = 7,18 Hz, 4H), 3,37 – 2,58 (m, 20 H), 2,22 – 2,00 (m, 3H), 1,97 – 1,75 (m, 3H).

<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$ : 134,23, 130,74, 129,27, 126,13, 56,39, 52,56, 49,55, 46,11, 42,32, 41,82, 40,52, 40,01, 38,43, 20,35, 19,57.

<sup>31</sup>P NMR (121 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$ : 38,68, 38,22, 24,81 (<sup>31</sup>P NMR žiadaného produktu je 38,68).

### 3.3.18 Príprava ligandu L2 (14), prevzaté z ref<sup>42</sup>



((1,4,8,11-tetraazacyclotetradecan-1-yl)metyl)(4-isothiokyanatobenzyl) fosfínová kyselina (0,270 mmol; 115 mg; 1,0 ekv.) bola navážená do vialky spolu s 4-(benzo[d]thiazol-2-yl)anilínom (0,270 mmol; 61,0 mg; 1,0 ekv.) a rozpustená v 16,0 ml H<sub>2</sub>O. Potom bolo upravené pH na 4 za použitia 1,0 M roztoku HCl, detekované univerzálnym pH papierikom. Reakčná zmes bola zohriata na teplotu 40 °C a ponechaná miešaniu po dobu 48 hodín. Po 48 hodinách bola reakcia ukončená a analyzovaná pomocou analytického HPLC (P24), kde boli prítomné tri píky – dva pre reaktanty a jeden pre produkt. Na čistenie produktu bolo zvolené preparatívne HPLC (P24).

Zo získaného produktu bola odobraná vzorka na NMR spektrometriu pre jadrá <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C a <sup>31</sup>P. Spektrum <sup>1</sup>H NMR je uvedené v prílohe 12, spektrum <sup>13</sup>C NMR je uvedené v prílohe 13 a spektrum <sup>31</sup>P NMR je uvedené v prílohe 14. Výťažok reakcie bol 28,2 mg, 16 %.

#### 3.3.17.1 Charakterizácia ligandu L2

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, D<sub>2</sub>O) δ: <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O) δ: 7,92 – 6,77 (m, 12H), 3,86 – 1,44 (m, 27H).

<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, D<sub>2</sub>O) δ: 179,06, 162, 93, 156,32, 139,44, 133,58, 130,11, 127,72, 126,08, 125,58, 123,87, 121,86, 115,05, 57,16, 54,64, 50,20, 44,65, 44,02, 43,63, 43,32, 40,83, 22,13, 21,44.

<sup>31</sup>P NMR (121 MHz, D<sub>2</sub>O) δ: 36,11.

## 4 Výsledky a diskusia

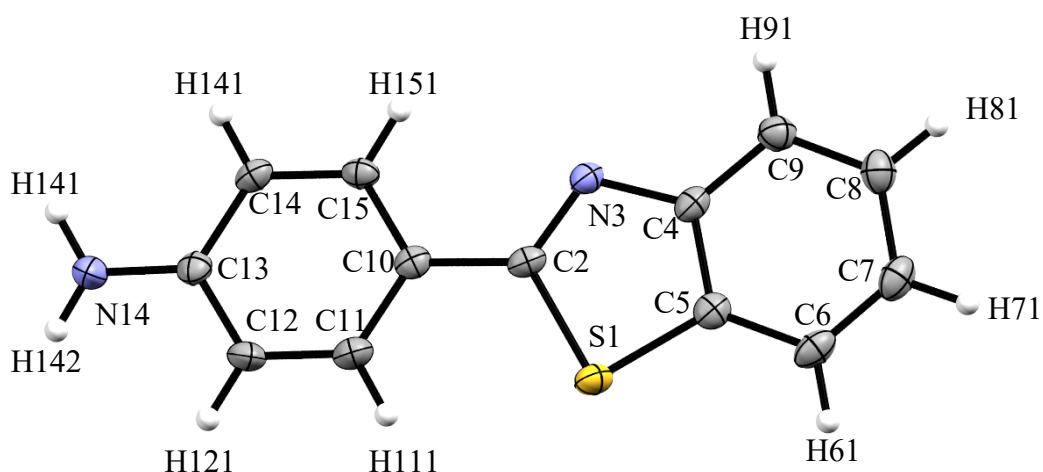
### 4.1 Príprava fluorescenčnej značky

Príprava derivátu thioflavínu T bola navrhnutá podľa ref<sup>30</sup> avšak reprodukcia publikovaného postupu nebola úspešná. Reakčné podmienky boli nastavené na reakciu v tavenine – 180°C. Po neúspešnej optimalizácii bola zvolená príprava cez medziprodukt, a to 2-(4-nitrofenyl)benzo[*d*]thiazol. Jeho príprava prebehla bez komplikácií a výsledok bola žltá pevná látka s výťažkom 72%. Tento postup bol následne niekoľko krát opakovaný pre získanie dostatočného množstva medziproduktu pre syntézu derivátu thioflavínu T.

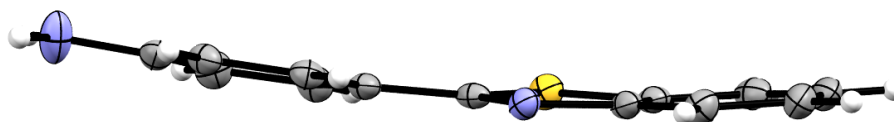
Následná redukcia nitrofenylu na aminofenyl ponúkala niekoľko možností. Ako prvá bola vyskúšaná redukcia pomocou SnCl<sub>2</sub>, kedy redukovaná látka nebola získaná použitím reakčných podmienok získaných z literatúry.<sup>32</sup> Produkt bol získaný až pri použití 10 ekv, SnCl<sub>2</sub> a predĺžení reakčnej doby na 4 dni a to len v malom množstve (približne 10%). Jednou z možností, prečo reprodukcia nebola úspešná je, že použitý SnCl<sub>2</sub> bol už čiastočne zoxidovaný na SnCl<sub>4</sub>. Preto boli vyskúšané ďalšie známe redukčné činidlá. Ako druhé boli použité Fe piliny, ktoré pravdepodobne spôsobili redukciu celej molekuly poprípade jej rozpad čo bolo podložené <sup>1</sup>H NMR spektrami a MS. Ako šetrnejšia technika redukcie bolo použité Pd/C a redukcia v autokláve pri tlaku H<sub>2</sub> 7 bar. Redukcia prebiehala bez problémov a podmienky boli optimalizované pre kvantitatívny výťažok. Takto získaný produkt bol rekryštalizovaný rozpusteným v MeOH a získané kryštáliky boli analyzované na XRD monokryštáli, *obrázok 18*.

**Určenie štruktúry kryštálu:** Monokryštály derivátu ThT boli získané rekryštalizáciou z MeOH za varu a ponechaním kryštalizácie pri RT. Vybratý kryštál bol zachytený na sklenenom vlákne v náhodnej orientácii a difrakčné dáta boli získané na Nonius KappaCCD difraktometru vybavenom s Bruker APEX-II CCD detektorom pri teplote 120 K (Cryostream Cooler, Oxford Cryosystem) použitím monochromatizovaného Mo-*K*<sub>α</sub> žiarenia ( $\lambda = 0.71073 \text{ \AA}$ ). Dáta boli analyzované pomocou SAINT V8.40A (Bruker AXS Inc., 2019) softvérovým balíkom. Dáta boli korigované na absorpciu metódou multi-scan (SADABS). Štruktúra bola vyriešená priamymi metódami (SHELXT2014)<sup>43</sup> a vypresnené pomocou programu SHELXL2014.<sup>44</sup> Všetky nevodíkové atómy boli vypresnené anizotropicky. Všetky vodíkové atómy boli lokalizované v rozdielovej mape elektrónovej hustoty; avšak tie, ktoré sú viazané k uhlíkom boli umiestnené v teoretických

pozíciách s teplotným parametrom  $U_{eq}(H) = 1.2 U_{eq}(C)$ , aby bol udržaný nízky počet vypresňovacích parametrov. Vodíkové atómy viazané na atóm dusíku boli plne vypresnené. Bola nájdená torzia na väzbe C2 – C10. Fenylová skupina C10 – C15 je vychýlená oproti benzothiazolovej skupine o  $10,9^\circ$ , *obrázok 19*. Svojou planaritou sa tiež potvrdilo splnenie Lipinského pravidiel pre prechod BBB. V štruktúre je nájdená jedna slabá vodíková väzba a to medzi H141 a N3 v thiazole s dĺžkou 2,99 Å a teda susedné molekuly na seba nie sú paralelné.



*Obrázok 18: Získaná XRD štruktúra pre derivát thioflavínu T, kde sivé elipsoidy znázorňujú atómy uhlíku, fialové elipsoidy atómy dusíku, žltý elipsoid je atóm síry a vodíky sú zobrazené ako biela guľička.*



*Obrázok 19: Pohľad na torziu na väzbe C2 – C10 a následné vychýlenie fenylového kruhu od benzothiazolového s vychýlením o  $10,9^\circ$ .*

Tabuľka 2: Experimentálne parametre ku kryštalografickej štruktúre.

Zlúčenina Chemický vzorec $M_r$	Derivát thioflavínu T $C_{13}H_{10}N_2S$ 226,3
Farba	bezfarebný
Tvar	hranol
Rozmery (mm)	0,648 × 0,125 × 0,110
Sústava	Ortorombická
Bodová grupa	$P2_12_12_1$
$a$ (Å)	5,8257(4)
$b$ (Å)	12,5682(10)
$c$ (Å)	14,8072(10)
$V$ (Å <sup>3</sup> )	1084,16(14)
$Z$	4
$D_c$ (g cm <sup>-3</sup> )	1,386
$\mu$ (mm <sup>-1</sup> )	0,268
$F(000)$	472
Difrakcie nezávislé; pozorované ( $I_o > 2\sigma(I)$ )	2494; 2218
Počet vypresňovaných parametrov	153
$R$ ; $R'$ (všetky dáta)	0,0405; 0,0328
$wR$ ; $wR'$ (všetky dáta)	0,0715; 0,0683

## 4.2 Pokusy o cyklizáciu modelovej látky pre prípravu ligandu L1

Pokusy pre cyklizáciu boli vyskúšané podľa *schémy 3*, str. 37. Príprava reaktantov prebehla bez väčších komplikácií podľa postupov získaných z použitých literatúr.<sup>36–40</sup> Pre prípravu esteru sa ponúkala možnosť použitia etyl-2-bromoacetátu alebo *tert*-butyl-2-bromoacetátu. Boli použité obe možnosti avšak adícia dvoch ekvivalentov na anilín bola zdarná iba v prípade použitia *tert*-butyl-2-bromoacetátu a to s hmotnostným výťažkom 83%. V prípade použitia etyl-2-bromoacetátu boli vyskúšané možnosti optimalizácie v podobe použitia viac ekvivalentov – 3,5,7,10 ekv. a sledovania analytickým HPLC (P34) vždy po dobu 24 hod. Výsledkom bola prednostná tvorba monosubstituovaného anilínu v maximálnom pomere ustálenom po dobe 48 hod. – 20:80 (disubstituovaný:monosubstituovaný anilín). Ďalšou možnosťou bolo pridanie DIPEA do takto odreagovanej reakčnej zmeny, avšak to neprinieslo žiadne zmeny v pomere produktov. Preto sa ponúkli dve možnosti a to zmeniť esterovú skupinu na reaktívnejšiu, *tert*-butyl-2-



bromoacetát, alebo deprotonizovať dusík na anilínu pomocou NaH. Ako prvá možnosť bola vyskúšaná reaktívnejšia skupina, ktorá vyniesla 83% hmotnostný výtťažok ako bolo už vyššie spomenuté.

Vybraný ester bol zvolený aj z dôvodu rýchlejšie odstupujúcej skupiny pre prípravu dikarboxylovej kyseliny a následne aj chloridu. Toto bolo potvrdené aj výtťažkami získanej dikarboxylovej kyseliny (35 – 40%) a chloridu kyseliny (77%). Pre prípravu 2,2'-(fenylazandiyl)diacetovej kyseliny sa ukázala lepšia varianta prípravy bazickou hydrolyzou než kyslou. Pri kyslej hydrolyze použitím rozpúšťadla H<sub>2</sub>O a HCl (pomer 1:1) vznikalo viac produktov, ktoré museli byť odstránené stĺpcovou chromatografiou a teda boli získané nižšie výtťažky v podobe 35%. Pri bazickej hydrolyze bolo použitým rozpúšťadlom H<sub>2</sub>O a MeOH (pomer 3:7). Čistenie vzniknutého produktu extrakciou bolo výhodnejšie vzhľadom na vyššie výtťažky (40%), avšak aj tu mohlo dôjsť k strate produktu v použitom chloroforme na extrakciu, ktorý nebol presušený. Jednou z možných produktov je ako anhydrid, tak aj hydrolyza iba jedného pendantného ramena.

Optimalizácia podmienok pre prípravu modelovej látky **10** zahrňovala zohľadnenie reaktivity jednotlivých funkčných skupín v poradí ester < kyselina < chlorid. Tiež bola menená reakčná doba v jednotlivých prípadoch sa jednalo o miešanie cez noc až po dobu 14 dní. Použité rozpúšťadlá boli všetky predtým presušené, aby sa zamedzilo prítomnosti nečistôt, ktoré by mohli ovplyvniť reaktivitu. Použité rozpúšťadlá boli vybraté s ohľadom na možnosť zmeny teploty, za ktorej reakcia prebiehala. Výsledkom optimalizácie bolo potvrdenie prítomnosti žiadaného produktu v MS spektre v stopovom množstve bez možnosti charakterizácie NMR spektroskopiou vzhľadom na komplikované spektrum s celou škálou produktov. Jednalo sa o reakcie, kedy bol použitý postup vzniku peptidovej väzby za prítomnosti 2 ekv. aktivačného činidla EDC a DCC. Druhou potvrdenou reakčnou zmesou bolo použitie di-*terc*-butyl-2,2'-(fenylazandiyl)diacetátu v čerstvo vysušenom EtOH.

V druhom postupe reakcie esteru anilínu a spolu 2,6-bis(aminometyl)pyridínu v prostredí EtOH sa potvrdila možnosť zvýšenia reaktivity za použitia čerstvo presušeného rozpúšťadla, ktoré však v priebehu neskorších pokusov mohlo nabráť prirodzené množstvo vody. Tiež pridávanie jedného z reaktantov pomocou lineárnej pumpy vo veľkom zriedení ponúklo lepšie výsledky ako v prípade menšieho zriedenia a bez kontinuálneho pridávania jedného z reaktantov lineárnou pumpou. Takto preskúšané podmienky potvrdili možnosť vzniku produktu tiež za použitia inertnej atmosféry. Problém však aj naďalej ostáva

postup čistenia reakčnej zmesi od produktu, ktorý je v stopovom zastúpení. A to aj v prípade použitia väčšieho množstva reaktantov kedy by mohli byť získané výťažky na charakteristiku.

Posledný postup využíval znalosti prípravy peptidovej väzby za použitia 2,2'-(fenylazandiyl)diocetovej kyseliny, 2,6-bis-(aminometyl)pyridínu a dehydratačného činidla. Najčastejšie využívané sú DCC (*N,N'*-dicyklohexylkarbodiimid) a EDC (1-etyl-3-(3-dimetylamínopropyl)karbodiimid). Výhodou použitia EDC je jednoduchšie odstraňovanie z reakčnej zmesi jednoduchou extrakciou do vodného prostredia z EtOAc, avšak je veľký predpoklad, že žiadaný produkt je rozpustný vo vode a preto sa EDC v tomto prípade nedá takto zbaviť. Nevýhodou DCC je, že je nerozpustný a ustanovenie rovnováhy rozpustnosti môže trvať aj dlhú dobu (v závislosti na použítom množstve od niekoľko dní po týždeň).

Komplikácie pri získaní žiadaného produktu popri rôznych optimalizačných podmienkach mohli byť taktiež spôsobené stérickými obťažnosťami pri spojení oboch pendantných ramien na dvoch aromatických kruhoch. Stérické usporiadanie oboch funkčných skupín na pyridínu ako aj na anilínu sa nepodarilo uľahčiť ani za použitia činidla ako je LiBr či Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Ďalšou možnosťou optimalizácie by mohlo byť použitie 2,2'-(fenylazandiyl)diacetyl chloridu ako najreaktívnejšieho derivátu dikarboxylovej kyseliny a použiť silnejšiu bázu o rôznych ekvivalentoch, ktorá by bola adekvátne rozpustná v použítom rozpúšťadle.

### 4.3 Príprava ligandu L2

Príprava ligandu L2 prebehla bez väčších komplikácií. V prvom kroku sa jednalo o Mannichovu reakciu – aminoalkylácia kyslého protónu, v tomto prípade od (4-nitrobenzyl)fosfínovej kyseliny. Tento protón je umiestnený vedľa karbonylovej funkčnej skupiny pomocou formaldehydu a sekundárneho amínu od cyklámu. V prípade prípravy látky **11** nedošlo ku komplikáciám na čo poukazuje aj hmotnostný výťažok 92%. Delenie produktu od nezreagovaných reaktantov, ktoré boli použité v prebytku, ponúkalo dve možnosti ionexu – anex a katex. Najskôr bol použitý katex, avšak pri delení sa nepodarilo odstrániť (4-nitrobenzyl)fosfínovú kyselinu od produktu, vzhľadom na to, že sa kyselina vymývala počas celého premývania kolóny, aj keď bolo na jej premytie použitý 6× objem daného katexu. Preto bol ako alternatíva vybratý anex, kedy kyselina sa vymývala ako posledná pri regenerácii anexu pomocou 6 M HCl. Aj v tomto prípade však spolu

s produktom bolo vymyté aj malé množstvo (4-nitrobenzyl)fosfínovej kyseliny a nečistoty (v celkovom množstve do 10%), ktoré sa preukázali na  $^{31}\text{P}$  NMR spektre. Použitou možnosťou bolo redukovať produkt bez ďalšieho čistenia.

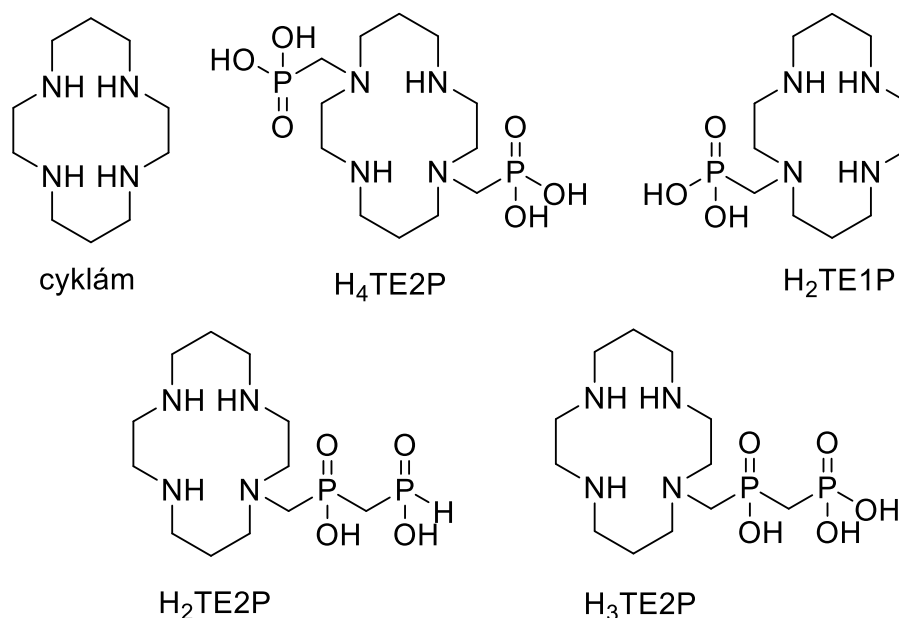
Redukcia pre prípravu látky **12** bola zvolená ako v prípade prípravy derivátu thioflavínu T a to v autoklávu za tlaku vodíku 7 bar a vo vodnom prostredí. Redukcia prebehla v dobe 48 hod. kedy po 24 hod. klesol tlak vodíku v autoklávu na 3,5 bar a v priebehu ďalších 24 hod. na tlak 3,0 bar. Namerané  $^{31}\text{P}$  NMR spektrum poukazovalo na prítomnosť viacerých produktov a preto bola hľadaná mobilná fáza na prečistenie žiadaného produktu od nečistôt. Ideálnou mobilnou fázou bol EtOH:NH<sub>3</sub> (3:1) kedy nečistoty boli v čele TLC platničky a produkt pri  $R_f=0,1$ . Výsledok bola čistá látka, čo sa potvrdilo jedným píkom na  $^{31}\text{P}$  NMR spektre s 50% hmotnostným výťažkom. Táto látka bola použitá ako modelová pre potenciometrické titrácie a pre informácie o koordinácii s Cu(II) pre finálny produkt – ligand **L2**.

Nasledovala príprava látky **13**, podľa ref.<sup>41</sup> Reakcia bola prevedená dvakrát – prvýkrát bol výťažok 44% a bolo potrebné delenie extrakciou ako je uvedené v literatúre a preparatívneho HPLC (P24). V druhom prípade bol poskytnutý výťažok 82% za delenia iba extrakciou. Rozdiel vo výťažku ako aj v delení mohol byť spôsobený tým, kedy bolo upravené pH – v prvom prípade bolo upravené až po dobe 24 hod. a v druhom predtým, ako bol pridaný thiofosgén. Taktiež extrakcia v prvom prípade bola z celej reakčnej zmesi a v druhom bola k extrakcií odobraná iba vodná fáza.

Posledný krok syntézy a to príprava ligandu **L2** bola zreprodukovaná z ref.<sup>42</sup> Reakcia bola opakovaná dvakrát. V prvom prípade bolo pH upravené podľa postupu v literatúre na 9 pomocou 1,5 M KOH. Reakcia bola spracovaná pomocou stĺpcovej chromatografie avšak vzniknutý produkt neobsahoval v  $^1\text{H}$  a  $^{13}\text{C}$  NMR spektre charakteristické píky pre cyklám čo by mohlo naznačovať tomu, že reakcia neprebehla. Avšak sa podarilo namerať jeden pík v  $^{31}\text{P}$  NMR čím ostáva otázka aký produkt vznikol touto reakciou. Jednou z možností je odštiepenie cyklámu za daných reakčných podmienok alebo naviazanie 4-isothiokyanato-benzyl)fosfínovej kyseliny na NH skupinu iného cyklámu a teda polymerácie vstupného reaktantu. Preto bola reakcia zopakovaná a pH bolo upravené na pH deprotonizácie ThT amínu 1,0 M HCl v rozmedzí 3-4. Nasledovné delenie preparatívnym HPLC (P24) poukazovalo na prítomnosť reaktantov, ktorých prítomnosť bola v prvej a poslednej frakcii. V tomto prípade by predĺženie reakčnej doby mohlo znamenať vyššie výťažky keďže v druhej frakcii bol získaný čistý produkt s hmotnostným výťažkom 16%.

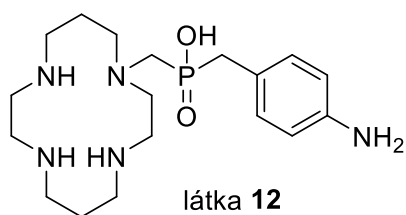
#### 4.4 Výsledky titrácií modelovej látky 12 pre L2

Potenciometrické titrácie boli vykonávané s 0,0126 M zásobným roztokom modelovej látky **12** pripravenom rozpustením v deionizovanej vode. U tejto látky sa predpokladajú obdobné vlastnosti a hodnoty  $\log K$  ako v prípade ligandu **L2**. Presné látkové množstvo bolo zistené pri stanovení disociačných konštánt programom OPIUM. Taktiež boli študované interakcie s Cu(II). Z potenciometrických meraní boli zistené protonizačné konštanty  $pK_P$  a tým aj disociačné konštanty  $pK_A$ , uvedené v *tabuľke 3*. Získané dáta boli porovnané s vybranými ligandami – cyklám,  $H_4TE2P$ ,  $H_2TE1P$ ,  $H_2TE2P$  a  $H_3TE2P$  a ich komplexami, *obrázok 20*. Disociačné konštanty vybraných ligandov na porovnanie sú uvedené v *tabuľke 4*. Distribučný diagram pre protonizované formy látky **12** je znázornený na *obrázku 21*.



Obrázok 20: Vybrané ligandy pre porovnanie disociačných konštánt s látkou **12**.

Tabuľka 3: Celkové protonizačné konštanty pre látku **12** (vľavo) a priradenie miesta protonizácie.



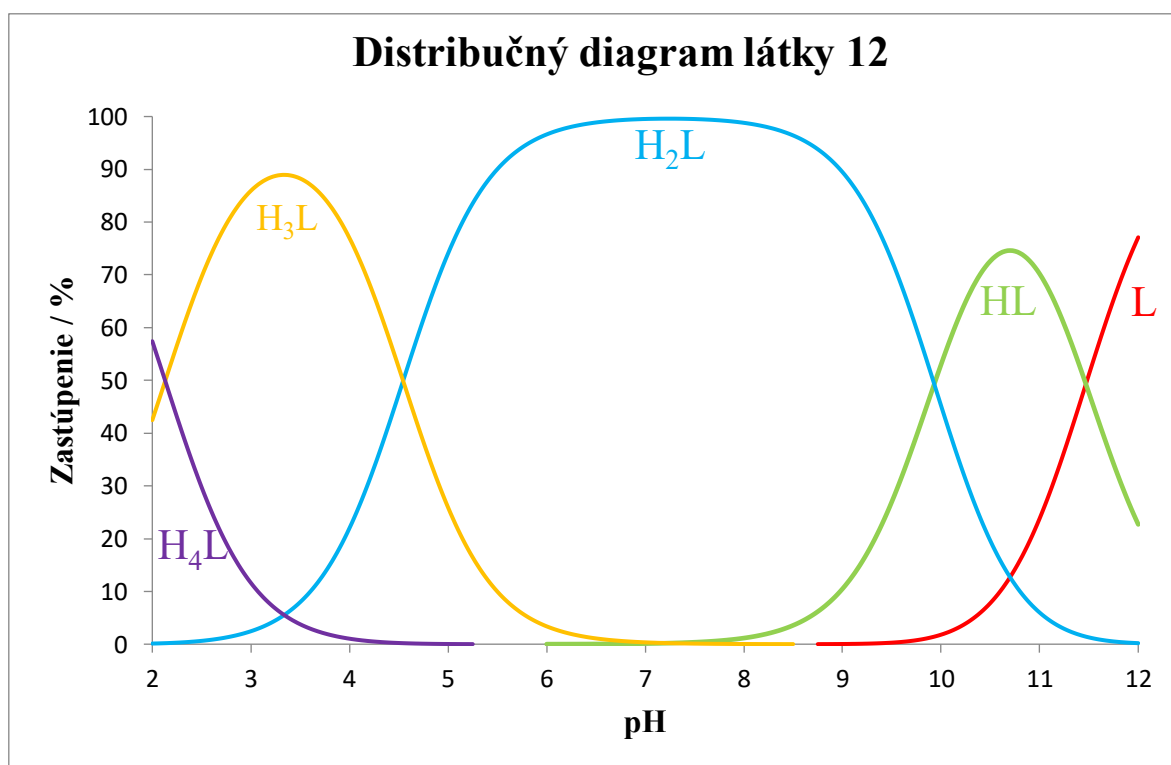
Potenciometria látky <b>12</b>	
$\log K$	Miesto protonizácie
2,13 (1)	fosfínát
4,54 (1)	pendantný amín
9,93 (1)	makrocyklus
11,46 (1)	makrocyklus

Tabuľka 4: –Postupné protonizačné konštanty látky 12 a ich porovnanie s podobnými ligandami.

	látka 12	cyklám	H <sub>4</sub> TE2P	H <sub>2</sub> TE1P	H <sub>2</sub> TE2P	H <sub>3</sub> TE2P
log K <sub>1</sub>	11,46 (1)	11,29	26,41 <sup>a</sup>	12,49	12,18	12,88
log K <sub>2</sub>	9,93 (1)	10,19		11,76	10,75	11,68
log K <sub>3</sub>	4,54 (1)	1,91	6,78	6,05	2,94	7,12
log K <sub>4</sub>	2,13 (1)	1,61	5,36	2,42	1,61	3,17
log K <sub>5</sub>	-	-	1,15	2,16 <sup>a</sup>	-	1,84
log K <sub>6</sub>	-	-	-		-	-
ΣlogK <sub>A</sub> <sup>b</sup>	21,39	21,48	26,41	24,25	22,93	24,56
logβ <sub>CuL</sub>	26,0	28,1	25,40	27,34	25,83	27,66
Ref.	táto práca	45	45	45	46	46

<sup>a</sup>Hodnota zodpovedá protonizácií v dvoch krokoch.

<sup>b</sup>ΣlogK<sub>A</sub> = logK<sub>1</sub> + logK<sub>2</sub>.

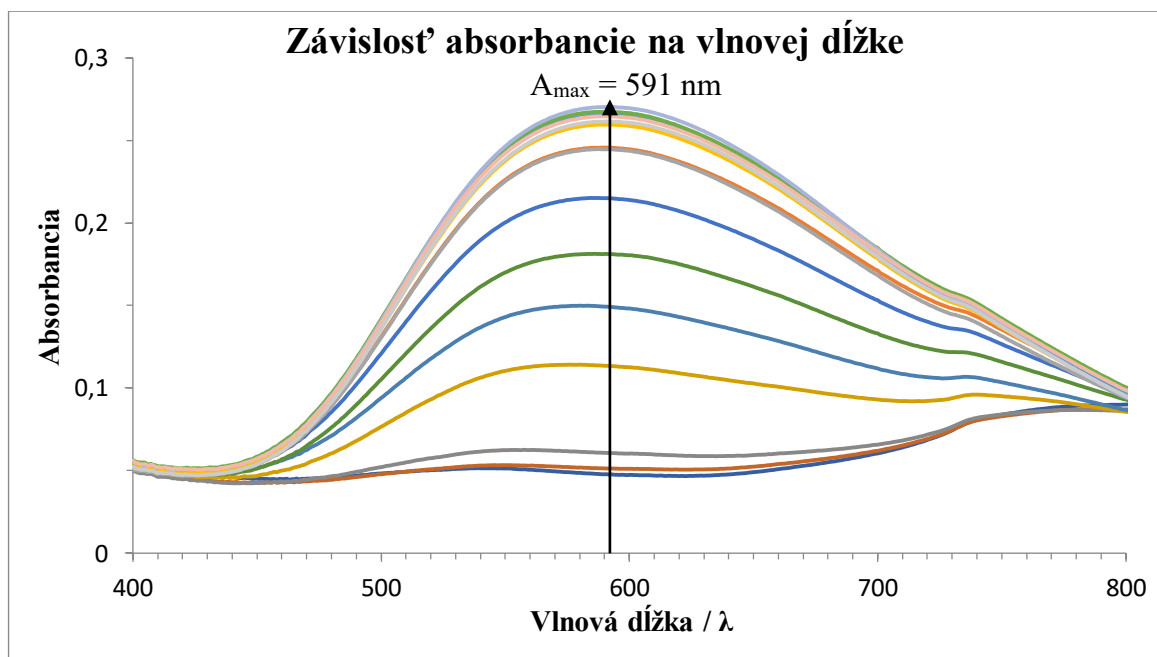


Obrázok 21: Distribučný diagram rôzne protonizovaných foriem látky 12 v závislosti na pH.

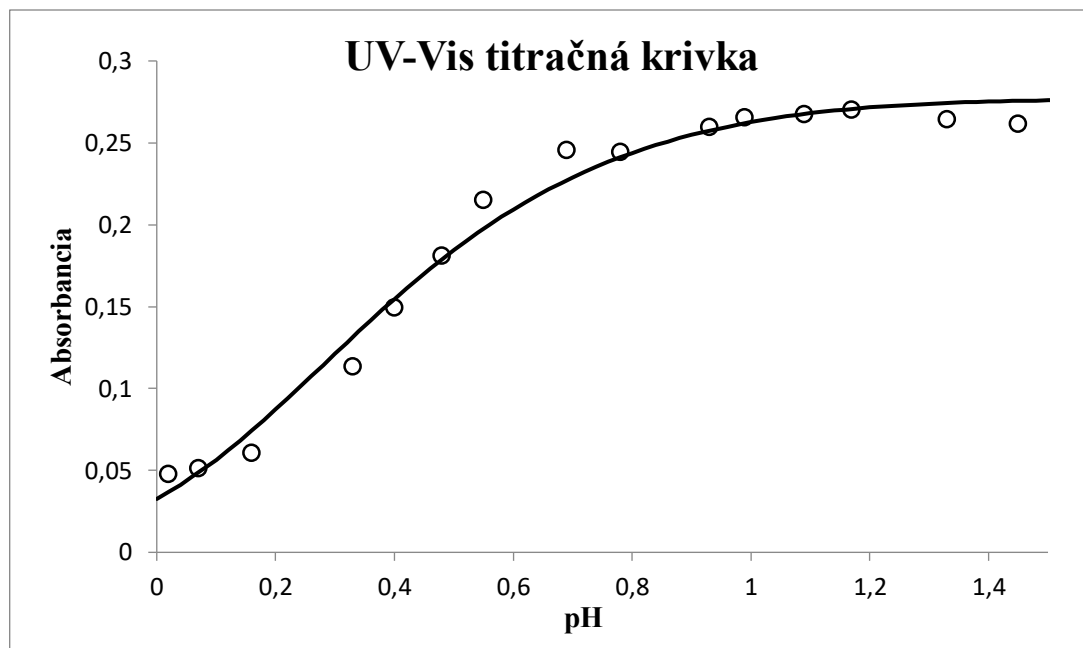
Prvé dve protonizácie sa objavujú na atómov dusíku makrocyklu. Tieto dva protóny by mali byť viazané k protiľahlým atómom dusíku. Celková bazicita atómov dusíku v makrocyklu (logK<sub>1</sub> + log K<sub>2</sub>) látky 12 je obdobná ako u samotného cyklámu a nižšia ako u porovnávaných látok čo môže byť spôsobené indukčným efektom fosfinovej kyseliny

u porovnávaných látok zatiaľ čo u látky **12** je indukčný efekt potlačený prítomnosťou fenylevej skupiny. Najvyššie pozorované hodnoty sú u látky  $H_4TE_2P$  a  $H_3TE_2P$  čo zapadá do obecného trendu, že väčší počet fosfonátových pendantných ramien vedie k ligandom s vyššou bazicitou. Tretia protonizácia patrí pendantnému amínu, ktorá je nízka v dôsledku prítomnosti fenylevej skupiny. Štvrtá protonizácia patrí fosfinátovej skupine v silne kyslej oblasti pH (pH~2–4), ktorá je výrazne ovplyvnená množstvom fosfinátových skupín a prítomnosťou aromatického kruhu u látky **12** v porovnaní s vybranými ligandami.

Od látky **12** boli potenciometricky vyhodnotené i „out-of-cell“ titrácie, v rozmedzí pH 1,5 – 4,0, s Cu(II) vzhľadom k pomalej kinetike komplexácie pre získanie  $\log K [LM]$ . Pre získanie hodnoty  $\log K [HLM]$  bola zvolená UV-Vis titrácia. Titrácie boli vykonávané v pomere ligand:kov=1:1 (mol). UV-Vis titrácia bola prevedená v oblasti vlnovej dĺžky 400 – 1100 nm a pH rozmedzí 0,0 – 1,5. Bolo zistené absorpčné maximum,  $A_{max} = 591$  nm, *obrázok 22*. Toto maximum bolo využité k získaniu titračnej krivky, *obrázok 23*. Obe metódy boli vypresnené súčasne v programe OPIUM, pre poskytnutie distribučného diagramu zastúpení jednotlivých foriem komplexov v závislosti na pH, *obrázok 24*. Získané hodnoty konštánt stability sú uvedené v *tabuľke 5*.



*Obrázok 22: Závislosť absorbcie na vlnovej dĺžke pre zistenie  $A_{max} = 591$  nm k získaniu titračnej krivky pre komplex látky **12** s Cu(II) v pomere [HLM].*



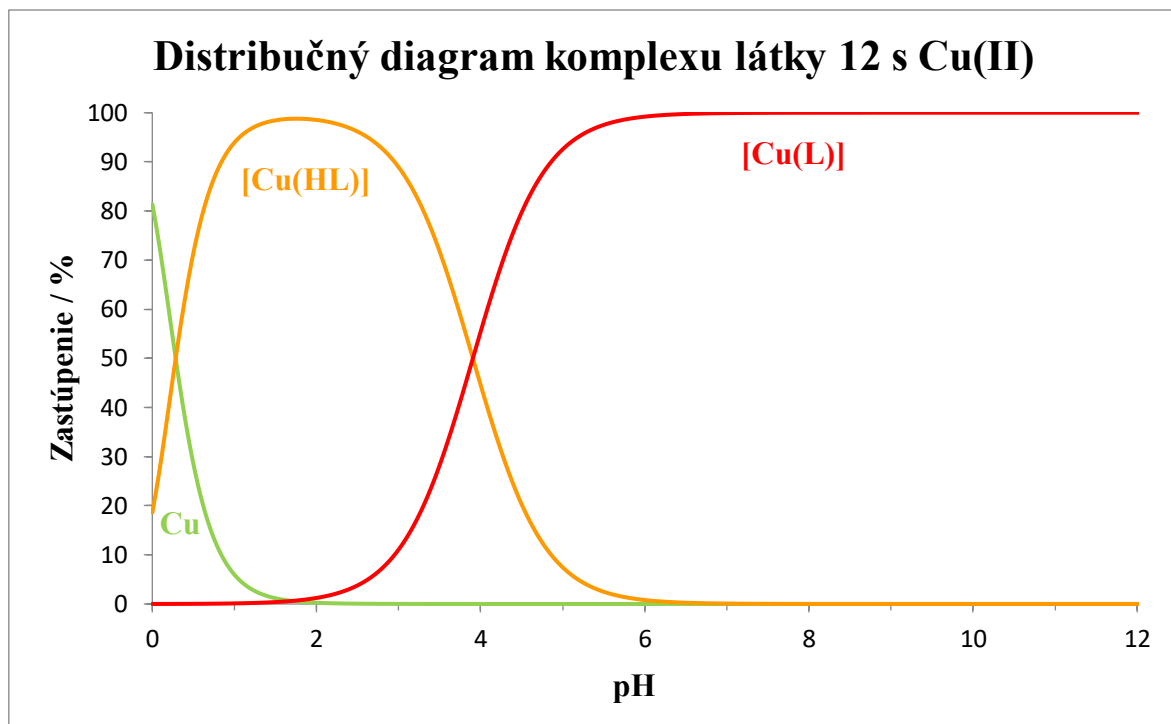
Obrázok 23: Vypočítaná titračná krivka UV-Vis pre komplex látky **12** s Cu(II) v pomere [HLM] v oblasti pH 0,0 – 1,5.

Tabuľka 5: Protonizačné konštanty a celkové konštanty stability v systéme Cu–látka **12**.

Rovnováha	CuL	
	log $\beta^a$	logK
$M + L \rightleftharpoons [ML]$	$26,0 \pm 0,14$	26,0
$[ML] + H \rightleftharpoons [HLM]$	$29,92 \pm 0,09$	3,92

$^a\beta_n = [H_nLM]/([H]^n [L][M])$

Distribučný diagram komplexu látky **12** s Cu(II) je na obrázku 24. V prípade komplexoch prechodných kovov môžu byť pendantné ramená nekoordinované čím sa zvyšujú hodnoty disociačných konštánt oproti komplexom s iónmi lantanoidov kde sa koordinujú všetky pendantné ramená. Rozdiely tiež môžu vzniknúť v prípade porovnania s disociačnými konštantami voľného ligandu, u ktorého sú pendantné ramená s veľkou pravdepodobnosťou viazané v sieti silných vodíkových väzieb.



Obrázok 24: Distribučný diagram komplexov látky 12 s iónmi Cu(II) v závislosti na pH, ( $c_L = c_M = 0,004 \text{ M}$ ;  $I = 0,1 \text{ M (NMe}_4\text{)Cl}$ ,  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ).

Získané hodnoty konštánt stability ukazujú, že komplex  $[\text{Cu(L)}]$  je pre látku 12 stabilnejší ako u cyklámu s dvoma pendentnými ramenami, ako je  $\text{H}_4\text{TE2P}$ . Na druhú stranu je komplex menej stabilný oproti cyklámu bez pendentných ramien. Hodnoty  $\log\beta_{\text{CuL}}$  sú uvedené v tabuľke 4, str. 60.



## 5 Záver

V rámci tejto diplomovej práce bola na základe literárnych údajov syntetizovaná fluorescenčná značka derivátu thioflavínu T. Na sledovanie zmien tvorby amyloidov *in vitro*, ktorej štruktúra bola určená röntgenograficky. Taktiež boli navrhnuté dva ligandy vhodné pre koordináciu rádionuklidu  $^{64}\text{Cu}(\text{II})$ .

Následne bola navrhnutá príprava ligandov zo skupiny tetraazacyklov. Prvý návrh obsahuje uvedenú fluorescenčnú značku ako súčasť makrocyklu. Pre tento ligand boli navrhnuté rôzne optimalizačné cesty zacyklenia a testované za použitia anilínu miesto fluorescenčnej značky a esterov, karboxylových kyselín či chloridov karboxylových skupín naviazaných na pyridínovom kruhu. Látka bola získaná len v stopovom množstve a teda nebolo možné previesť ďalšiu charakterizáciu a testovanie.

Druhým ligandom (**L2**) je látka, ktorá obsahuje fluorescenčnú značku naviazanú cez thiomocovinu ako tzv. linker s derivátom cyklámu, ktorý obsahuje naviazanú metyl(aminobenzylfosfinovú) kyselinu. Látka bola pripravená bez väčších komplikácií s výťažkom – 16 %.

Súčasťou práce bolo zistiť disociačné konštanty a konštanty stability komplexu s  $\text{Cu}(\text{II})$  pre modelovú látku **12**, ktorá bola ďalej modifikovaná na ligand **L2**.

## 6 Použitá literatura

1. M. G. Iadanza, M. P. Jackson, E. W. Hewitt, et al. "A new era for understanding amyloid structures and disease." *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* vol. 19. pp. 755-773. 2018. doi:10.1038/s41580-018-0060-8
2. T. N. Shamsi, T. Athar, R. Parveen, et al. "A review on protein misfolding, aggregation and strategies to prevent related ailments." *Int. J. Biol. Macromol.* vol. 105. pp. 993-1000. 2017. doi:10.1016/j.ijbiomac.2017.07.116
3. S. B. Prusiner. "Novel structure and genetics of prions causing neurodegeneration in humans and animals." *Biologicals.* vol. 18, pp. 247-262. 2013. doi:10.1016/1045-1056(90)90027-W
4. J. R. Sundaram, I. C. J. Lee, and S. Shenolikar. "Translating protein phosphatase research into treatments for neurodegenerative diseases." *Biochem. Soc. Trans.* vol. 45. pp. 101-112. 2017. doi:10.1042/BST20160157
5. P. Parchi, S. G. Chen, P. Brown, et al. "Different patterns of truncated prion protein fragments correlate with distinct phenotypes in P102L Gerstmann – Sträussler – Scheinker disease." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* vol. 95. pp. 8322-8327. 1998. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.14.8322>
6. M. C. Owen, D. Gnutt, M. Gao, et al. "Effects of in vivo conditions on amyloid aggregation." *Chem. Soc. Rev.* vol. 48. pp. 3946-3996. 2019. doi:10.1039/c8cs00034d
7. A. C. Bhasikuttan and J. Mohanty. "Detection, inhibition and disintegration of amyloid fibrils: the role of optical probes and macrocyclic receptors." *Chem. Commun.* vol. 53. pp. 2789-2809. 2017. doi:10.1039/C6CC08727B
8. V. Berti, A. Pupi and L. Mosconi. "PET/CT in diagnosis of dementia." *Ann. N. Y. Acad. Sci.* vol. 1228. pp. 81-92. 2011. doi:10.1111/j.1749-6632.2011.06015.x
9. A. J. McDonald and G. L. Millhauser. "PrP overdrive." *Prion.* vol. 8. pp. 183-191. 2014. doi:10.4161/pri.28796
10. A. K. Thakur, A. K. Srivastava, V. Srinivas, et al. "Copper alters aggregation behavior of prion protein and induces novel interactions between its N- and C-terminal

- regions.“ *J. Biol. Chem.* vol. 286. pp. 38533-38545. 2011. doi:10.1074/jbc.M111.265645
11. C. Rodríguez-Rodríguez, M. Telpoukhovskaia and C. Orvig. “The art of building multifunctional metal-binding agents from basic molecular scaffolds for the potential application in neurodegenerative diseases.“ *Coord. Chem. Rev.* vol. 256. pp. 2308-2332. 2012. doi:10.1016/j.ccr.2012.03.008
  12. L. K. Gavrin, R. A. Denny and E. Saiah. “Small molecules that target protein misfolding.“ *J. Med. Chem.* vol. 55. pp. 10823-10843. 2012. doi:10.1021/jm301182j
  13. Y. Zhang, L. Y. Chen, W. X. Yin, et al. “The chelation targeting metal-A $\beta$ 40 aggregates may lead to formation of A $\beta$ 40 oligomers.“ *Dalt. Trans.* vol. 40. pp. 4830-4833. 2011. doi:10.1039/c1dt00020a
  14. H. Naiki, K. Higuchi, M. Hosokawa, et al. “Fluorometric determination of amyloid fibrils in vitro using the fluorescent dye, thioflavine T.“ *Anal. Biochem.* vol. 177. pp. 244-249. 1989. doi:https://doi.org/10.1016/0003-2697(89)90046-8
  15. C. Wu, M. Biancalana, S. Koide, et al. “Binding Modes of Thioflavin-T to the Single-Layer  $\beta$ -Sheet of the Peptide Self-Assembly Mimics“. *J Mol Biol.* vol. 394. pp. 627-633. 2009. doi:10.1016/j.jmb.2009.09.056
  16. A. I. Sulatskaya, A. A. Maskevich, I. M. Kuznetsova, et al. “Fluorescence Quantum Yield of Thioflavin T in Rigid Isotropic Solution and Incorporated into the Amyloid Fibrils.“ *PLoS One.* vol. 5. pp. e15385. 2010. doi:10.1371/journal.pone.0015385
  17. B. M. Silber, J. R. Gever, Z. Li, et al. “Antiprion compounds that reduce PrP Sc levels in dividing and stationary-phase cells.“ *Bioorg. Med. Chem.* vol. 21. pp. 7999-8012. 2013. doi:10.1016/j.bmc.2013.09.022
  18. Z. Li, B. M. Silber, S. Rao, et al. “2-Aminothiazoles with Improved Pharmacotherapeutic Properties for Treatment of Prion Disease.“ *Chem.Med.Chem.* vol. 8. pp. 847-857. 2013. doi:10.1002/cmdc.201300007
  19. S. Zhou, X. Liu, X. An, et al. “Molecular Dynamics Simulation Study on the Binding and Stabilization Mechanism of Antiprion Compounds to the “hot Spot” Region of PrP<sup>C</sup>.“ *ACS Chem. Neurosci.* vol. 8. pp. 2446-2456. 2017. doi:10.1021/acscchemneuro.7b00214

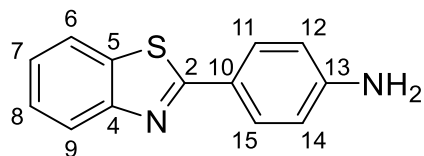
20. H. Barthel, M. L. Schroeter, K. T. Hoffmann, et al. "PET/MR in dementia and other neurodegenerative diseases." *Semin. Nucl. Med.* vol. 45. pp. 224-233. 2015. doi:10.1053/j.semnuclmed.2014.12.003
21. K. Cybulska, L. Perk, J. Booij J, et al. "Huntington's disease: A review of the known PET imaging biomarkers and targeting radiotracers." *Molecules.* vol. 25. pp. 1-21. 2020. doi:10.3390/molecules25030482
22. C. Mathis, B. Bacskai, S. Kajdasz, et al. "A lipophilic thioflavin-T derivative for Positron Emission Tomography (PET) imaging of amyloid in brain." *Bioorg. Med. Chem. Lett.* vol. 12. pp. 295-298. 2002. doi:10.1016/S0960-894X(01)00734-X
23. S. M. Ametamey, M. Honer and P. A. Schubiger. "Molecular imaging with PET." *Chem. Rev.* vol. 108. pp. 1501-1516. 2008. doi:10.1021/cr0782426
24. P. Röthlisberger, C. Gasse, M. Hollenstein. "Nucleic acid aptamers: Emerging applications in medical imaging, nanotechnology, neurosciences, and drug delivery." *Int. J. Mol. Sci.* vol. 18. pp. 1-39. 2017. doi:10.3390/ijms18112430
25. R. K. J. Brown, N.I. Bohnen, K. K. Wong, et al. "Brain PET in suspected dementia: Patterns of altered FDG metabolism." *Radiographics.* vol. 34. pp. 684-701. 2014. doi:10.1148/rg.343135065
26. A. Kadir and A. Nordberg. "Target-specific PET probes for neurodegenerative disorders related to dementia." *J. Nucl. Med.* vol. 51. pp. 1418-1430. 2010. doi:10.2967/jnumed.110.077164
27. C. A. Mathis, Y. Wang, D. P. Holt, et al. "Synthesis and evaluation of <sup>11</sup>C-labeled 6-substituted 2-arylbenzothiazoles as amyloid imaging agents." *J. Med. Chem.* vol. 46. pp. 2740-2754. 2003. doi:10.1021/jm030026b
28. K. D. Deters, S. L. Risacher, K. K. Yoder, et al. "[<sup>11</sup>C] PiB PET in Gerstmann-Sträussler-Scheinker disease." *Am. J. Nucl. Med. Mol. Imaging.* vol. 6. pp. 84-93. 2016. PMID: PMC4749507
29. G. R. Fulmer, A. J. M. Miller, N. H. Sherden, et al. "NMR Chemical Shifts of Trace Impurities: Common Laboratory Solvents, Organics, and Gases in Deuterated Solvents Relevant to the Organometallic Chemist." *Organometallics.* vol. 29. pp. 2176-2179. 2010. doi:10.1021/om100106e

30. S. J. Jung, Y. D. Park, J. H. Park, et al. "Synthesis and evaluation of thioflavin-T analogs as potential imaging agents for amyloid plaques." *Med. Chem. Res.* vol. 22. pp. 4263-4268. 2013. doi:10.1007/s00044-012-0414-2
31. M. F. G. Stevens, D. F. Shi and A. Castro. "Antitumour benzothiazoles. Part 2. Formation of 2,2'-diaminobiphenyls from the decomposition of 2-(4-azidophenyl)benzazoles in trifluoromethanesulfonic acid." *J. Chem. Soc. Perkin. Trans. 1.* vol. 1. pp. 83-93. 1996. doi:10.1039/P19960000083
32. D. F. Shi, T. D. Bradshaw, S. Wrigley, et al. "Antitumor benzothiazoles. 3. Synthesis of 2-(4-aminophenyl)benzothiazoles and evaluation of their activities against breast cancer cell lines in vitro and in vivo." *J. Med. Chem.* vol. 39. pp. 3375-3384. 1996. doi:10.1021/jm9600959
33. S. Chandrappa, K. Vinaya, T. Ramakrishnappa, et al. "An efficient method for aryl nitro reduction and cleavage of azo compounds using iron powder/calcium chloride." *Synlett.* vol. 20. pp. 3019-3022. 2010. doi:10.1055/s-0030-1259067
34. W. P. Hu, Y. K. Chen, C. C. Liao, et al. "Synthesis, and biological evaluation of 2-(4-aminophenyl)benzothiazole derivatives as photosensitizing agents." *Bioorganic Med. Chem.* vol. 18. pp. 6197-6207. 2010. doi:10.1016/j.bmc.2010.04.082
35. A. J. Wessel, J. W. Schultz, F. Tang, et al. "Improved synthesis of symmetrically & asymmetrically: N -substituted pyridinophane derivatives." *Org. Biomol. Chem.* vol. 15. pp. 9923-9931. 2017. doi:10.1039/c7ob02508d
36. S. Ouizem, D. Rosario-Amorin, D. A. Dickie, et al. "Synthesis and f-element ligation properties of NCMPO-decorated pyridine N-oxide platforms." *Dalt. Trans.* vol. 43. pp. 8368-8386. 2014. doi:10.1039/c3dt53611d
37. X. Tian, Y. Zhu, Q. Zhang, et al. "Halides tuning the subcellular-targeting in two-photon emissive complexes: Via different uptake mechanisms." *Chem. Commun.* vol. 53. pp. 7941-7944. 2017. doi:10.1039/c7cc03640j
38. A. Mishra, G. Pariani, T. Oerther, et al. "Hyperpolarized multi-metal <sup>13</sup>C-sensors for magnetic resonance imaging." *Anal. Chem.* vol. 88. pp.10790-10794. 2016. doi:10.1021/acs.analchem.6b03546

39. V. Hagen, B. Dekowski, V. Nache, et al. "Coumarinylmethyl esters for ultrafast release of high concentrations of cyclic nucleotides upon one- and two-photon photolysis." *Angew. Chemie - Int. Ed.* vol. 44. pp. 7887-7891. 2005. doi:10.1002/anie.200502411
40. M. Oláh, D. Kovács, G. Katona, et al. "Optimization of 2-alkoxyacetates as acylating agent for enzymatic kinetic resolution of chiral amines." *Tetrahedron.* vol. 74. pp. 3663-3670. 2018. doi:10.1016/j.tet.2018.05.032
41. J. Rudovský, M. Botta, P. Hermann, et al. "Relaxometric and solution NMR structural studies on ditopic lanthanide(iii) complexes of a phosphinate analogue of DOTA with a fast rate of water exchange." *Dalt. Trans.* pp. 2323-2333. 2006. doi:10.1039/b518147j
42. J. Rudovský, M. Botta, P. Hermann, et al. "PAMAM dendrimeric conjugates with a Gd-DOTA phosphinate derivative and their adducts with polyaminoacids: The interplay of global motion, internal rotation, and fast water exchange." *Biocon. Chem.* vol. 17. pp. 975-987. 2006. doi:10.1021/bc0601491
43. (a) G. M. Sheldrick. "SHELXT. Program for Crystal Structure Solution from Diffraction Data." *University of Göttingen, Göttingen.* 2014. (b) G. M. Sheldrick. "A short history of SHELX." *Acta Crystallogr., Sect. A: Found. Crystallogr.* vol. 64. pp. 112-122. 2008. doi:10.1107/S0108767307043930
44. (a) C. B. Hübschle, G. M. Sheldrick, B. Dittrich. "ShelXle: a Qt graphical user interface for SHELXL." *University of Göttingen: Göttingen,* 2014. (b) C. B. Hübschle, G. M. Sheldrick, B. Dittrich. "ShelXle: a Qt graphical user interface for SHELXL." *J. Appl. Cryst.* vol. 44. pp. 1281-1284. 2011. (c) G. M. Sheldrick. "SHELXL-2014. Program for Crystal Structure Refinement from Diffraction Data." *University of Göttingen, Göttingen.* 2017; (d) G. M. Sheldrick. "Crystal structure refinement with SHELXL." *Acta Crystallogr. Sect. C,* vol. C71. pp. 3-8. 2015. doi:10.1107/S2053229614024218
45. J. Havlíčková, H. Medová, T. Vitha, et al. "Coordination properties of cyclam (1,4,8,11-tetraazacyclotetradecane) endowed with two methylphosphonic acid pendant arms in the 1,4-positions." *Dalt Trans.* pp. 5378-5386. 2008. doi:10.1039/b803235a

46. O. Gutten, J. Kotek and P. Hermann. "Cyclam Derivatives with a Bis(phosphinate) or a Phosphinato – Phosfonate Pendant Arm: Ligands for Fast and Efficient Copper(II) Complexation for Nuclear Medical Applications." *Inorg. Chem.* vol. 54. pp. 11751-11766. 2015. doi:10.1021/acs.inorgchem.5b01791

## Príloha 1 – $^1\text{H}$ NMR spektrum 4-(benzo[*d*]thiazol-2-yl)anilínu



$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ :

8,02 (d,  $J = 8,1$  Hz, 1H, C9),

7,92 (d,  $J = 7,9$  Hz, 2H, C11, C15),

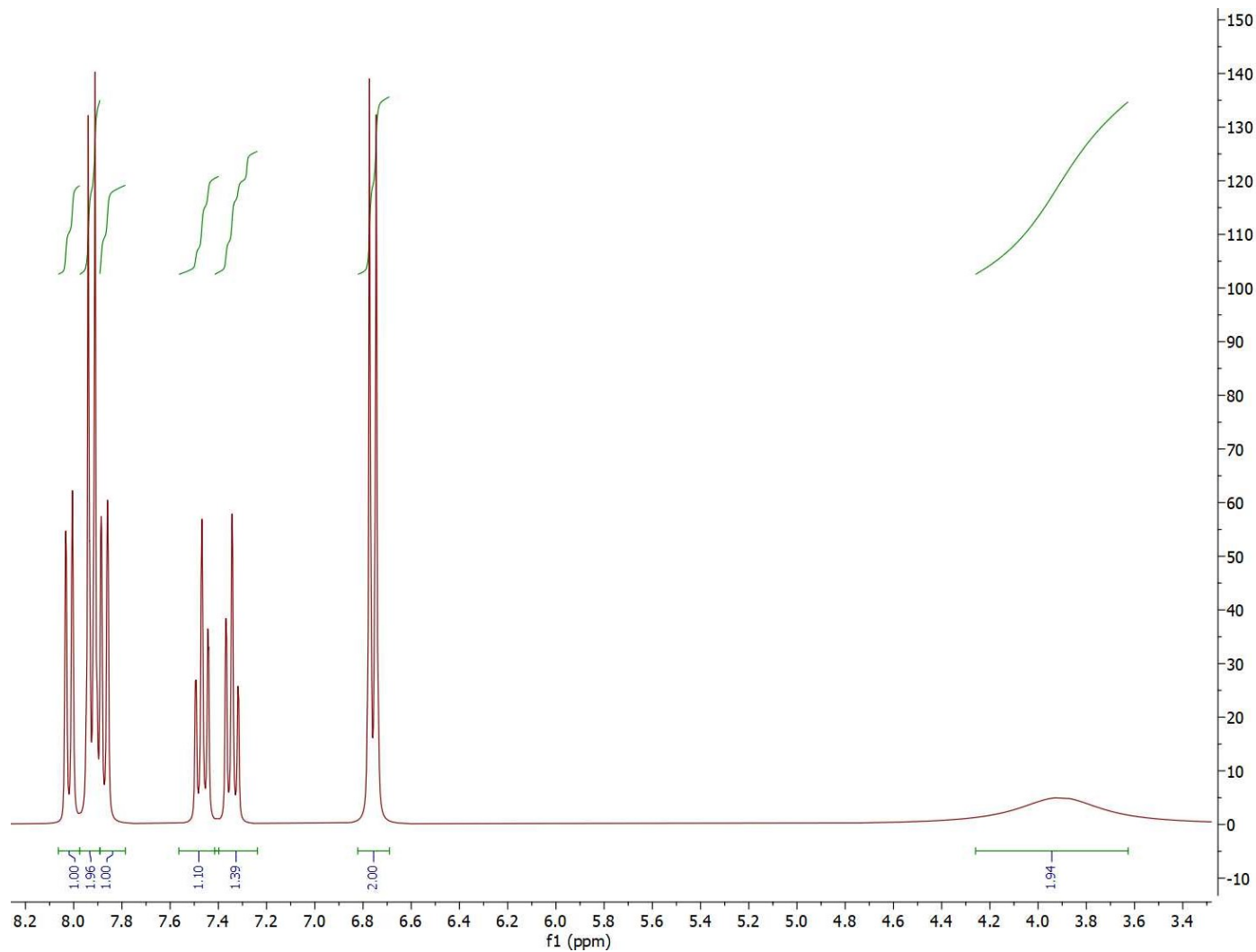
7,87 (d,  $J = 8,1$  Hz, 1H, C6),

7,47 (t,  $J = 7,3$  Hz, 1H, C8),

7,34 (t,  $J = 7,3$  Hz, 1H, C7),

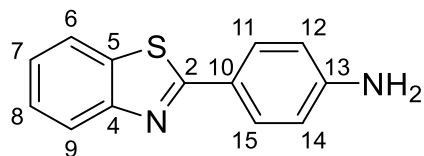
6,76 (d,  $J = 8,6$  Hz, 2H, C12, C14),

3,91 (s, 2H,  $\text{NH}_2$ ).



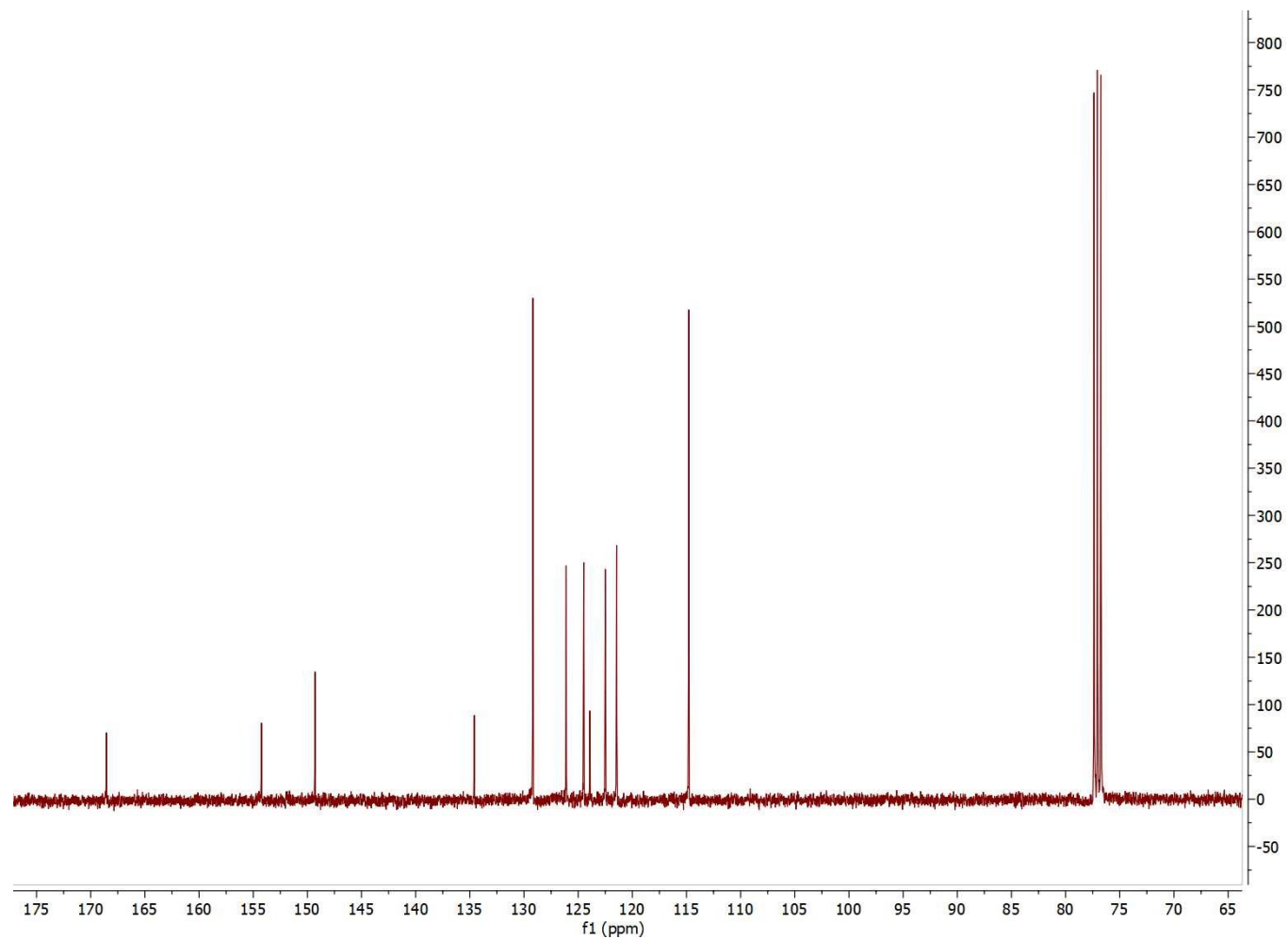


## Príloha 2 – $^{13}\text{C}$ NMR spektrum 4-(benzo[d]thiazol-2-yl)anilínu

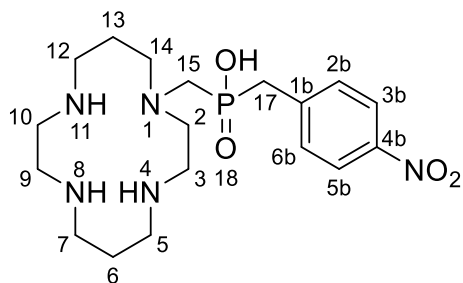


$^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ :

169,53 (C2), 153,66 (C4), 143,59 (C13),  
134,08 (C5), 129,18 (C11, C15), 126,08  
(C8), 124,41 (C7), 122,44 (C6, C9),  
121,35 (C10), 114,74 (C12, C14).



### Príloha 3 – $^1\text{H}$ NMR spektrum ((1,4,8,11-tetraazacyklotetradekan-1-yl)metyl)(4-nitrobenzyl)fosfinovej kyseliny



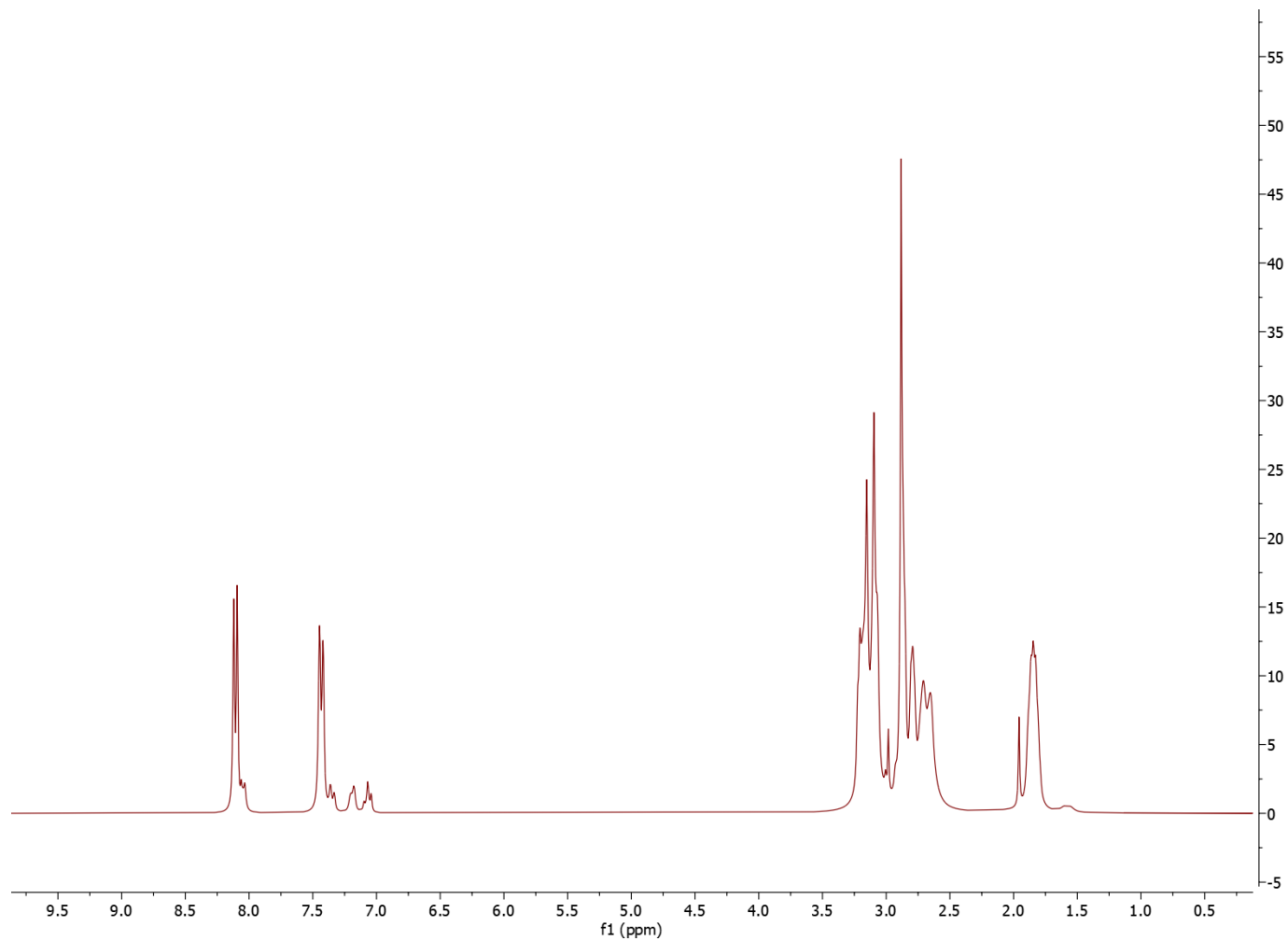
$^1\text{H}$  NMR (300 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$ :

8,11 (d,  $J = 8,4$  Hz, 2H, C3b, C5b),

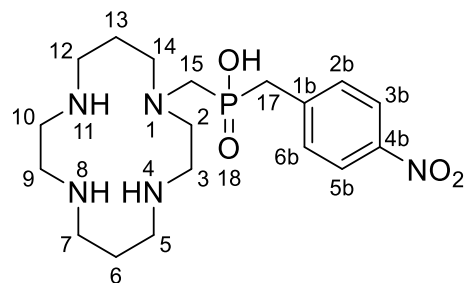
7,43 (d,  $J = 8,4$  Hz, 2H, C2b, C6b),

3,49 – 2,39 (m, 22H, C2 – C14, C15),

1,85 (s, 3H, N4, N8, N11).

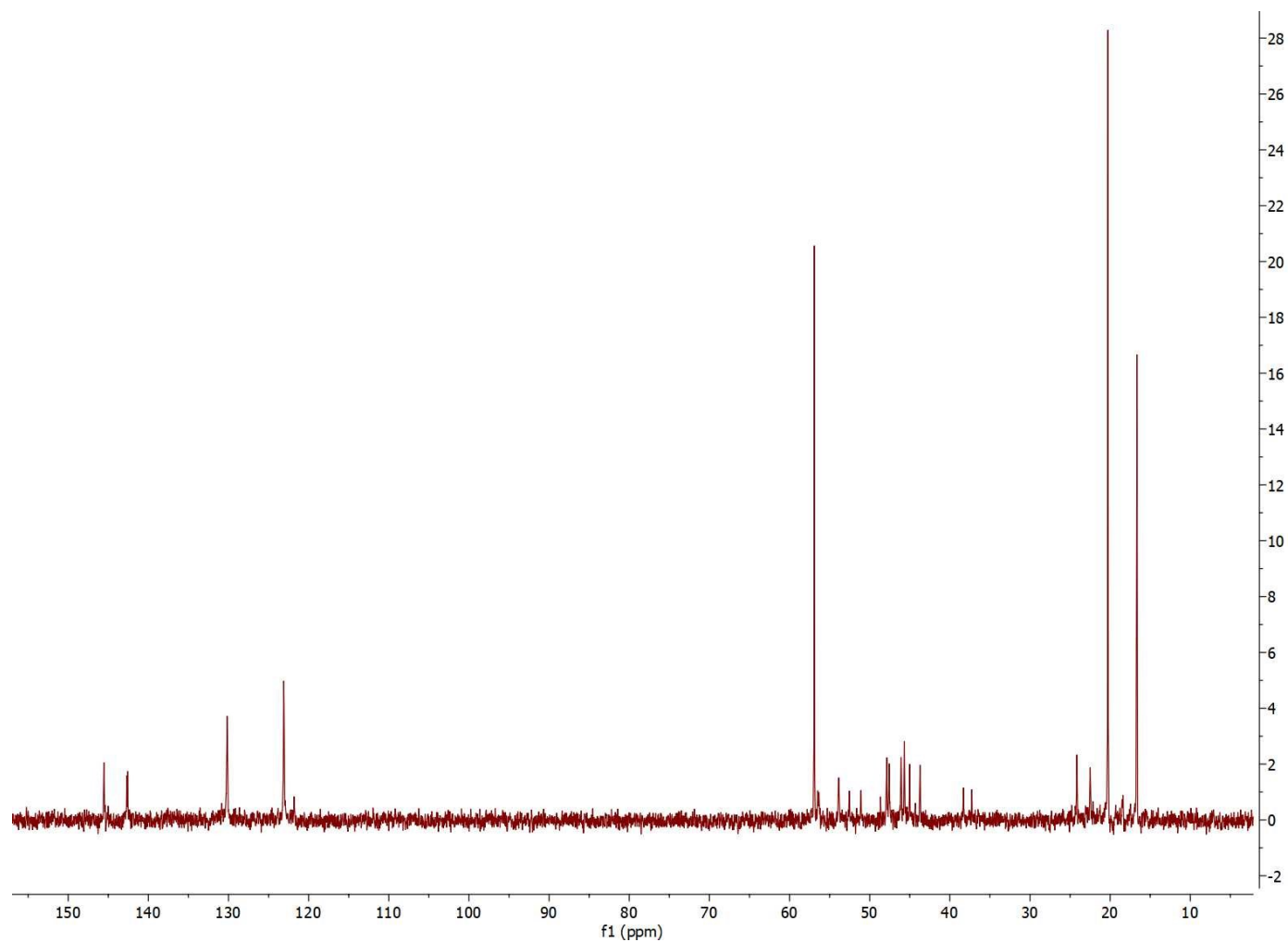


#### Príloha 4 – $^{13}\text{C}$ NMR spektrum ((1,4,8,11-tetraazacyklotetradekan-1-yl)metyl)(4-nitrobenzyl)fosfínovej kyseliny

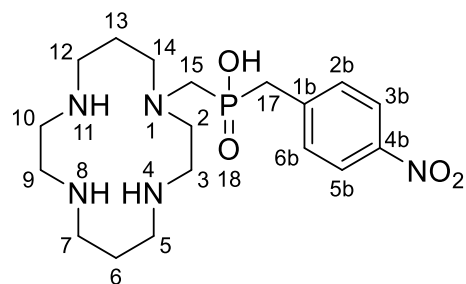


$^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$ :

145,53 (C4b), 142,64 (C1b), 130,16 (C2b, C6b), 123,10 (C3b, C5b), 56,47 (C14), 53,87 (C2), 52,54 (C15), 51,09 (C12), 47,88 (C3), 47,57 (C5), 46,08 (C7), 45,68 (C17), 45,01 (C9), 43,72 (C10), 24,15 (C13), 22,49 (C6).



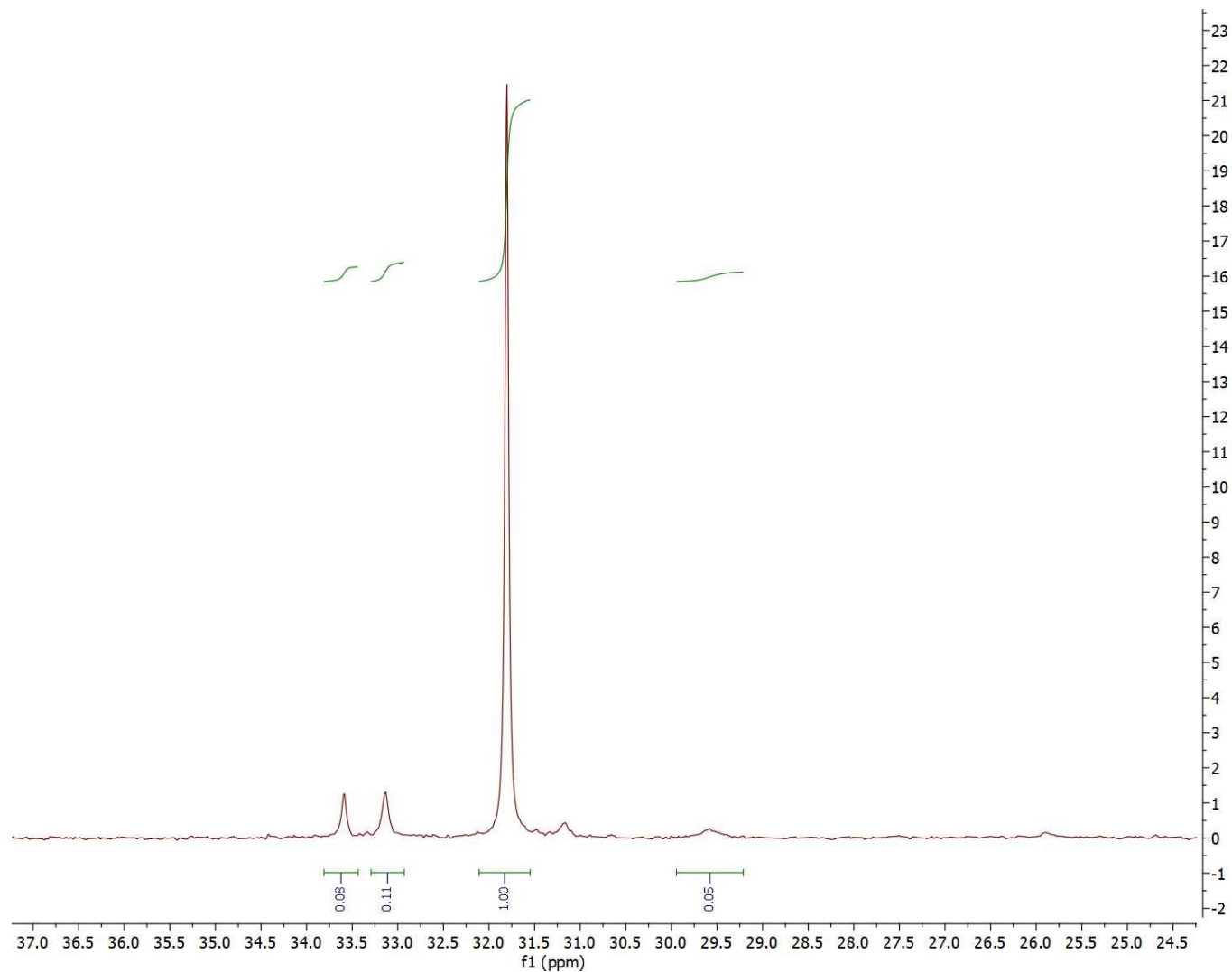
## Príloha 5 – $^{31}\text{P}$ NMR spektrum ((1,4,8,11-tetraazacyklotetradekan-1-yl)metyl)(4-nitrobenzyl)fosfinovej kyseliny



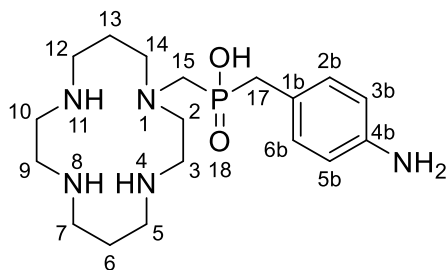
$^{31}\text{P}$  NMR (121 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$ :

33,59, 33,14, 31,80, 29,58

( $^{31}\text{P}$  NMR žiadaného produktu je 31,80).



**Príloha 6 –  $^1\text{H}$  NMR spektrum ((1,4,8,11-tetraazacyklotetradekan-1-yl)metyl)(4-aminobenzyl)fosfinovej kyseliny**



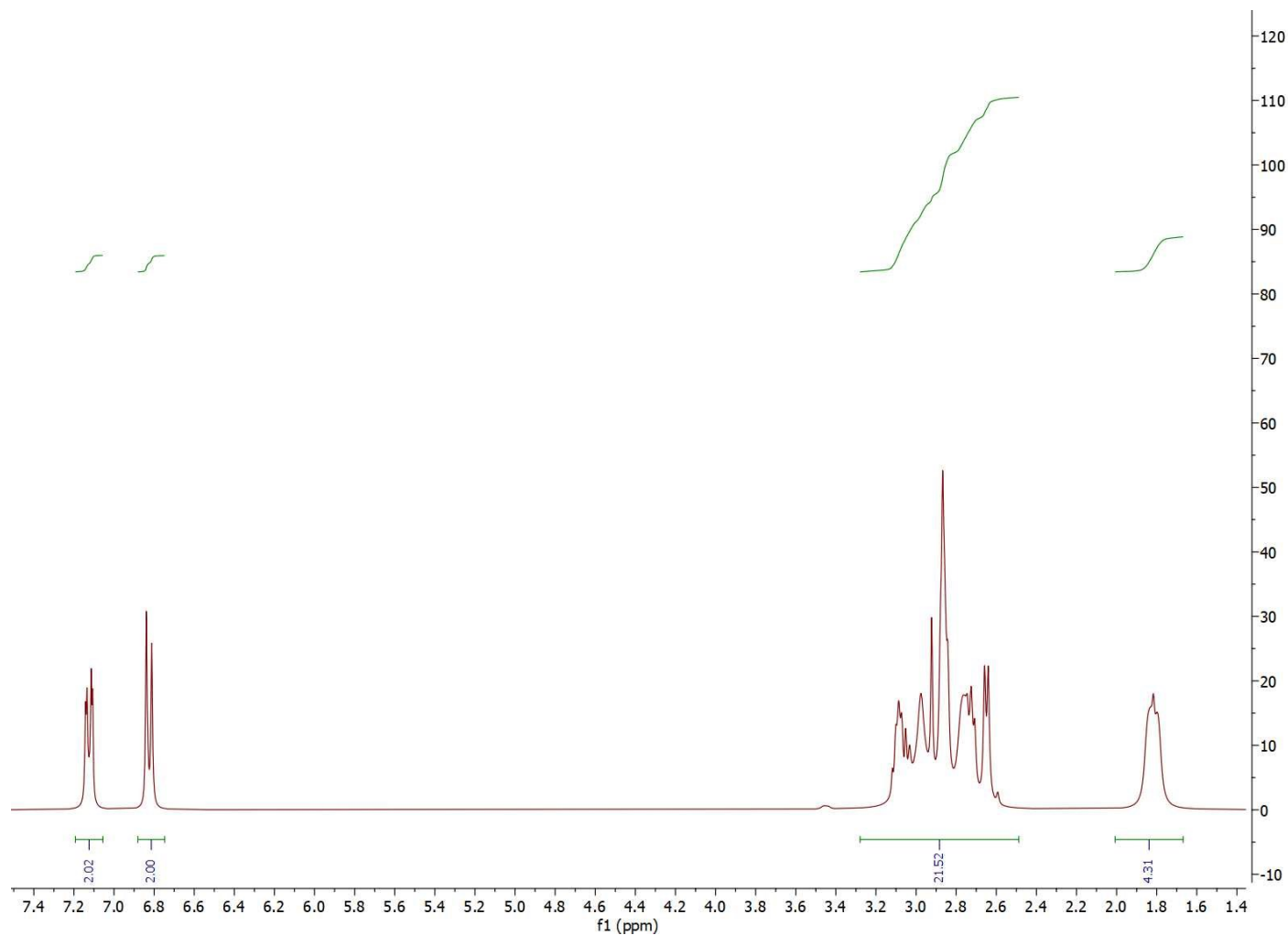
$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$ :

7,12 (d,  $J = 8,2$  Hz, 2H, C3b, C5b),

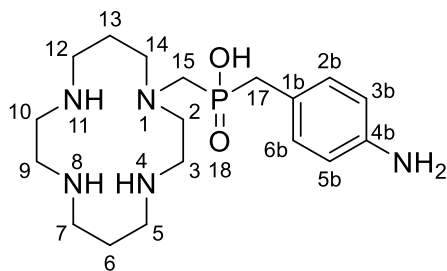
6,83 (d,  $J = 8,2$  Hz, 2H, C2b, C6b),

3,53 – 2,48 (m, 22H, C2 – C14, C15),

1,96 – 1,63 (m, 5H, N4, N8, N11, C17).

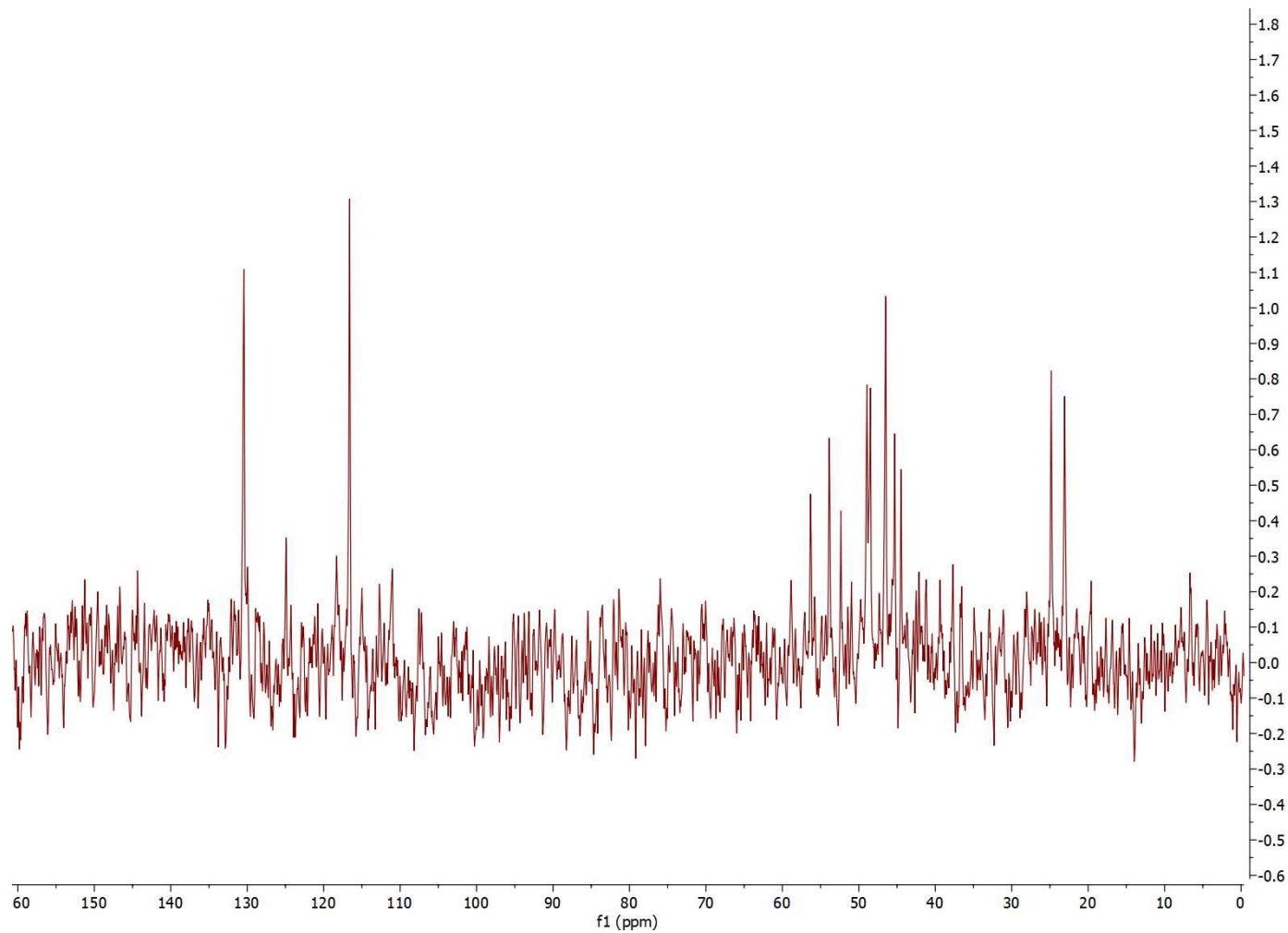


## Príloha 7 – $^{13}\text{C}$ NMR spektrum ((1,4,8,11-tetraazacyklotetradekan-1-yl)metyl)(4-aminobenzyl)fosfínovej kyseliny

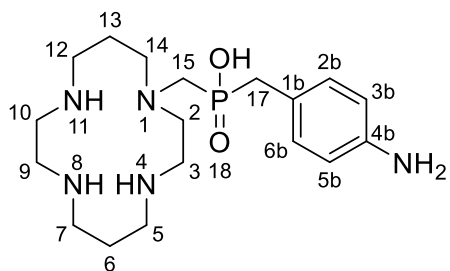


$^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$ :

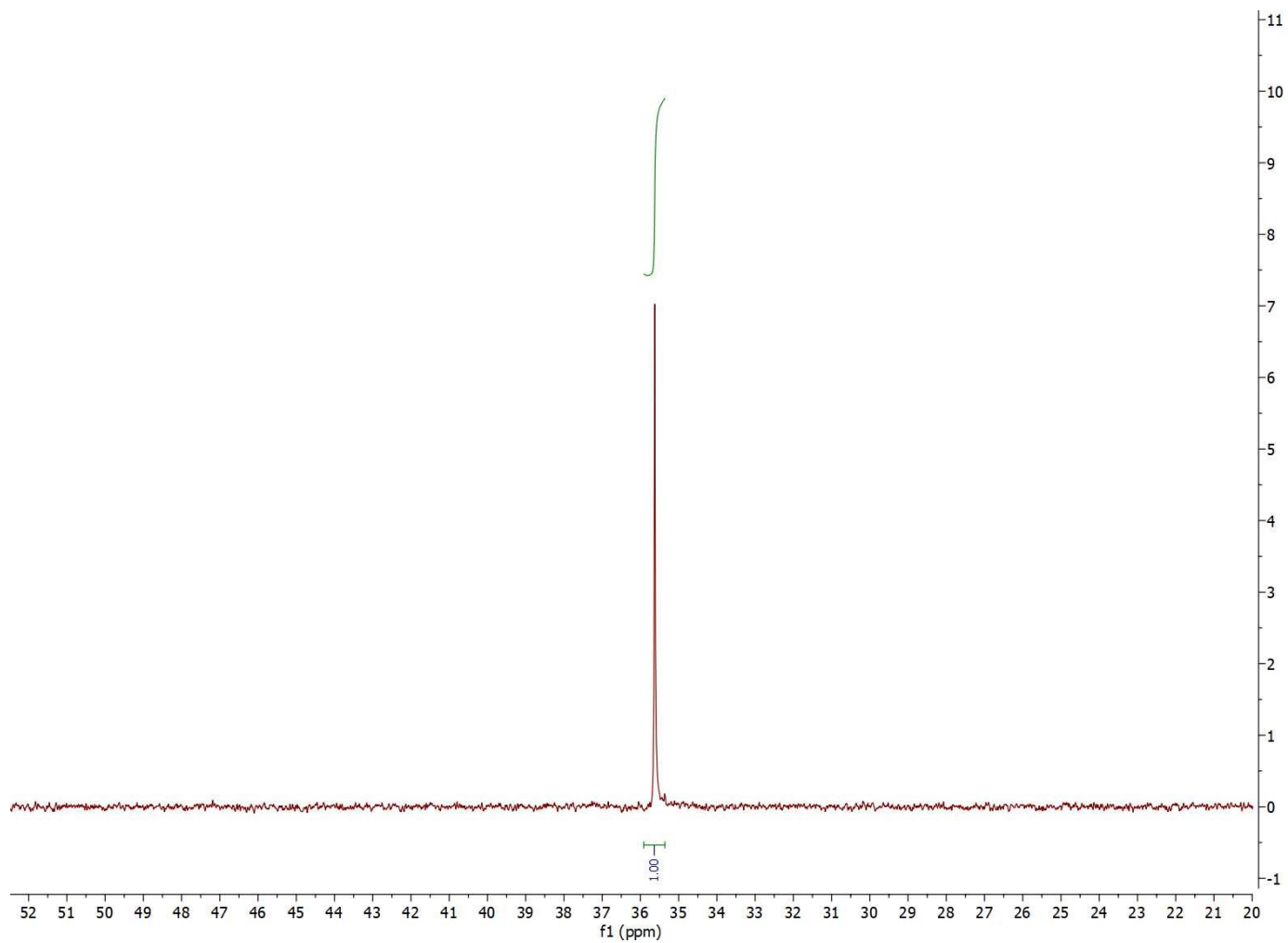
144,32 (C5b), 130,36 (C2b, C6b),  
124,92 (C1b), 116,68 (C3b, C5b),  
56,21 (C14), 53,87 (C2, C15), 48,86  
(C12), 48,46 (C3), 46,42 (C5, C7,  
C17), 45,15 (C9), 44,50 (C10), 24,84  
(C13), 22,81 (C6).



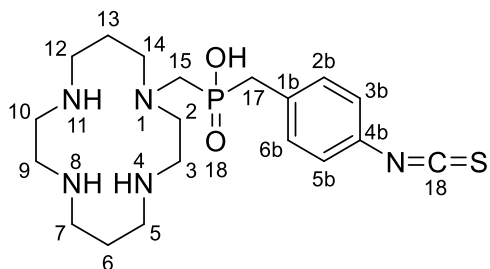
Príloha 8 –  $^{31}\text{P}$  NMR spektrum ((1,4,8,11-tetraazacyklotetradekan-1-yl)metyl)(4-aminobenzyl)fosfínovej kyseliny



$^{31}\text{P}$  NMR (121 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$ : 35,69.



Príloha 9 –  $^1\text{H}$  NMR spektrum ((1,4,8,11-tetraazacyklotetradekan-1-yl)metyl)(4-isothiokyanato-benzyl)fosfínovej kyseliny



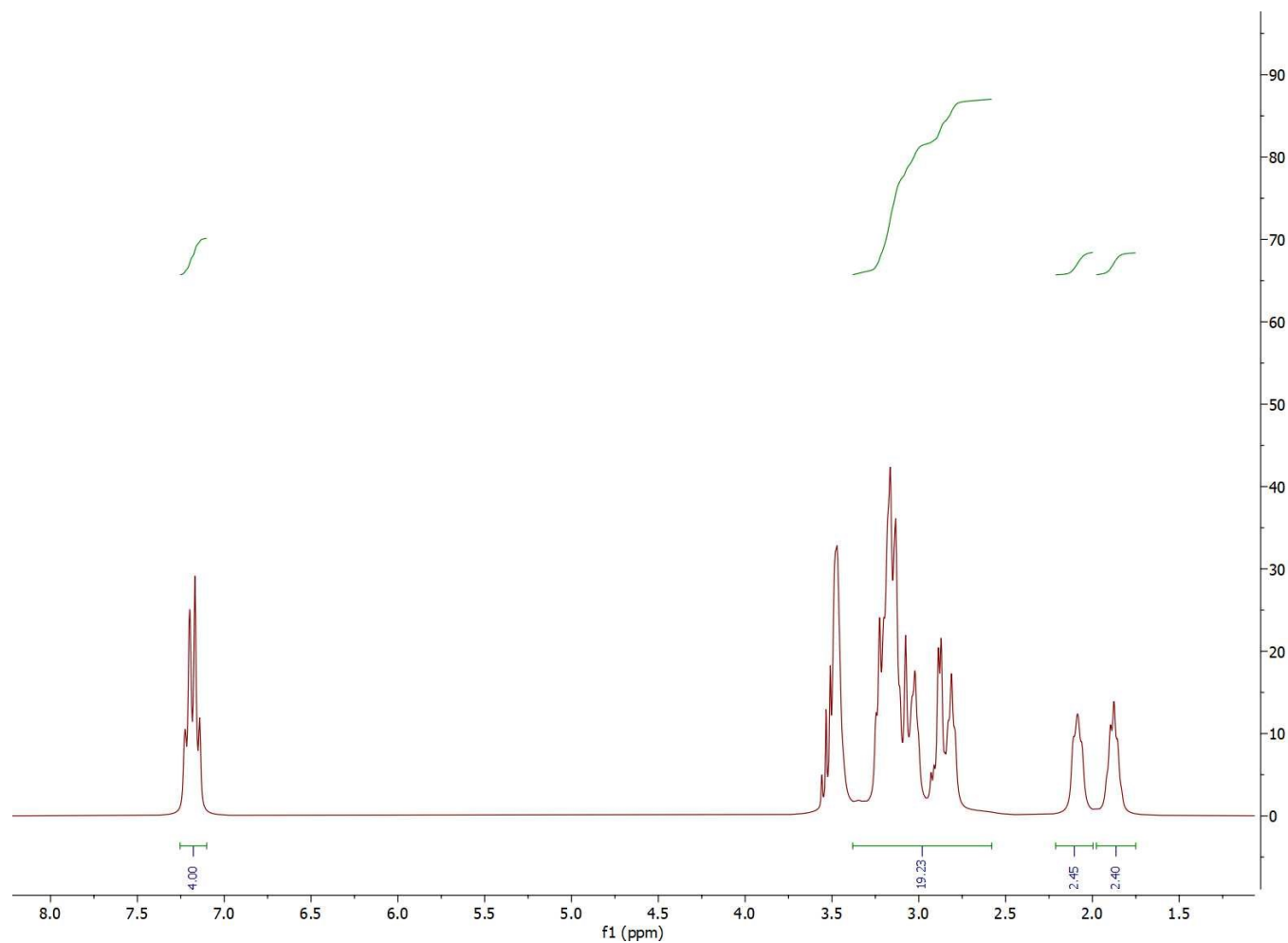
$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$ :

7,18 (q,  $J = 7,18$  Hz, 4H, C2b – C6b),

3,37 – 2,58 (m, 20H, C2 – C14),

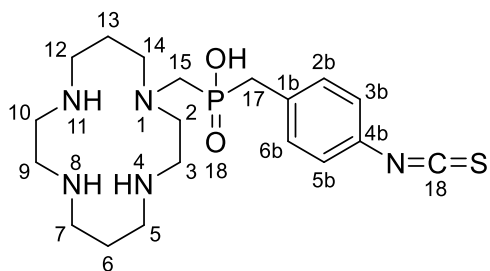
2,22 – 2,00 (m, 3H, N4, N8, N11), 1,97

– 1,75 (m, 3H, C15, C17a).



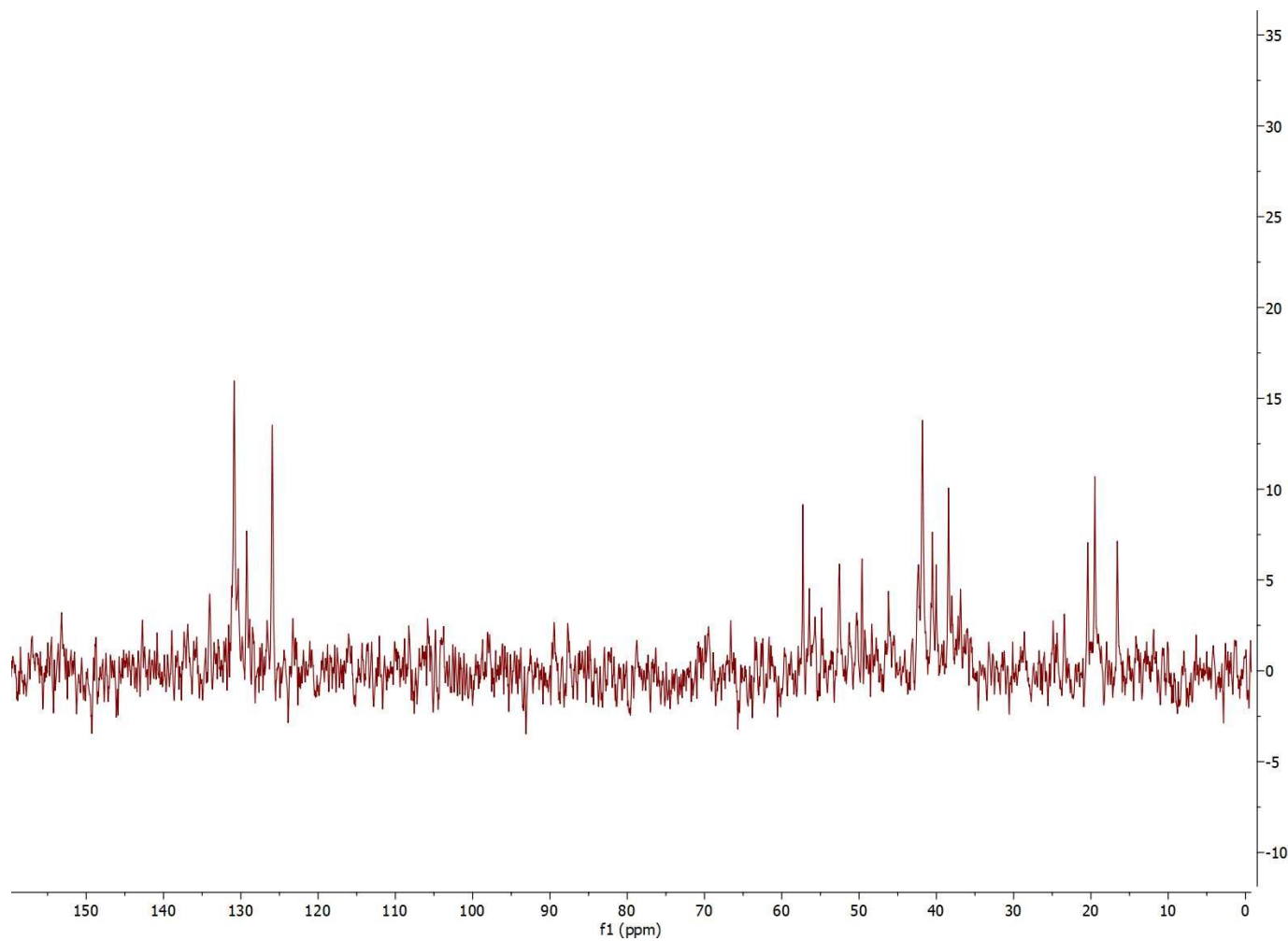


## Príloha 10 – $^{13}\text{C}$ NMR spektrum ((1,4,8,11-tetraazacyklotetradekan-1-yl)metyl)(4-isothiokyanato-benzyl)fosfínovej kyseliny

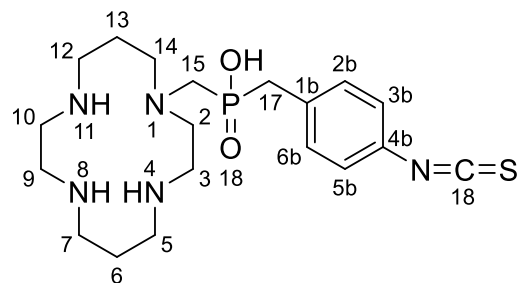


$^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$ :

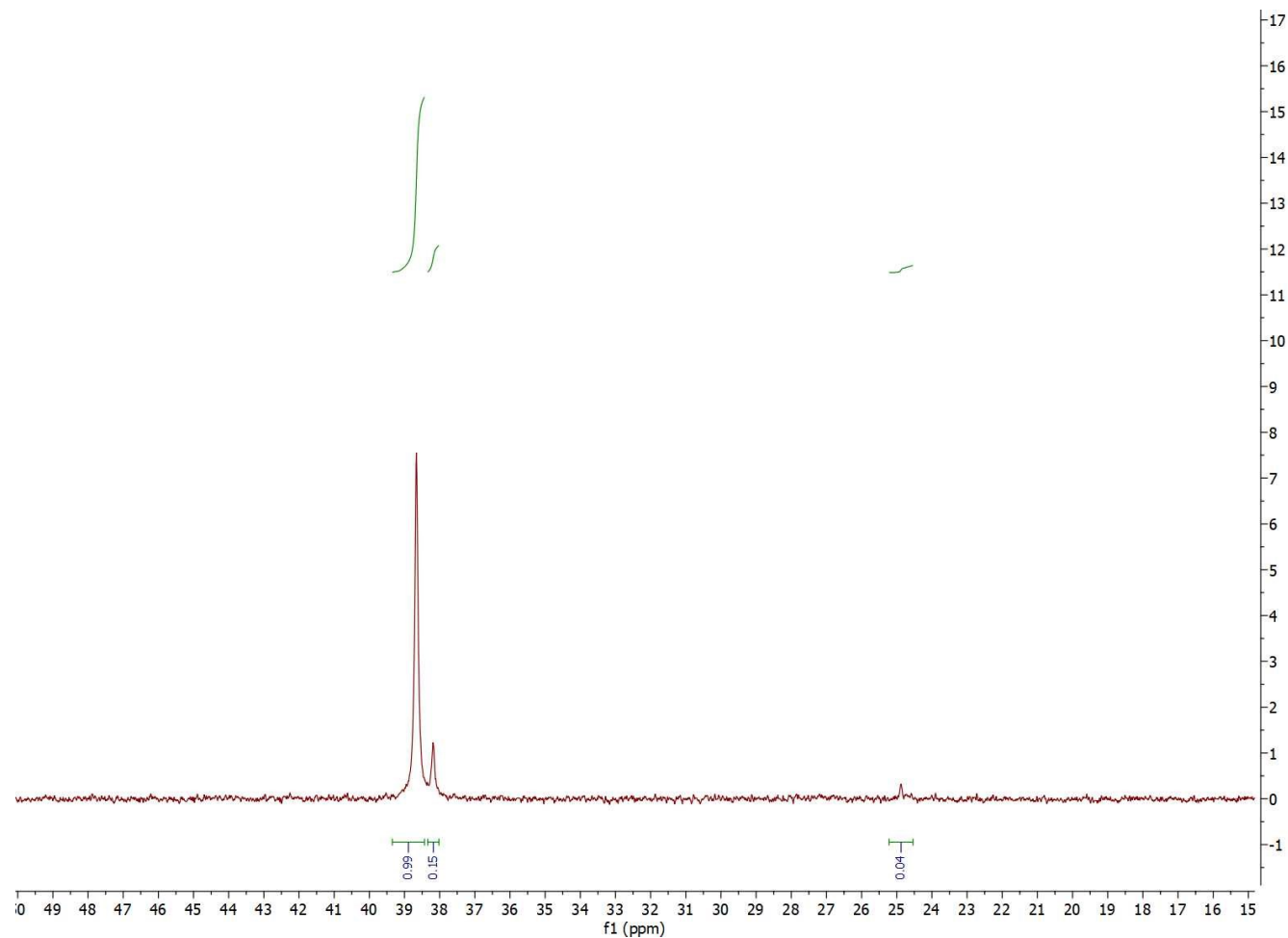
134,23 (C4b), 130,74 (C2b, C6b),  
129,27 (C1b), 126,13 (C3b, C5b),  
56,39 (C14), 52,56 (C2), 49,55 (C15),  
46,11 (C12), 42,32 (C3), 41,82  
(C5, C7), 40,52 (C17), 40,01 (C9),  
38,43 (C10), 20,35 (C13), 19,57 (C6).



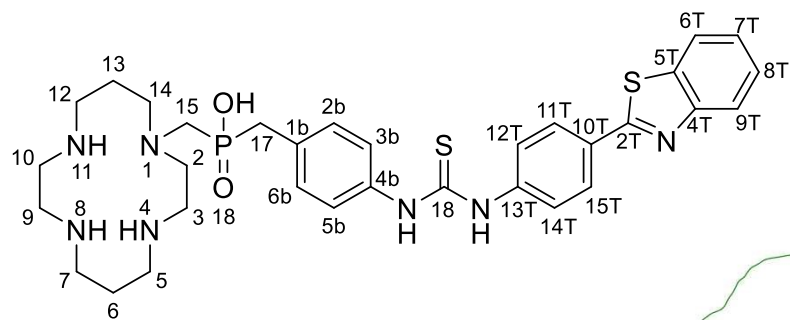
# Príloha 11 – $^{31}\text{P}$ NMR spektrum ((1,4,8,11-tetraazacyklotetradekan-1-yl)metyl)(4-isothiokyanato-benzyl)fosfinovej kyseliny



$^{31}\text{P}$  NMR (121 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$ : 38,68, 38,22, 24,81 ( $^{31}\text{P}$  NMR žiadaného produktu je 38,68).



## Príloha 12 – $^1\text{H}$ NMR spektrum ligandu L2

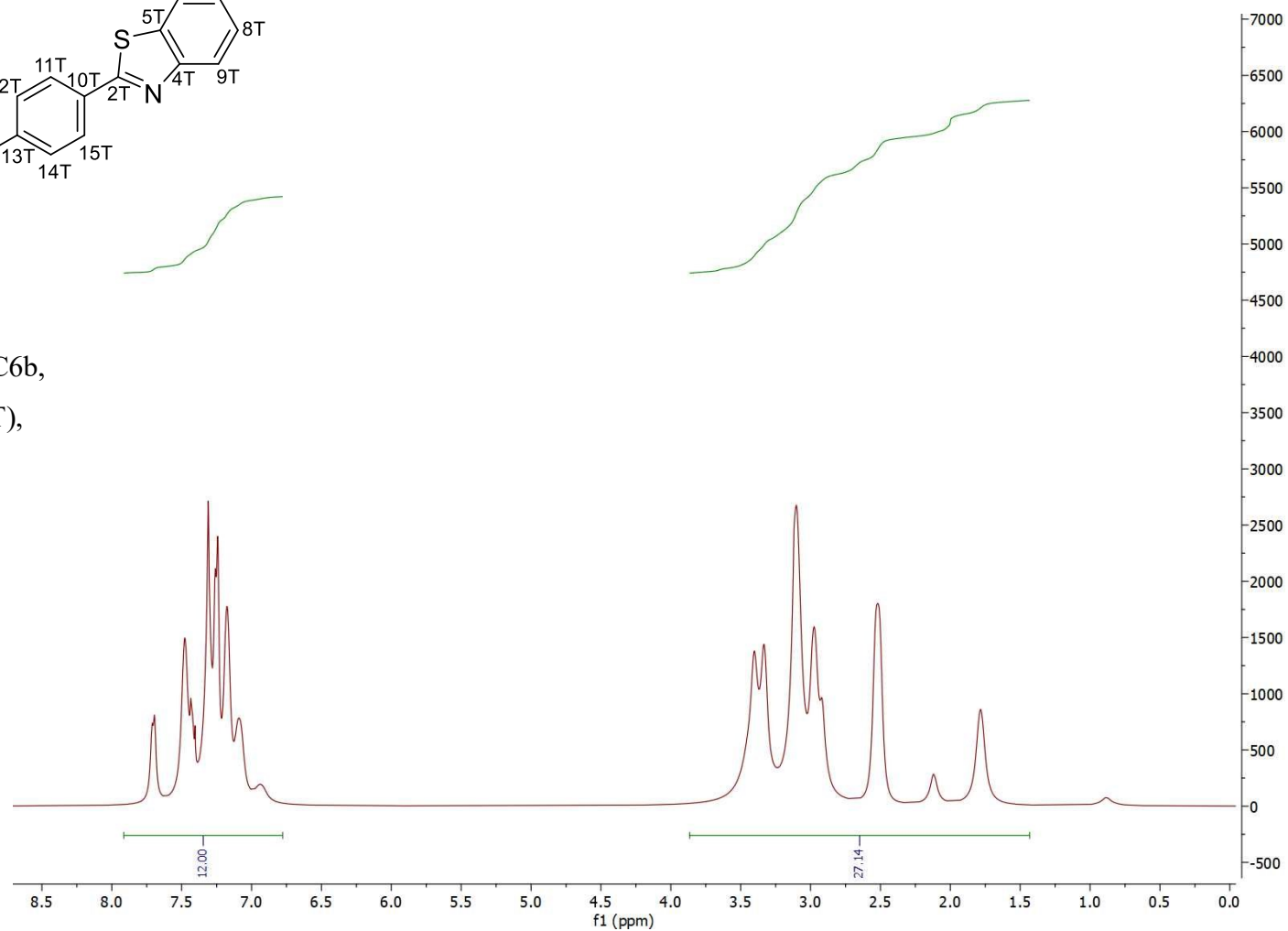


$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$ :

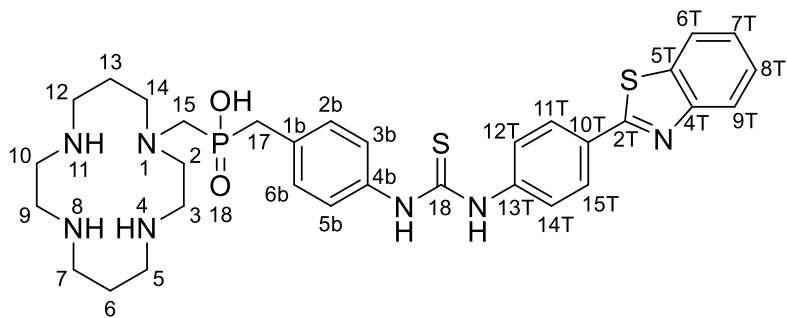
7,92 – 6,77 (m, 12H, C2b, C3b, C5b, C6b,

C6T – C9T, C11T, C12T, C14T, C15T),

3,86 – 1,44 (m, 27H, C2 – C17).

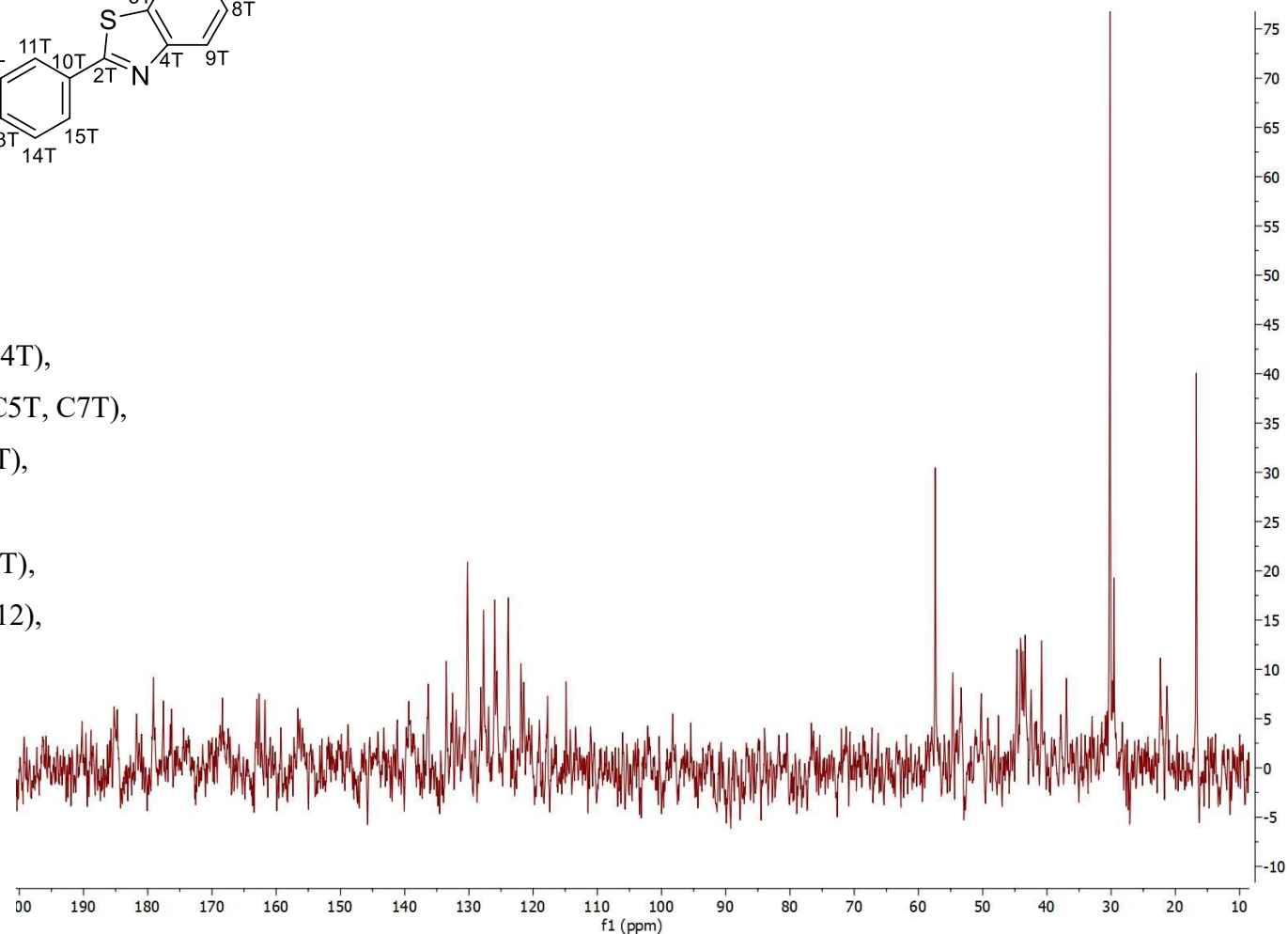


## Príloha 13 – $^{13}\text{C}$ NMR spektrum ligandu L2

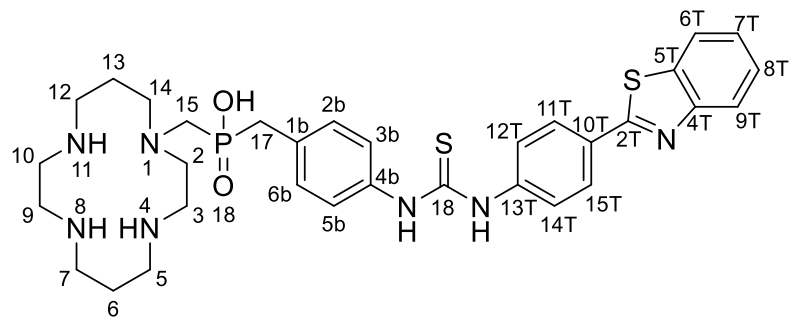


$^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$ :

179,06 (C18), 162, 93 (C2T), 156,32 (C4T),  
139,44 (C13T), 133,58 (C4b), 130,11 (C5T, C7T),  
127,72 (C2b, C6b), 126,08 (C11T, C15T),  
125,58 (C8T), 123,87 (C3b, C5b),  
121,86 (C12T, C14T), 115,05 (C6T, C9T),  
57,16 (C2, C14), 54,64 (C15), 50,20 (C12),  
44,65 (C3), 44,02 (C5), 43,63 (C7),  
43,32 (C17), 40,83 (C9, C10),  
22,13 (C13), 21,44 (C6).



# Príloha 14 – $^{31}\text{P}$ NMR spektrum ligandu L2



$^{31}\text{P}$  NMR (121 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$ : 36,11.

