

UNIVERZITA KARLOVA

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra biofyziky a fyzikální chemie



DIPLOMOVÁ PRÁCE

**Příprava nesymetrického azaftalocyaninu pro značení DNA sond zvyšujících
citlivost molekulárně-biologických metod**



Hradec Králové, 2017

Aneta Schimmerová

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

V Hradci Králové dne

.....

Na tomto místě bych ráda poděkovala své školitelce doc. PharmDr. Veronice Novákové, Ph.D. za odborné vedení, trpělivost a cenné připomínky při vypracování této diplomové práce. Mé díky také patří doktorandům, kteří v době mé laboratorní činnosti pracovali v laboratoři doc. PharmDr. Veroniky Novákové, Ph.D. V neposlední řadě také děkuji všem členům Výzkumné skupiny azaftalocyaninových barviv za velmi příjemné pracovní prostředí.

Tato práce vznikla za finanční podpory SVV 260 401.

OBSAH

OBSAH	1
1. ABSTRAKT.....	3
2. ABSTRACT	4
3. SEZNAM ZKRATEK	5
4. TEORETICKÁ ČÁST	6
4.1. Luminiscence	6
4.2. Zhášení fluorescence	10
4.3. Světlem vyvolaný přenos elektronu a intramolekulární přenos náboje	11
4.4. Alkylamino substituované azaftalocyaniny jako „dark quenchery“	12
5. ZADÁNÍ – CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE.....	15
6. METODICKÁ ČÁST	16
6.1. Nukleofilní aromatická substituce	16
6.2. Vybraná couplingová reakční činidla využívaná k tvorbě amidické vazby	17
6.2.1. Karbodiimidy	18
6.2.2. Fosfoniové a uroniové soli	19
6.3. Sonogashira coupling.....	20
7. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	23
7.1. Chemikálie a přístroje.....	23
7.2. Schéma prováděných reakcí.....	24
7.3. Příprava 5,6-bis(dimethylamino)-pyrazin-2,3-dikarbonitrilu (1)	27
7.4. Příprava 5,6-bis((2-methoxyethyl)amino)pyrazin-2,3-dikarbonitrilu (2).....	28
7.5. Příprava methylesteru kyseliny 3-(4-bromfenyl)propanové (3).....	29
7.6. Příprava methylesteru kyseliny 3-(4-ethynylfenyl)propanové (4).....	30
7.7. Příprava N-methyl- γ -aminomáselné kyseliny (5)	31
7.8. Příprava 4-[(3-chloro-5,6-dikyanopyrazin-2-yl)methyl]amino]butanové kyseliny (6). 32	
7.9. Příprava dihydroxyethylamidu kyseliny 4-[(3-chlor-5,6-dikyan-pyrazin-2-yl)methyl]amino]butanové (7)	33
7.10. Příprava sloučeniny 8.....	35
7.11. Příprava methylesteru kyseliny 3-(4-((3-chloro-5,6-dikyanopyrazin-2-yl)ethynyl)fenyl)propanové (9)	37
7.12. Příprava sloučeniny 10.....	38
7.13. Příprava sloučeniny 11.....	39

7.14.	Příprava 4-amino[N,N-bis(2-hydroxyethyl)]anilinu (12)	40
7.15.	Příprava sloučeniny 13.....	41
7.16.	Příprava cílového AzaPc (14)	42
7.17.	Testovací reakce	43
7.17.1.	Převedení hydrochloridu 9-aminoakridinu na volnou bazi (15)	43
7.17.2.	Příprava 3-(4-ethynylfenyl)propanové kyseliny (16).....	44
7.17.3.	Příprava sloučeniny 17	44
8.	VÝSLEDKY A DISKUZE	46
9.	ZÁVĚR.....	53
10.	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	54

1. ABSTRAKT

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra **Katedra biofyziky a fyzikální chemie**

Student **Aneta Schimmerová**

Školitel **doc. PharmDr. Veronika Nováková, Ph.D.**

Název diplomové práce **Příprava nesymetrického azaftalocyaninu pro značení
DNA sond zvyšujících citlivost molekulárně-biologických
metod**

Azaftalocyaniny (AzaPc, z angl. azaphthalocyanines) jsou planární makrocyclické sloučeniny. AzaPc nesoucí ve své molekule alkylaminové periferní substituenty se ukázaly být vhodné jako zhášecí fluorescence jiných sloučenin. Tohoto faktu může být využito v DNA-hybridizačních metodách. V případě, že je na jedné DNA sondě navázán AzaPc zhášecí i fluorofor, není patrná žádná fluorescence. Pokud dojde k rozštěpení oligonukleotidového řetězce DNA sondy, dostane se zhášecí do dostatečně velké vzdálenosti od fluoroforu a není již tak schopen zhášet fluorescenci fluoroforu. AzaPc díky rozsáhlému systému konjugovaných dvojných vazeb absorbují téměř v celé škále absorpčního spektra od 300 nm do 750 nm a jsou tak schopni zhášet fluorescenci všech v praxi používaných fluoroforů.

Cílem této diplomové práce bylo připravit AzaPc, který bude možno navázat doprostřed DNA sondy a současně ponese planární molekulu, která se vklíní do dvoušroubovice DNA a zpevní tak vazbu celé DNA sondy. Nejprve byly několikakrokovou syntézou připraveny vhodné prekurzory za využití couplingových metod nebo nukleofilních substitucí, podmínky těchto reakcí byly optimalizovány. Tyto prekurzory byly následně použity pro přípravu cílového nesymetrického AzaPc pomocí statistické kondenzace za podmínek dle Linsteadova.

2. ABSTRACT

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department **Department of Biophysics and Physical Chemistry**

Student **Aneta Schimmerová**

Supervisor **Assoc. Prof. PharmDr. Veronika Nováková, Ph.D.**

Title of thesis **Synthesis of low-symmetry azaphthalocyanine for the labeling of
DNA probes increasing the susceptibility of the molecular-
biological methods**

Azaphthalocyanines (AzaPc) are planar macrocyclic compounds. The alkylamino substituted derivatives can be used as dark quenchers in DNA-hybridization assays. A probe usually contains a quencher and a fluorophore. If these two moieties are close enough, the emitted fluorescence is quenched by the quencher. After the hydrolysis of the oligonucleotide probe, the fluorescence appears because of the long distance between the quencher and fluorophore. Thanks to the large system of conjugated double bonds, AzaPc absorb over a wide range of wavelengths from 300 nm to 750 nm. Such absorption covers all fluorophores used in hybridization assays nowadays, thus AzaPc may serve as universal dark quenchers.

The aim of this study was to prepare an AzaPc, that will be possible to attach inside an oligonucleotide strand. Furthermore, a planar moiety bounded to AzaPc will intercalate into DNA and improve the strength of binding of the probe to DNA. First, the appropriate precursors were synthesized employing either coupling reactions or nucleophilic substitution, particular reaction conditions were optimized. These precursors were then used for the synthesis of target non-symmetrical AzaPc by statistical condensation under Linstead conditions.

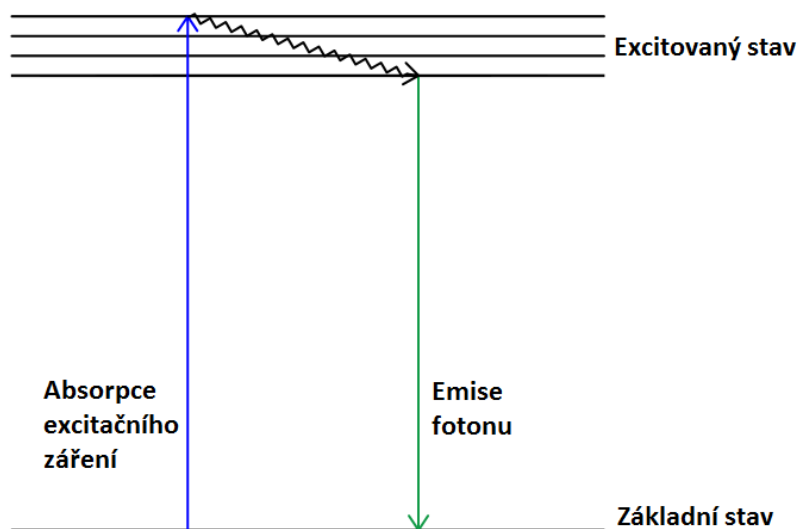
3. SEZNAM ZKRATEK

AzaPc	azaftalocyaniny (z angl. azaphthalocyanines)
FRET	fluorescence resonance energy transfer
PET	světlem vyvolaný přenos elektronu (z angl. photo-induced electron transfer)
ICT	intramolekulární přenos náboje (z angl. intramolecular charge transfer)
TPP	trifenylfosfin
TLC	tenkovrstvá chromatografie (z angl. thin layer chromatography)
THF	tetrahydrofuran
EAC	ethyl-acetát
MeOH	methanol
R _f	retenční faktor
PIntB	2-(di- <i>tert</i> -butylfosfino)-1-fenylindol
TMEDA	tetramethylethylendiamin
EtOH	ethanol
HOBt	hydroxybenzotriazol
TEA	triethylamin
DCM	dichlormethan
EDCI	1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimid
DMF	dimethylformamid
DIPEA	<i>N,N</i> -diisopropylethylamin
BuOH	butanol

4. TEORETICKÁ ČÁST

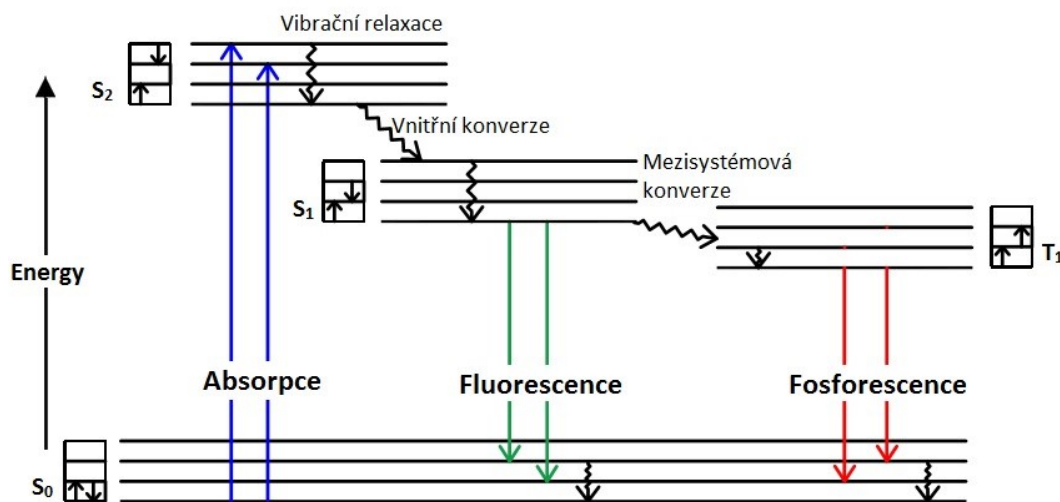
4.1. Luminiscence

Luminiscence je fyzikálně chemický jev charakterizovaný emisí fotonů z excitovaného stavu molekuly¹. Jedná se o schopnost některých molekul absorbovat energii a následně ji vyzářit ve formě fotonu (viz Obr. č. 1). Při absorpci energie dochází k přechodu elektronů ve valenční vrstvě atomu do excitovaného stavu. Tento stav je velmi nestabilní a elektrony se co nejrychleji snaží přejít zpět do základního stavu. Při přechodu elektronů do základního stavu dochází k emisi fotonu, přičemž energie emitovaného fotonu je vždy menší než energie absorbovaného fotonu. Ruku v ruce se změnou energie jde i změna vlnové délky záření².



Obr. č. 1: Znázornění energetických změn záření při luminiscenci

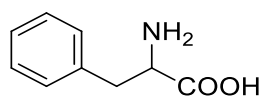
Luminiscence je obecně dělena na tři typy: fluorescence, fosforescence a zpožděná fluorescence¹. Elektronové přechody při luminiscenci jsou běžně znázorňovány pomocí tzv. **Jablonskiho diagramu** (viz Obr. č. 2).



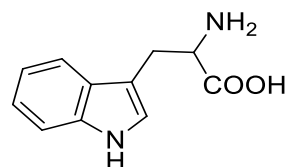
Obr. č. 2: Jablonskiho diagram

Singletové stavy jsou na diagramu znázorněny jako S_0 , S_1 , S_2 . V každém singletovém stavu existuje několik vibračních hladin. Po absorpci budícího záření určité vlnové délky jsou elektrony excitovány z rovnovážné vibrační hladiny stavu S_0 do jedné z vibračních hladin singletového stavu S_1 nebo S_2 . Při tomto ději elektrony nemění svůj spin. K deexcitaci elektronů dochází zářivými přechody (luminiscence) a nezářivými přechody (vibrační relaxace, vnitřní konverze a mezisystémová konverze). Až na výjimky elektrony dle tzv. **Kashova pravidla** rychle relaxují a přecházejí na nejnižší vibrační hladinu singletového stavu S_1 . Tyto děje nazýváme vibrační relaxace a vnitřní konverze. **Fluorescence** poté nastává při přechodu z nejnižší vibrační hladiny S_1 na některou z vibračních hladin základního stavu S_0 ³. Jedná se o spinově povolený přechod, doba trvání fluorescence je 10^{-8} s⁴.

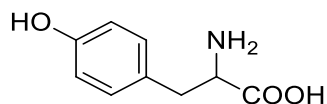
Sloučeniny vykazující fluorescenci nazýváme fluorofory. Jedná se o látky obsahující aromatický kruh případně konjugovaný systém dvojných vazeb. Jsou rozlišovány vnitřní fluorofory – přirozené (například aromatické kyseliny, enzymové kofaktory, kolagen a jiné; viz Obr. č. 3) a vnější – syntetické molekuly (jako například fluorescein, rhodaminy, BODIPY a cyaninová barviva¹; viz Obr. 3) využívaná hojně jako fluorescenční sondy.



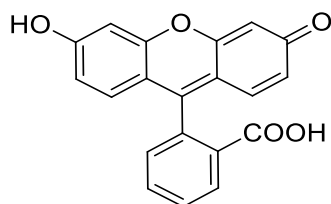
Fenylalanin



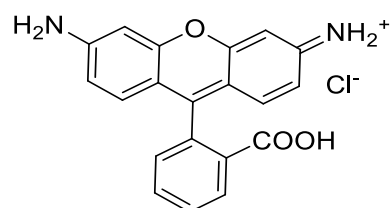
Tryptofan



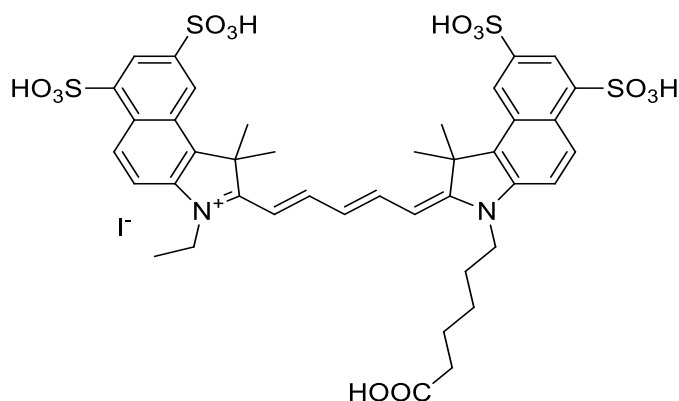
Tyrosin



Fluorescein



Rhodamin



Cyaninové barvivo

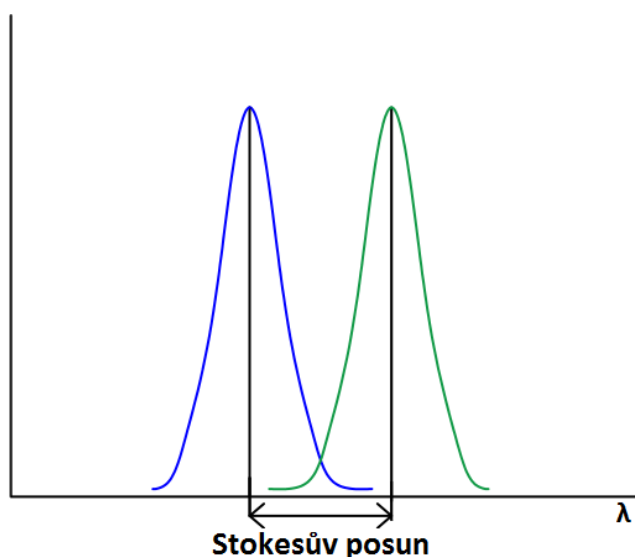
Obr. č. 3: Příklady vnitřních a vnějších fluoroforů

V excitovaném stavu se molekuly mohou dostat díky spinové konverzi do prvního tripletového stavu T_1 . Tato konverze se nazývá mezisystémová konverze. Emise záření při přechodu elektronu z T_1 do základního stavu S_0 se nazývá **fosforescence**³. Elektron v tripletovém stavu T_1 má stejný spin jako elektron v základním stavu, tudíž se jedná o spinově zakázaný přechod a doba trvání je delší než u fluorescence (milisekundy až sekundy)⁴.

Třetí typ, **zpožděná fluorescence**, nastává tehdy, když dochází k termální excitaci molekuly z nejnižší hladiny tripletového stavu T_1 zpět na nejnižší hladinu excitovaného singletového stavu S_1 . Po návratu na S_1 poté dochází k fluorescenci. Přechod z T_1 na S_1 způsobí zdržení celého děje, tudíž je doba života delší než u klasické fluorescence (přibližně rovna době života fosforescence). Vlnová délka emitovaného záření zůstává stejná jako u klasické fluorescence^{4,5}.

Pravděpodobnost relaxace molekuly z excitovaného stavu danou cestou (fluorescencí, fosforescencí atd.) je popisována jako tzv. **kvantový výtěžek**⁴. Součet všech kvantových výtěžků je roven jedné. Pro naše účely je důležitý kvantový výtěžek fluorescence, což je podíl emitovaných fotonů ve formě fluorescence ku počtu absorbovaných fotonů.

Jednou z hlavních charakteristik fluorescence je tzv. **Stokesův posun**. Jedná se o rozdíl v energiích mezi maximy absorpčního a emisního pásu (viz Obr. č. 4), kdy energie emitovaného fotonu je vždy nižší než energie fotonu absorbovaného. Tyto energetické ztráty jsou dány především vibračními relaxacemi a vnitřními konverzemi³.



Obr. č. 4: Stokesův posun (absorpční spektrum znázorněno modře, emisní spektrum znázorněno zeleně, λ značí vlnovou délku)

4.2. Zhášení fluorescence

Zhášením fluorescence (fluorescence quenching) se rozumí procesy vedoucí ke snížení intenzity fluorescence molekul, tzn. ke snížení kvantového výtěžku fluorescence. Mezi nejdůležitější mechanismy zhašení se řadí statické zhášení a dynamické zhášení (fluorescence resonance energy transfer, FRET)³.

Statické zhášení nastává v důsledku vytvoření komplexu (tzv. ground state complex) mezi fluoroforem v základním energetickém stavu a zhášečem³.

Tyto komplexy vznikají v důsledku agregace, které fluorescenční barviva ve vodném roztoku ráda podléhají za účelem minimalizace kontaktu s vodou. Mohou vznikat dva typy agregátů. Prvním typem jsou H-agregáty, jejichž absorpční spektrum je posunuto do modré části spektra, kvantový výtěžek fluorescence se snižuje⁶. V případě dvou stejných fluoroforů může dojít ke vzniku úplně nefluorescenčního agregátu v důsledku vykompenzování energií. Naopak J-agregáty mívají absorpční pás posunutý k červené části spektra a kvantový výtěžek je obvykle vyšší⁷.

Při **dynamickém zhášení** dochází ke srážce zhášeče s fluoroforem v excitovaném stavu. Po kontaktu se zhášečem přechází fluorofor do základního stavu bez emise fotonu. Na rozdíl od statického zhášení nedochází při tomto ději ke změnám v molekule fluoroforu³.

Snížení intenzity fluorescence v důsledku FRET definuje **Stern-Volmerova rovnice**³:

$$\frac{F}{F_0} = 1 + k_q \tau_0 [Q]$$

F_0 resp. F – intenzita fluorescence v nepřítomnosti resp. přítomnosti zhášeče

k_q – bimolekulární zhášecí konstanta

τ_0 - doba dohasínání fluorescence za nepřítomnosti zhášeče

Q – koncentrace zhášeče

FRET může probíhat dvěma mechanismy. Prvním je Försterův mechanismus (označován také jako Coulombův). Donor a akceptor jsou vzájemně v interakci typu „dipól – dipól“, míra zhášení je závislá na vzdálenosti mezi donorem a akceptorem (R) a je vyjádřena jako $\frac{1}{R^6}$. Limitní vzdálenost je specifická pro každý pár donor-akceptor,

udává se v rozmezí 2-10 nm⁶. Tento mechanismus vyžaduje alespoň částečný překryv absorpčního spektra zhášeče a emisního spektra fluoroforu⁸.

Druhým typem je Dexterův mechanismus (označován též jako kolizní, výměnný nebo srážecí přenos energie). Tento děj vyžaduje překryv molekulových orbitalů donoru a akceptoru, působí tedy pouze na velmi krátkou vzdálenost. Míra zhášení je definována vztahem (e^{-R}), kde R je stejně jako v přechozím případě vzdálenost donor-akceptor⁶.

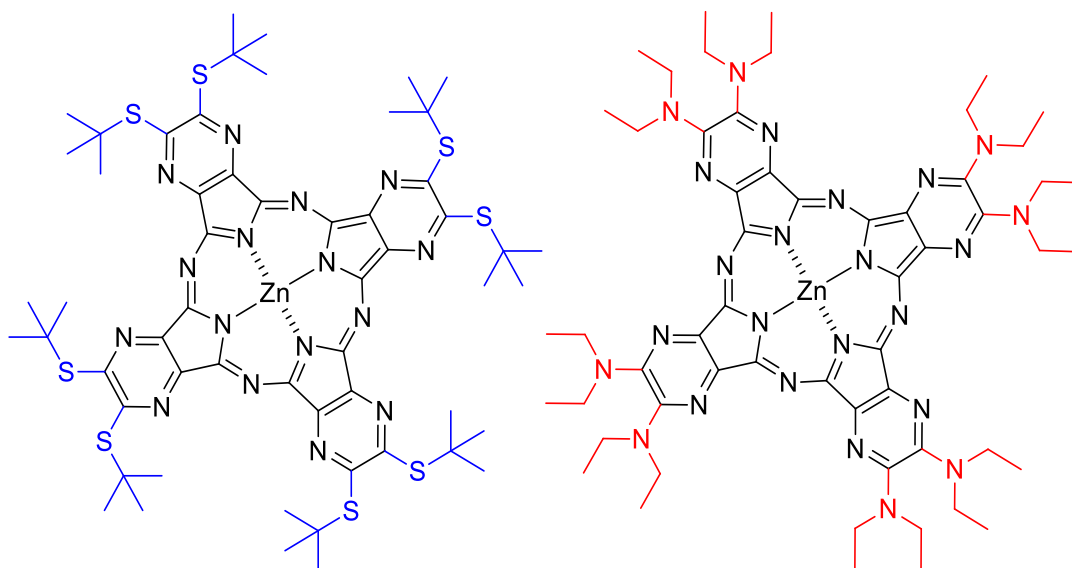
4.3. Světlem vyvolaný přenos elektronu a intramolekulární přenos náboje

Dalším mechanismem zhášení je světlem vyvolaný přenos elektronu (PET, z angl. photo-induced electron transfer). Jedná se o jev, při kterém dochází k přenosu excitovaných elektronů z donoru na akceptor, vytváří se tzv. charge transfer complex, ze kterého se molekula následně dostává zpět do základního stavu přenosem elektronu dle oxidoredukčního potenciálu. Donorem bývá nejčastěji atom dusíku s volným elektronovým párem, akceptorem poté aromatický kruh⁹. Donor a akceptor jsou při tomto ději zpravidla součástí jedné molekuly, ale byl popsán i PET mezi dvěma molekulami v roztoku.

Podobným jevem je také intramolekulární přenos náboje (ICT, z angl. intramolecular charge transfer). Jak název napovídá, donor i akceptor jsou v tomto případě obsaženy v téže molekule a jsou vzájemně v konjugovaném stavu. Při ICT se zvyšuje elektronová hustota v okolí akceptoru a vzniká tak tzv. charge-separated state. Přenosem elektronu po konjugovaném systému vazeb na akceptor molekula následně relaxuje do základního stavu.

Mechanismy PET a ICT převažují nad výše zmíněnými luminiscenčními jevy, neboť probíhají výrazně rychleji⁹. Z toho důvodu takovéto molekuly vykazují výrazně nižší kvantové výtěžky fluorescence.

Dějem ICT u AzaPc se detailně zabývala naše výzkumná skupina¹⁰. ICT byl studován a popisován na molekule tetrapyrazinoporfyrazinu (patřící mezi AzaPc). Byla porovnávána fluorescence molekul AzaPc s osmi *terc*-butylsulfanylovými substituenty, osmi *N,N*-diethylaminovými substituenty (viz Obr. č. 5). Součástí této série byly i další deriváty mající tyto substituenty různě nakombinované.



Obr. č. 5: *Terc*-butylsulfanyl substituovaný AzaPc a *N,N*-diethylamino substituovaný AzaPc

Zatímco alkylsulfanylový AzaPc vykazuje poměrně silnou fluorescenci, alkylamino substituovaný AzaPc je díky ICT nefluorescenční. Atomy dusíku na periferii AzaPc totiž působí jako donory pro ICT, elektrony přecházejí na aromatický kruh makrocycly (slouží jako akceptor pro ICT), který je s periferními dusíky v konjugaci. U alkylaminových AzaPc tak dochází k relaxaci molekuly z excitovaného stavu do základního stavu bez vyzáření fotonu. V této práci bylo mimo jiné i zjištěno, že účinnost ICT je přímo úměrná počtu periferních dusíkových atomů¹⁰.

Ve srovnání s ICT se PET u molekul AzaPc jeví jako výrazně slabší cesta relaxace excitovaných stavů, což bylo patrné na částečně zachovaných výtěžcích fluorescence u modelových sloučenin porovnávajících PET vs. ICT¹¹.

4.4. Alkylamino substituované azaftalocyaniny jako „dark quenchery“

Díky silnému ICT ději mají alkylamino substituované AzaPc velký potenciál ve využití v DNA hybridizačních metodách. V dnešní době je využíváno převážně dvojité značených DNA sond. Jedná se o jednořetězcové oligonukleotidy se dvěma navázanými barvivy – fluoroforem na 5' konci oligonukleotidu a zhášedčem na 3' konci oligonukleotidu.

Molekula zhášeece zháší fluorescence fluoroforu prostřednictvím FRET. Následkem hydrolýzy dochází k uvolnění fluoroforu a ten se tak dostává do větší vzdálenosti od zhášeece. Tím dochází k detekci fluorescence¹².

Tzv. „**dark quenchery**“ jsou moderní typy zhášeečů, které se vyznačují tím, že nemají žádnou vlastní fluorescence. Absorbovanou energii nevyzařují ve formě fotonu, nýbrž např. ve formě tepelného záření. Tato vlastnost umožňuje zvýšení citlivosti DNA hybridizačních metod, neboť na rozdíl od běžných zhášeečů nesnižují poměr signál/šum pozadí¹³.

Jako „dark quenchery“ se ukázaly být vhodné právě alkylamino substituované AzaPc. Jedná se o makromolekulární sloučeniny - modifikované ftalocyaniny, které mají některé methinové skupiny v benzenových jádrech nahrazeny atomy dusíku a na periferii nesou diethylaminové substituenty.

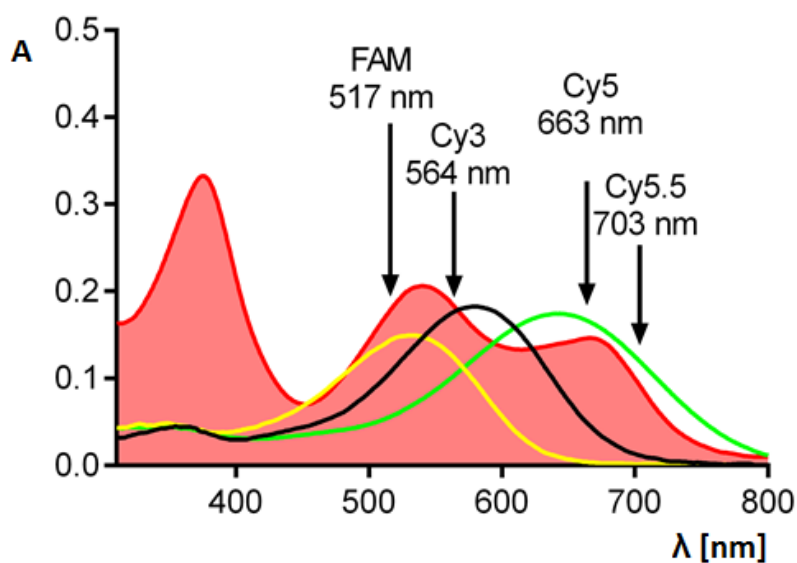
Diethylaminové substituenty jsou dostatečně objemné na to, aby zabraňovaly agregaci, která je typická pro planární sloučeniny. Agregace sloučenin zhoršuje především izolaci, čištění a rozpustnost, proto není žádoucím jevem. Navíc mění významně i fotofyzikální vlastnosti molekuly, neboť agregované AzaPc nevykazují fluorescence nezávisle na periferní substituci, tedy i v případě, že AzaPc neobsahuje žádný donor pro ICT. Terciální dusík v periferních substituentech AzaPc je silným donorem pro ICT, díky němuž dochází k nezářivému přechodu molekul do základního stavu a můžeme tak tyto sloučeniny označit jako „dark quenchery“¹⁴. Proto, aby AzaPc mohl sloužit jako dark quencher, je nutná přítomnost čtyř a více takovýchto donorů pro ICT. V případě tří a méně N-donorů pro ICT lze tento děj blokovat vnějšími podmínkami a takovéto sloučeniny jsou studovány jako fluorescenční senzory^{15,16}.

Možnost využití alkylamino substituovaných AzaPc jako zhášeečů fluorescence ze skupiny dark quencherů a jejich využití v DNA sondách byla popsána naší výzkumnou skupinou v několika publikacích^{14,17,18} a jednom patentu¹⁹.

Byla popsána možnost připojení AzaPc jak na 3', tak na 5' konec sondy¹⁷. Výhodou alkylamino substituovaných AzaPc je kromě již zmíněného také schopnost tvořit heterodimery s různými fluorofory, navíc mají tyto AzaPc zhášeece velice široké absorpční spektrum (300-750 nm), které pokrývá emisní spektrum většiny v praxi užívaných fluoroforů a zajišťuje tak velkou univerzálnost těchto zhášeečů (viz Obr. č. 6). V jedné z publikací byla pomocí DNA hybridizačních esejí porovnána účinnost zhášení

s fluorofory ze skupiny indocyaninových barviv (Cy3, Cy3.5, Cy5 a Cy5.5), fluoresceinem a 6-hexachlorfluoresceinem (pokrývající emisi v rozmezí 517-703 nm; viz Obr. č. 6), kde ve všech případech byla účinnost zhášení sond s AzaPc vyšší než 96 %¹⁴.

Bylo demonstrováno, že AzaPc jsou schopny zhášet fluorescenci jak pomocí dynamického, tak pomocí statického zhášení. Z hlediska účinnosti zhášení jsou AzaPc buď srovnatelné nebo lepší ve srovnání s komerčně používanými zhášeci fluorescence jako Black Hole Quenchers (BHQ-1 a BHQ-2) nebo Blackberry Quenchers (BBQ-650)¹⁷.



Obr. č. 6: Absorpční spektra: AzaPc (červeně), BHQ-1 (žlutě), BHQ-2 (černě), BBQ-650 (zeleně); příklady fluoroforů a jejich emisní maxima: fluorescein (FAM), cyaninová barviva (Cy3, Cy5, Cy5.5); A značí absorbanci, λ vlnovou délkou (převzato a upraveno z KOPECKY, K., NOVAKOVA, V., MILETIN, M., KUCERA, R., ZIMCIK, P. Synthesis of new azaphthalocyanine dark quencher and evaluation of its quenching efficiency with different fluorophores. *Tetrahedron*, 2011, **67**(33), 5956-5963)

5. ZADÁNÍ – CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE

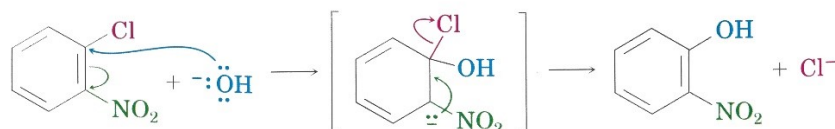
Cílem práce bude především příprava prekurzorů, optimalizace jejich syntézy a případně jejich použití pro následnou cyklotetramerizaci za vzniku odpovídajícího nesymetrického AzaPc. Tento AzaPc ponese funkční skupiny (dvě hydroxylové skupiny) vhodné k navázání doprostřed DNA sondy. Zároveň ponese i esterovou skupinu, která umožní navázání interkalátoru, tedy ploché molekuly sloužící ke zpevnění vazby celé DNA sondy. Cílový AzaPc bude současně substituován šesti alkylaminovými substituenty, které umožní molekule relaxovat z excitovaných stavů pomocí ICT, díky kterému bude fungovat jako tzv. dark quencher. Prekurzory obsahující tyto alkylaminové substituenty budou připraveny ve dvou variantách tak, aby poskytly odpovídající nesymetrické AzaPc lišící se hydrofilním/hydrofobním chováním celé finální molekuly AzaPc.

6. METODICKÁ ČÁST

6.1. Nukleofilní aromatická substituce

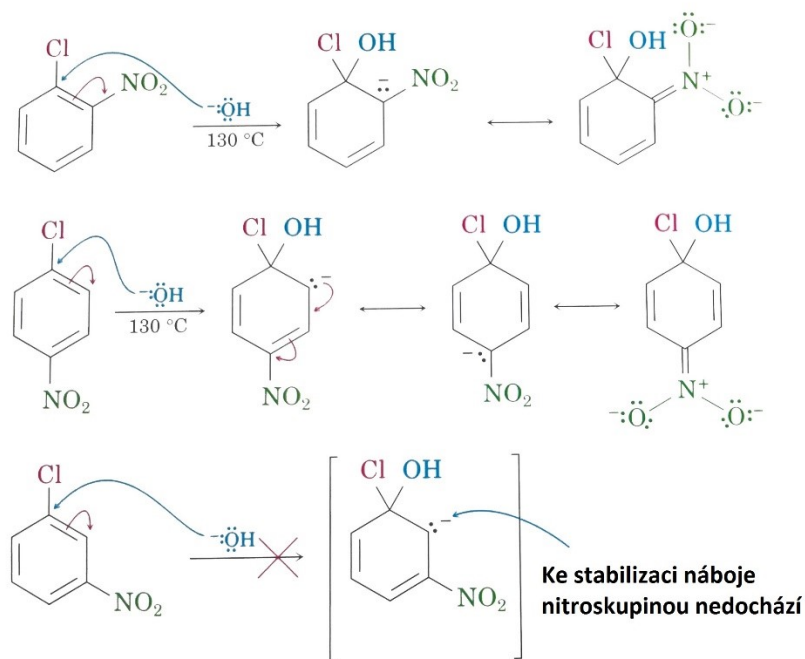
Nukleofilní aromatickou substitucí se rozumí náhrada substituentu vázaného na aromatickém jádře za nukleofilní částici²⁰. Za normálních okolností aromatické substituce probíhají mechanismem elektrofilním. Výjimkou jsou arylhalogenidy s elektron-akceptorními substituenty (např. kyan, nitro, karbonylové substituenty) v polohách ortho a/nebo para, u nichž nukleofilní aromatická substituce probíhá poměrně snadno²¹.

Nukleofilní aromatická substituce u těchto sloučenin probíhá tzv. adičně-eliminacním mechanismem (viz Obr. č. 7), kdy v první fázi nukleofilní částice napadá elektron-deficitní jádro, dochází k adici nukleofilu na aromatický kruh a vzniká tzv. Meisenheimerův adukt (intermediární karbanion). V druhé fázi pak dochází k eliminaci halogenidového aniontu²¹.



Obr. č. 7: Adičně-eliminacní mechanismus (převzato a upraveno z MCMURRY, J. *Organická chemie*. 1. vydání. Praha: VŠCHT Praha, 2007. 1270 s. ISBN 978-80-7080-637-1)

Podmínkou této reakce je přítomnost aktivujících (elektron-akceptorních) substituentů vázaných na jádře v poloze ortho a/nebo para vzhledem k halogen substituentu, přičemž platí pravidlo, že čím více je takových substituentů v polohách ortho a/nebo para, tím rychleji reakce probíhá. Substituenty v poloze meta nejsou schopny stabilizovat vzniklou rezonanční strukturu intermediárního karbaniontu, proto tyto reakce neprobíhají (viz Obr. č. 8)²¹.

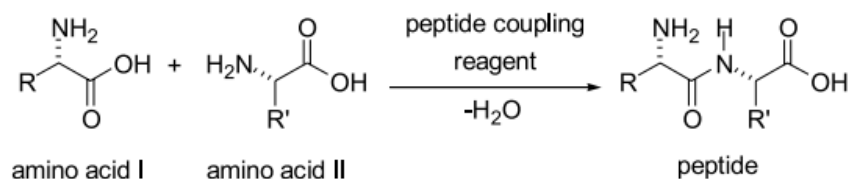


Obr. č. 8: Rezonanční stabilizace v poloze ortho, para, meta (převzato a upraveno z MCMURRY, J. *Organická chemie*. 1. vydání. Praha: VŠCHT Praha, 2007. 1270 s. ISBN 978-80-7080-637-1)

Nukleofilní aromatická substituce může za určitých reakčních podmínek probíhat i u arylhalogenidů bez aktivujících elektron-akceptorních skupin²¹, nicméně pro porozumění metodice této diplomové práce je důležitý především výše zmíněný mechanismus.

6.2. Vybraná couplingová reakční činidla využívaná k tvorbě amidické vazby

Peptidová couplingová reakční činidla jsou sloučeniny používané v organické chemii při „amine to amide“ reakcích (viz Obr. č. 9). Hrají stěžejní roli při tvorbě amidické vazby mezi aminokyselinami a/nebo peptidy v syntéze peptidů. Jejich úkolem je především aktivace karboxylové skupiny pro reakci s aminoskupinou²².



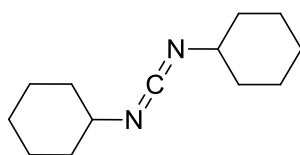
Obr. č. 9: Obecné schéma syntézy peptidů využívající couplingového reakčního činidla²³

Couplingová reakční činidla umožňují provádění couplingových reakcí v jediném kroku bez nutnosti předchozí aktivace kyselin. Jejich hlavní výhody spočívají v rychlé *in situ* aktivaci, minimu vedlejších reakcí, komerční dostupnosti, stabilitě, rozpustnosti v širokém spektru rozpouštědel včetně vody a snadno odstranitelných vedlejších produktech reakcí²³.

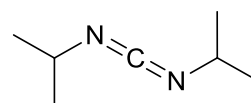
Typický průběh couplingových reakcí je tedy v prvním kroku aktivace karboxylové skupiny pomocí zvoleného couplingového reakčního činidla a poté nukleofilní atak aminoskupiny²⁴.

Dle struktury reakčních činidel jsou rozlišovány karbodiimidy, fosfoniové a uroniové soli²².

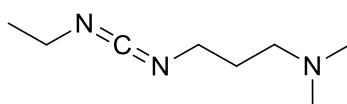
6.2.1. Karbodiimidy



DCC (*N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimide)



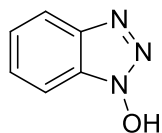
DIC (*N,N'*-Diisopropylcarbodiimide)



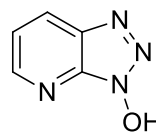
EDCI (*N*-(3-Dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylcarbodiimide)

Obr. č. 10: Příklady couplingových reakčních činidel ze skupiny karbodiimidů

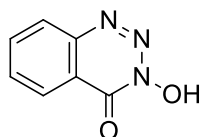
Struktury nejčastěji používaných karbodiimidů jsou znázorněny na Obr. č. 10. Při použití karbodiimidů je doporučováno použití aditiv, jako jsou 1-hydroxybenzotriazol, hydroxy-3,4-dihydro-4-oxo-1,2,3-benzo-triazin, 1-hydroxy-7-aza-1*H*-benzotriazol (viz Obr. č. 11) a jiná, která zvyšují reaktivitu a navíc minimalizují vedlejší reakce (vznik epimerů)²².



HOBT (1-Hydroxybenzotriazole)



HOAt (1-Hydroxy-7-aza-1*H*-benzotriazole)

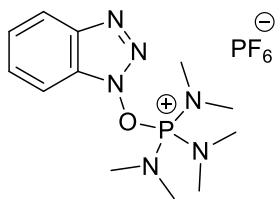


HOOBT (Hydroxy-3,4-dihydro-4-oxo-1,2,3-benzotriazine)

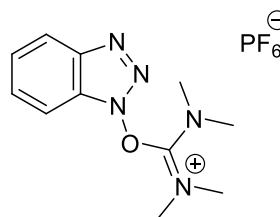
Obr. č. 11: Příklady používaných aditiv

6.2.2. Fosfoniové a uroniové soli

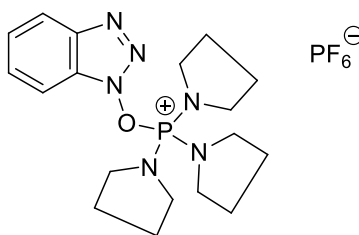
Příklady couplingových reakčních činidel ze skupiny fosfoniových solí a skupiny uroniových solí jsou znázorněny na Obr. č. 12).



BOP (Benzotriazol-1-yloxy-tris(dimethylamino)-phosphonium hexafluorophosphate)



HBTU (2-(1*H*-Benzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethylaminium hexafluorophosphate)

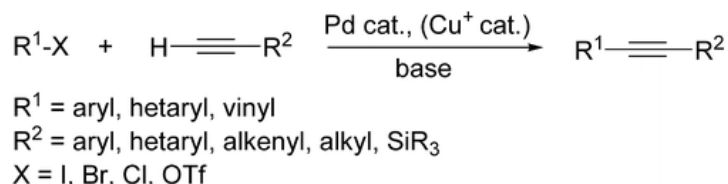


PyBOP (Benzotriazol-1-yloxy-tris(dimethylamino)-phosphonium hexafluorophosphate)

Obr. č. 12: Příklady couplingových reakčních činidel ze skupiny fosfoniových solí (BOP, PyBOP) a uroniových solí (HBTU)

6.3. Sonogashira coupling

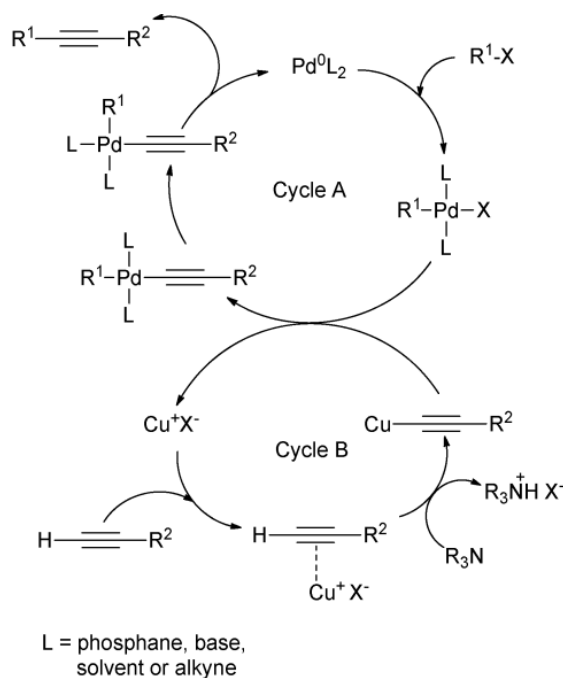
Sonogashirova reakce (Sonogashira coupling) byla poprvé popsána v *Tetrahedron Letters* v roce 1975²⁵ a stala se jednou z nejčastěji používaných tzv. cross-couplingových reakcí pro tvorbu vazby $sp-sp^2$. Jedná se o reakce terminálních alkynů s alkenyl případně aryl halogenidy (viz Obr. č. 13). Tyto reakce jsou katalyzovány palladiovými komplexy, jako kokatalyzátory se uplatňují měďné soli. Sonogashirovy reakce vyžadují také přítomnost baze (zejména sekundární a terciární aminy) sloužící zároveň jako reakční prostředí²⁶.



Obr. č. 13: Obecné schéma Sonogashirovy reakce²⁷

Základ Sonogashirově reakci položili Heck a Cassar, kteří nezávisle na sobě popsali stejnou reakci, avšak bez měďné soli jako kokatalyzátoru. Přidání měďné soli do reakce umožnilo urychlení reakce a průběh při pokojové teplotě²⁶.

Vzhledem k obtížnosti izolace vznikajících reakčních intermediátů není kompletní mechanismus reakce objasněn²⁷.



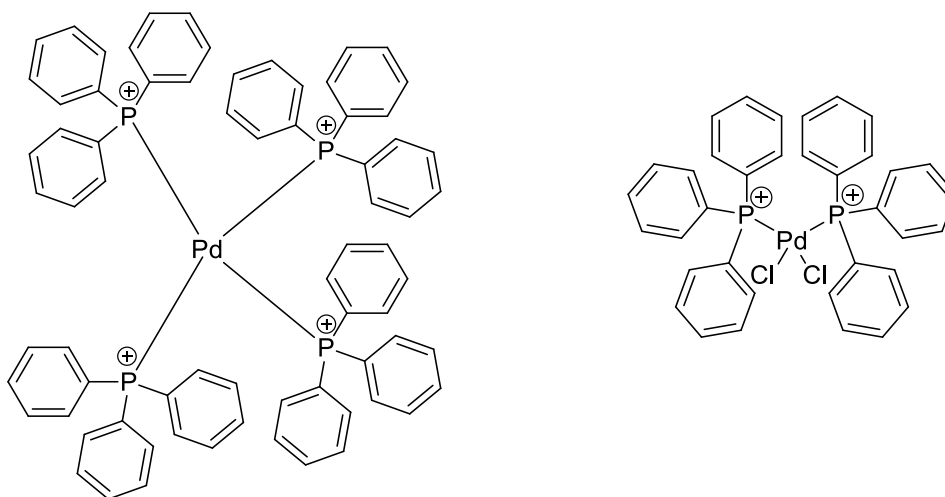
Obr. č. 14: Mechanismus Sonogashirovy reakce – palladiový (cyklus A) a měďný cyklus (cyklus B)²⁶

Dle obecně přijímané teorie probíhá Sonogashirova reakce ve dvou cyklech (viz Obr. č. 14) – palladiovém cyklu (cyklus A) a cyklu mědi (cyklus B). Na začátku palladiového cyklu dochází k redukci palladnatého komplexu na aktivní palladiový katalyzátor, poté následuje oxidativní adice R^1-X na aktivní katalyzátor [Pd^0L_2]. Další krok je propojen s cyklem mědi. Zde dochází k transmetalaci z acetylidu měďného na komplex

$[Pd^{(II)}L_2R^1(C \equiv CR^2)]$. Následuje cis/trans izomerizace, reduktivní eliminace, která poskytne požadovaný produkt $R^1C \equiv CR^2$, a cyklus se uzavře regenerací palladiového katalyzátoru.

Cyklus mědi je na rozdíl od toho palladiového značně neobjasněn. Obecně se však předpokládá, že ke vzniku acetylidu měďného je nutná přítomnost baze²⁶.

Klasické katalyzátory jsou odvozeny od trifenylofosfinu (TPP). Nejběžněji používanými jsou $Pd(PPh_3)_4$ (vznikající často *in situ* reakcí Pd^{II} soli a TPP) a $Pd(PPh_3)_2Cl_2$ ²⁶ (viz Obr. č. 15). Pd^{II} katalyzátory jsou značně stabilnější oproti Pd^0 katalyzátorům a mohou být uchovávány při pokojové teplotě²⁸.



Obr. č. 15: Příklady katalyzátorů $Pd(PPh_3)_4$ a $Pd(PPh_3)_2Cl_2$

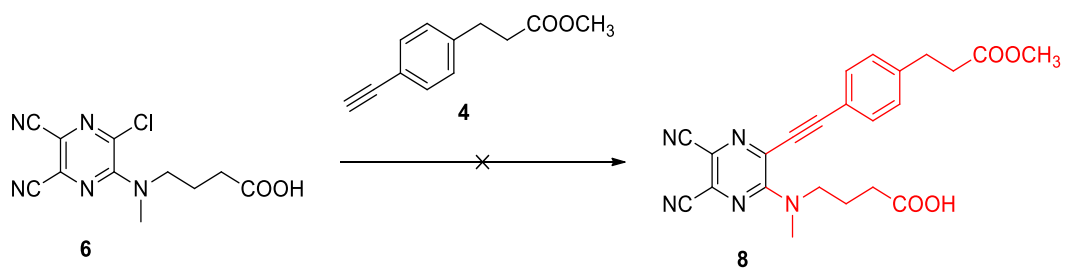
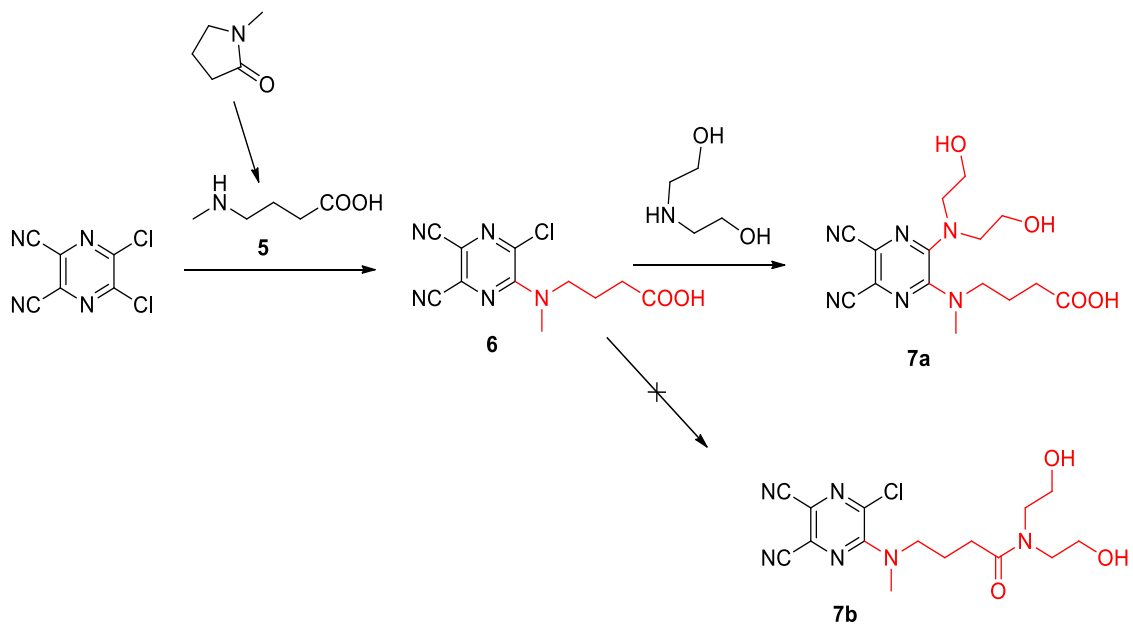
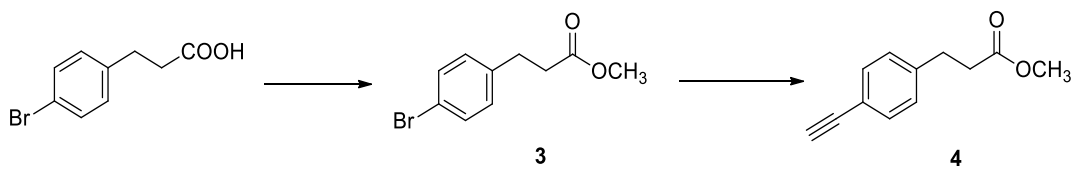
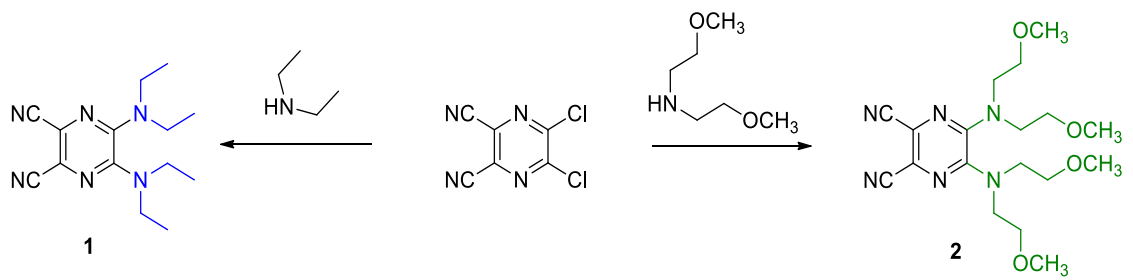
7. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

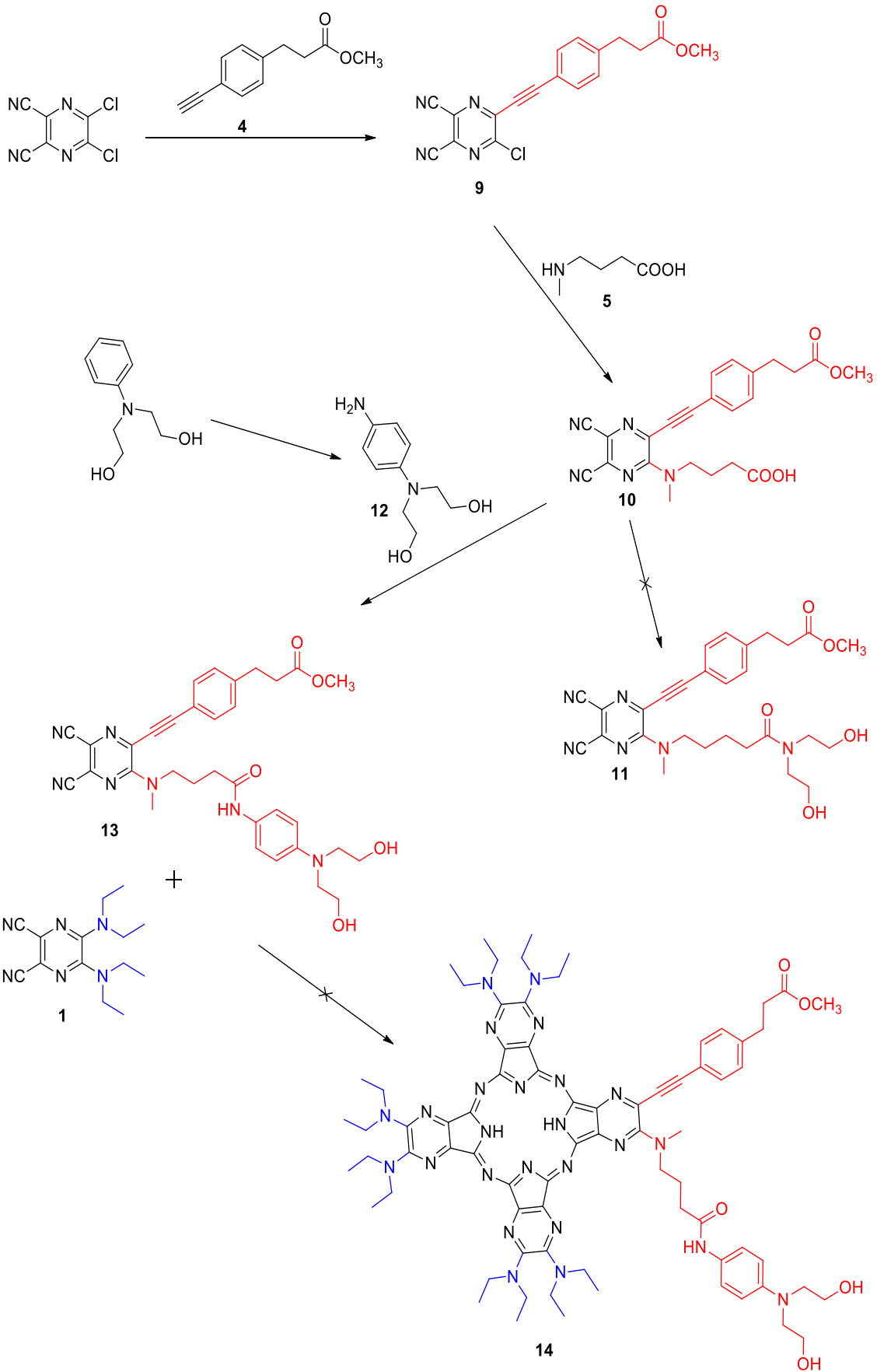
7.1. Chemikálie a přístroje

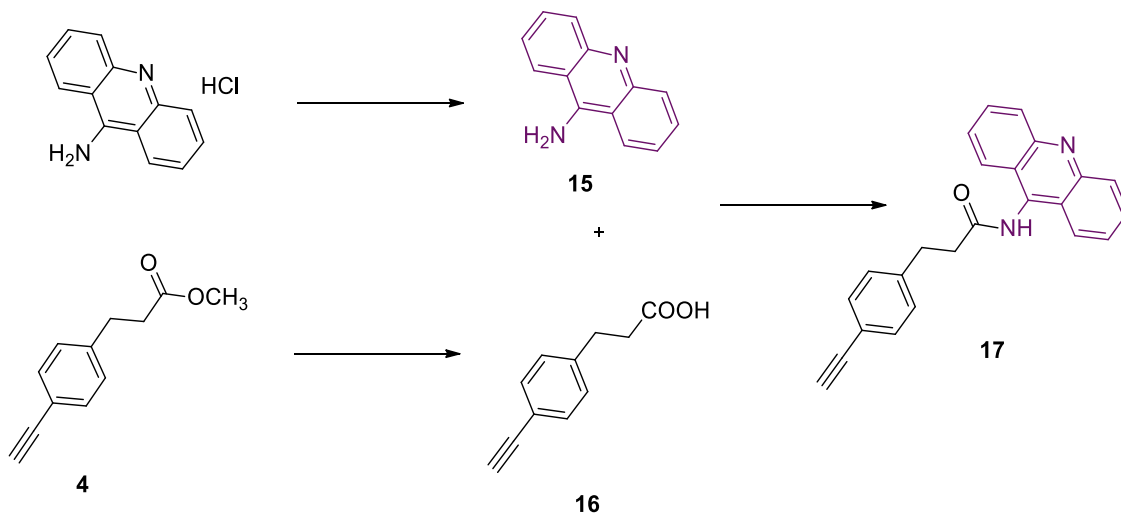
Výchozí látky a rozpouštědla pro reakce byly zakoupeny od firem Lach-Ner, Penta, BDL, Sigma-Aldrich nebo Acros a byly použity bez dalšího čištění do reakcí.

Průběh reakcí a čistota výsledných produktů byly sledovány pomocí tenkovrstvé chromatografie (TLC, z angl. thin layer chromatography) na deskách Merck Kieselgel 60 F254, detekce UV lampou probíhaly při vlnové délce 254 nm nebo 366 nm. Čištění produktů bylo prováděno pomocí sloupcové chromatografie na stacionární fázi Merck Kieselgel 60 (0,040-0,063 mm). Použité mobilní fáze jsou popsány u jednotlivých reakcí. Teploty tání byly měřeny pomocí digitálního přístroje ELECTROTHERMAL IA9200. Infračervená spektra byla měřena IČ spektrofotometrem Nicolet 6700 v ATR módu na Katedře anorganické a organické chemie. $^1\text{H-NMR}$ a $^{13}\text{C-NMR}$ spektra byla měřena na přístroji VNMR S500 NMR spectrometer na Katedře anorganické a organické chemie. MS (APCI) bylo měřeno na přístroji Agilent 500 Ion Trap LC/MS (Agilent Technologies, Santa Clara, California, USA) po rozpuštění vzorku v MeOH a přímém nástřiku na detektor. Elementární analýza byla provedena pomocí přístroje Vario Micro Cube Elemental Analyzer (Elementar Analysensysteme GmbH, Hanau, Germany).

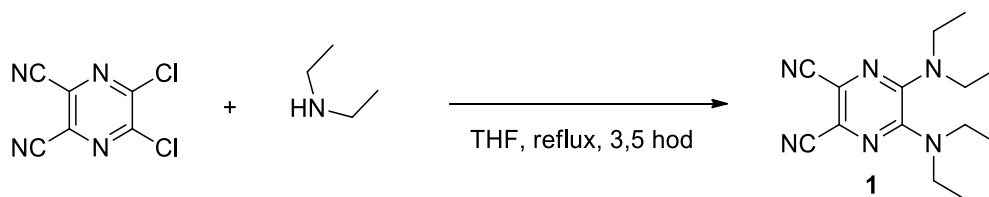
7.2. Schéma prováděných reakcí







7.3. Příprava 5,6-bis(dimethylamino)-pyrazin-2,3-dikarbonitrilu (**1**)

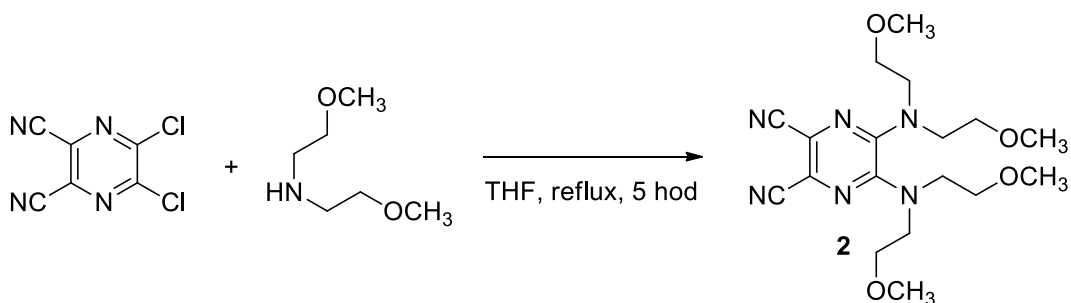


Příprava sloučeniny **1** byla založena na postupu popsaném již dříve v literatuře²⁹.

5,6-dichloropyrazin-2,3-dikarbonitril (2,50 g, 0,013 mol) byl rozpuštěn v tetrahydrofuranu (THF, 150 ml). Za stálého míchání byl po kapkách přidáván diethylamin (5,60 g, 0,077 mol). Směs se nejprve zbarvila červeně, poté hnědožlutě. Reakční směs byla zahřívána při teplotě varu rozpouštědla po dobu 3,5 hod. Průběh reakce byl sledován pomocí TLC s mobilní fází hexan/ethyl-acetát (EAC) v poměru 4:1. Po ukončení reakce byla směs ochlazená pod tekoucí vodou a vysrážená sůl (čistě bílý hydrochlorid diethylaminu) byla odfiltrována. Filtrát byl odpařen do sucha na rotační vakuové odparce a následně byl produkt třikrát překrytalizován z methanolu (MeOH). Krystaly sloučeniny **1** (frakce 1) byly vysušeny do sucha pomocí sušící pistolé. Matečné roztoky z krystalizace (frakce 2) byly spojeny, odpařeny do sucha a přečištěny sloupcovou chromatografií za použití mobilní fáze hexan/EAC 4:1 (retenční faktor, $R_f=0,33$ produktu). Frakce obsahující čistý produkt byly spojeny, odpařeny do sucha, krystaly byly vysušeny v sušící pistolé a přidány k frakci 1.

Vzhled: žlutá třpytivá krystalická látka. Výtěžek: 2,45 g (72 %). Molekulová hmotnost: 216,25. Teplota tání: 91,5-92,9 °C. ¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ_H 1,08 (12H, t, $J = 7$ Hz, CH₃); 3,49 ppm (8H, q, $J = 7$ Hz, CH₂). ¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz): 146,1; 120,3; 115,0; 42,8 a 12,7 ppm. Ostatní naměřená analytická data odpovídají publikovaným hodnotám.

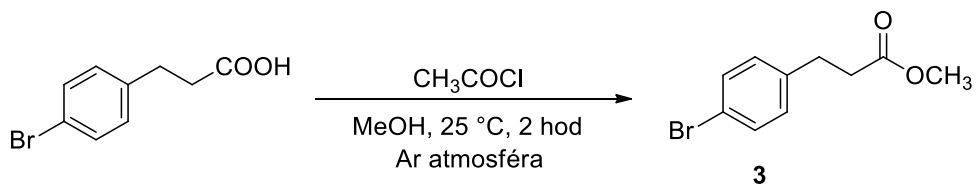
7.4. Příprava 5,6-bis((2-methoxyethyl)amino)pyrazin-2,3-dikarbonitrilu (2)



5,6-dichloropyrazin-2,3-dikarbonitril (3,00 g, 0,015 mol) byl rozpuštěn v THF (70 ml). Za stálého míchání byl přikapáván bis(2-methoxyethyl)amin (13,26 ml, 0,090 mol). Směs byla zahřívána 5 hod při teplotě varu rozpouštědla. Průběh reakce byl sledován pomocí TLC s mobilní fází hexan/EAC 4:1. Po ukončení reakce byl produkt ochlazen pod tekoucí vodou, zahuštěn odpařením části rozpouštědla na rotační vakuové odparce a následně vytřepán ve směsi EAC/destilovaná voda. Organické fáze obsahující produkt byly spojeny, vysušeny bezvodým síranem sodným, zfiltrány přes skládaný filtr a odpařeny do sucha. Produkt byl následně přečištěn pomocí sloupcové chromatografie s mobilní fází EAC/aceton 10:1 ($R_f=0,72$ produktu). Frakce s čistým produktem byly spojeny, odpařeny do sucha. Produkt byl překrytalizován z MeOH a vysušen v sušící pistolí. U matečného roztoku byla krystalizace zopakována a po vysušení v sušící pistolí byly obě frakce spojeny.

Vzhled: oranžová krystalická látka. Výtěžek: 5,85 g (99 %). Molekulová hmotnost: 392,46. Teplota tání: 71,0-72,2 °C. $^1\text{H-NMR}$ (aceton- d_6 , 500 MHz): δ_{H} 3,18 (12H, s, CH_3); 3,47 (8H, t, $J = 5$ Hz, OCH_2) a 3,81 ppm (8H, t, $J = 5$ Hz, NCH_2). $^{13}\text{C-NMR}$ (aceton- d_6 , 125 MHz): 148,2; 120,3; 116,1; 70,5; 58,6 a 49,3 ppm. IČ (ATR, cm^{-1}): 2933, 2895, 2836, 2221 (CN), 1541, 1514, 1492, 1430, 1353, 1290, 1243, 1223, 1201, 1191, 1109, 1066, 1018, 1003, 991, 958 a 867. Elementární analýza: nalezeno (%): C 55,76; H 7,56; N 21,79; vypočteno pro $\text{C}_{18}\text{H}_{28}\text{N}_6\text{O}_4$ (%): C 55,09; H 7,19; N 21,41.

7.5. Příprava methylesteru kyseliny 3-(4-bromfenyl)propanové (**3**)

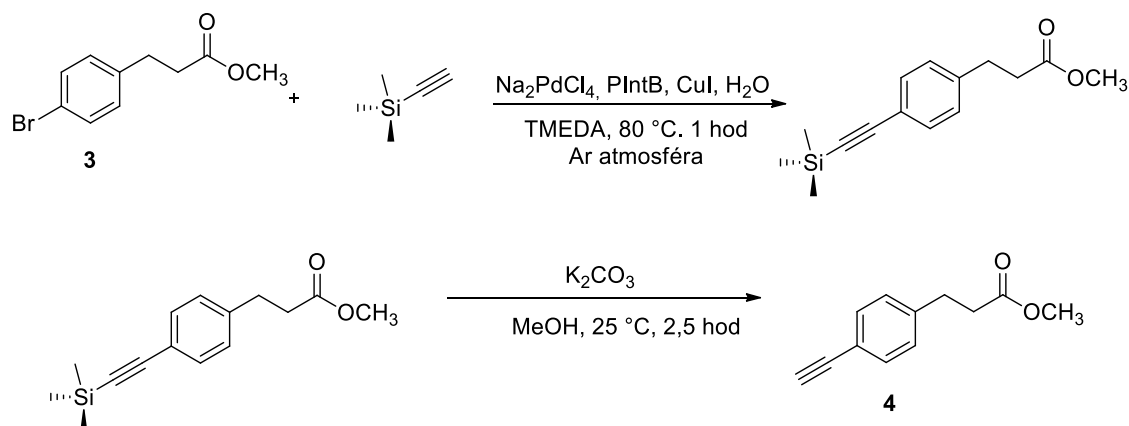


Příprava sloučeniny **3** byla založena na postupu popsaném již dříve v literatuře³⁰. Laboratorní sklo bylo předem důkladně vysušeno v sušárně. Reakce byla prováděna v argonové atmosféře.

Do dvouhrdlé baňky byl přidán bezvodý MeOH (60 ml). Soustava byla ochlazena v ledové lázni na $0\text{ }^\circ\text{C}$. Za stálého míchání při téže teplotě byl pomalu přikapán acetylchlorid (5,6 ml, 0,066 mol). Po 10 minutách byla za stejných reakčních podmínek přidána kyselina 3-(4-bromfenyl)propanová (5,46 g, 0,024 mol). Směs byla míchána při pokojové teplotě po dobu 2 hodin. Průběh reakce byl sledován pomocí TLC s mobilní fází EAC ($R_f=0,88$ produktu). Po ukončení reakce bylo rozpouštědlo odpařeno na rotační vakuové odparce, směs byla rozpuštěna v MeOH a opět odpařena do sucha (odpařen nezreagovaný acetylchlorid). Tento postup byl ještě jednou zopakován a produkt byl bez dalšího čištění použit do další reakce.

Vzhled: světle žlutá olejnatá látka. Výtěžek: 5,72 g. Molekulová hmotnost: 243,10. Naměřená analytická data odpovídají publikovaným hodnotám.

7.6. Příprava methylesteru kyseliny 3-(4-ethynylfenyl)propanové (4)



Příprava sloučeniny **4** byla založena na postupu popsaném již dříve v literatuře³⁰. Reakce byla prováděna v argonové atmosféře.

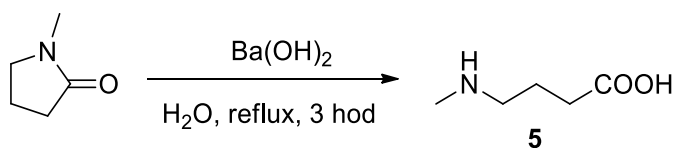
Do baňky se zpětným chladičem byla navážena sloučenina **3** (5,72 g, 0,024 mol) spolu s reakčními katalyzátory: Na_2PdCl_4 (66 mg, 0,023 mmol), 2-(di-*tert*-butylfosfino)-1-fenylindol (PIntB, 156 mg, 0,462 mmol), CuI (87 mg, 0,458 mmol). Poté byla ke směsi přidána voda (4,8 ml) a tetramethylethyldiamin (TMEDA, 42,3 ml, 0,283 mol). Soustava byla probublána argonem a několikrát střídavě evakuována a naplněna argonem. Reakční směs byla zahřáta na $70\text{ }^\circ\text{C}$. Následně byl přidán trimethylsilylacetylen (6,6 ml, 0,046 mol) a reakční teplota byla zvýšena na $80\text{ }^\circ\text{C}$. Průběh reakce byl sledován pomocí TLC s mobilní fází hexan/EAC v poměru 10:1 ($R_f=0,48$ produktu). Po 1 hodině byla reakce ukončena a ponechána stát při pokojové teplotě. Po vychladnutí byla směs smíchána s destilovanou vodou a třikrát vytřepána s EAC. Pro lepší oddělení fází byl použit nasycený roztok chloridu sodného (brine). Organické fáze byly spojeny a vysušeny bezvodým síranem sodným. Směs byla přefiltrována přes skládaný filtr a zahuštěna na rotační vakuové odparce.

K tmavě hnědé viskózní kapalině byl přidán roztok K_2CO_3 (6,48 g, 0,047 mol) v MeOH (232 ml). Směs byla intenzivně míchána 2,5 hodiny při pokojové teplotě. Průběh reakce byl sledován pomocí TLC s mobilní fází hexan/EAC v poměru 10:1. Po ukončení reakce byla směs opět smíchána s destilovanou vodou a několikrát vytřepána s EAC. Opět byl

použit brine. Spojené organické fáze byly vysušeny bezvodým síranem sodným, přefiltrovány a zakoncentrovány na rotační vakuové odparce. Produkt byl přečištěn pomocí sloupcové chromatografie s mobilní fází hexan/EAC v poměru 10:1. Frakce obsahující čistý produkt byly spojeny a odpařeny do sucha.

Vzhled: hnědá olejnatá látka. Výtěžek: 2,09 g (47 %, počítáno z methyl-3-(4-bromfenyl)propanoátu (**3**) jako výchozí látky). Molekulová hmotnost: 188,23. $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz): δ_{H} 2,63 (2H, t, $J = 8$ Hz, CH_2CO); 2,96 (2H, t, $J = 8$ Hz, CH_2Ar); 3,05 (1H, s, CH); 3,67 (3H, s, OCH_3); 7,16 (2H, d, $J = 8$ Hz, ArH) a 7,42 ppm (2H, d, $J = 8$ Hz, ArH). $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 125 MHz): 173,0; 141,4; 132,2; 128,3; 120,0; 83,5; 51,6; 35,3 a 30,7 ppm. Ostatní naměřená analytická data odpovídají publikovaným hodnotám.

7.7. Příprava *N*-methyl- γ -aminomáselné kyseliny (**5**)

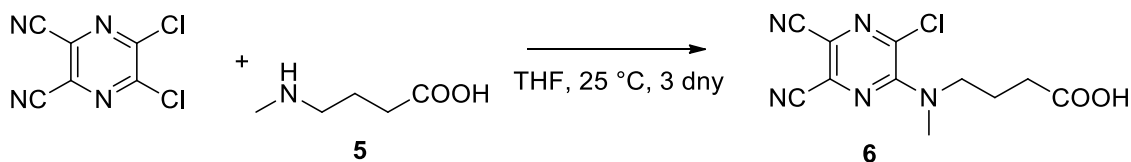


Příprava sloučeniny **5** byla založena na postupu popsáném již dříve v literatuře³¹.

K *N*-methyl-2-pyrrolidonu (10 ml, 0,104 mol) byly přidány destilovaná voda (110 ml) a $\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ (22,80 g, 0,072 mol). Směs byla zahřívána při teplotě varu rozpouštědla po dobu 3 hodin. Po ukončení reakce byla směs ochlazena v ledové lázni na 0°C a poté probublána oxidem uhličitým a zfiltrována. Filtrát byl odpařen do sucha na rotační vakuové odparce. Produkt reakce byl rozpuštěn v ethanolu (EtOH , $\text{Ba}(\text{OH})_2$ v EtOH nerozpustný) a zfiltrován přes celit. Po odpaření do sucha byl tento krok zopakován a čistý produkt byl znovu odpařen do sucha.

Vzhled: bílá kluzká pevná látka. Výtěžek: 6,68 g (55 %). Molekulová hmotnost: 117,15. Naměřená analytická data odpovídají publikovaným hodnotám.

7.8. Příprava 4-[(3-chloro-5,6-dikyanopyrazin-2-yl)methyl]amino]butanové kyseliny (**6**)



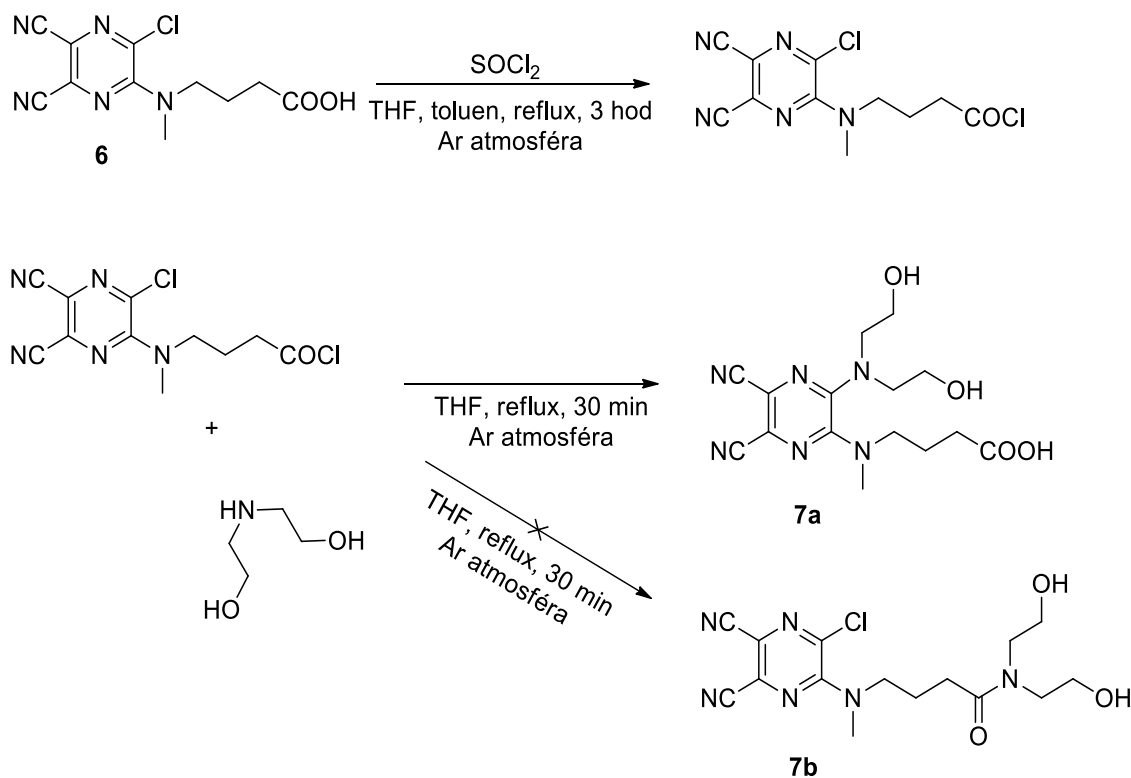
Příprava sloučeniny **6** byla založena na postupu popsáném již dříve v literatuře¹⁴.

Směs 5,6-dichlorpyrazin-2,3-dikarbonitrilu (2,00 g, 0,010 mol) a sloučeniny **5** (2,50 g, 0,021 mol) v THF (100 ml) byla míchána při pokojové teplotě po dobu 3 dnů. Průběh reakce byl sledován pomocí TLC s mobilní fází EAC/acetón v poměru 10:1 ($R_f=0,46$ produktu). Po ukončení reakce byla směs zfiltrována a odpařena do sucha na rotační vakuové odparce. Poté byla směs přečištěna pomocí sloupcové chromatografie s mobilní fází hexan/EAC/kyselina octová v poměru 6:3:1. Frakce obsahující čistý produkt byly spojeny. Produkt (žlutá olejnatá látka) byl přesrážen z EtOH s přidavkem destilované vody. Produkt byl následně vysušen za pomoci sušící pistole při teplotě 78 °C.

Vzhled: žlutá krystalická látka. Výtěžek: 1,90 g (68 %). Molekulová hmotnost: 279,68. Teplota tání: 96,6-97,0 °C (z EtOH/voda). ¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ_H 2,06 (2H, p, $J = 7$ Hz, CH₂CH₂CH₂); 2,45 (2H, t, $J = 7$ Hz, CH₂COOH); 3,39 (3H, s, NCH₃), 3,71 (2H, t, $J = 7$ Hz, NCH₂) a 9,60 ppm (1H, br s, COOH). ¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz): 178,6; 152,1; 135,5; 129,2; 118,3; 113,0; 112,8; 52,2; 39,7; 30,8 a 22,0 ppm. IČ (ATR, cm⁻¹): 2932, 2227 (CN), 1709, 1556, 1514, 1487, 1441, 1421, 1391, 1353, 1265, 1226, 1199, 1182, 1122, 1047, 1024, 993, 949, 910 a 786. Ostatní naměřená analytická data odpovídají publikovaným hodnotám.

7.9. Příprava dihydroxyethylamidu kyseliny 4-[(3-chlor-5,6-dikyan-pyrazin-2-yl)methyl]amino]butanové (7)

Postup č. 1



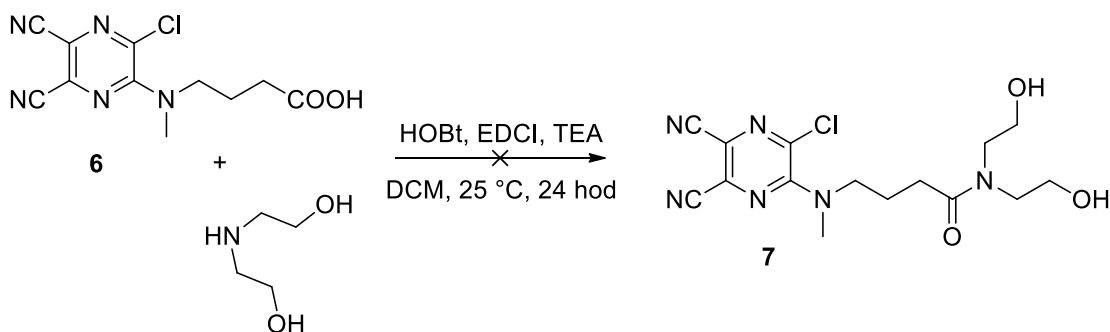
Sloučenina **6** (100 mg, 0,358 mmol) byla rozpuštěna v bezvodém THF (3 ml) pod ochrannou argonovou atmosférou. Poté byl přidán SOCl_2 (260 μl , 3,572 mmol) v bezvodém toluenu. Směs byla za stálého míchání zahřívána při 120 °C po dobu 3 hodin. Po ukončení reakce byla reakční směs důkladně odpařena na rotační vakuové odparce za účelem odstranění přebytečného SOCl_2 a rozpouštědel.

K produktu předchozí reakce byl přidán bezvodý THF (3 ml) a dihydroxyethylamin (75 μl , 0,787 mmol) v bezvodém THF. Směs byla opět za stálého míchání zahřívána na 120 °C po dobu 30 minut pod argonovou atmosférou. Průběh reakce byl sledován pomocí TLC s mobilní fází hexan/EAC/kyselina octová 6:3:1 ($R_f=0,70$ produktu). Po vychladnutí byla směs vytřepána mezi destilovanou vodou a EAC (3×20 ml). Organické fáze byly spojeny, vysušeny pomocí bezvodého síranu sodného, přefiltrovány a následně

odpařeny na rotační vakuové odparce do sucha. Předpokládaný produkt byl přečištěn pomocí sloupcové chromatografie s mobilní fází hexan/EAC 2:1. NMR analýza nepotvrdila požadovaný produkt **7b**, hlavním produktem reakce byla sloučenina **7a**.

Výtěžek: 44 mg (36 %). Molekulová hmotnost: 348,36. $^1\text{H-NMR}$ (aceton- d_6 , 500 MHz): δ_{H} 1,76 – 1,89 (2H, m, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$); 2,42 – 2,47 (2H, m, CH_2COOH); 3,44 (3H, s, NCH_3); 3,64 – 3,68 (2H, m); 3,85 – 3,89 (2H, m) a 4,09 – 4,15 ppm (2H, m). $^{13}\text{C-NMR}$ (aceton- d_6 , 125 MHz): 173,0; 153,6; 136,7; 130,2; 118,4; 114,6; 114,3; 64,2; 52,3; 46,3; 40,0; 31,7 a 23,2 ppm. IČ (ATR, cm^{-1}): 2942, 2867, 2228 (CN), 1729, 1556, 1445, 1415, 1384, 1248, 1180, 1130, 1040, 925 a 748. MS (MALDI-TOF) m/z : 349,2 $[\text{M}+\text{H}]^+$

Postup č. 2

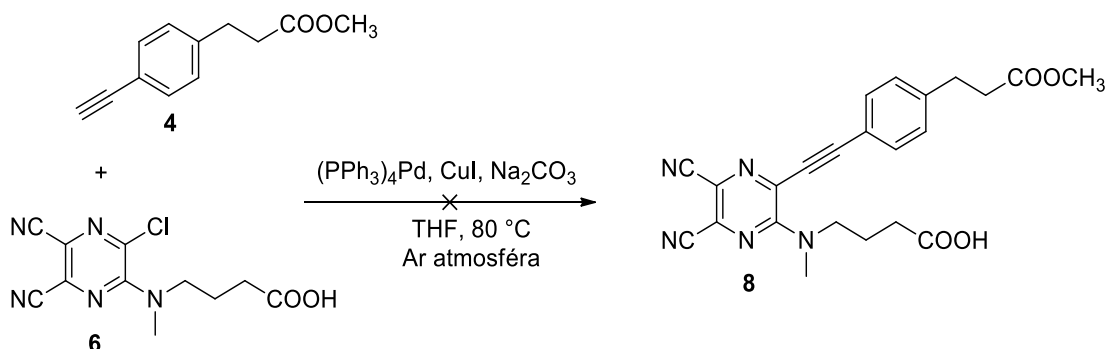


Příprava sloučeniny **7** byla založena na postupu popsaném již dříve v literatuře³².

Směs sloučeniny **6** (300 mg, 1,070 mmol), hydroxybenzotriazolu (HOBt, 145 mg, 1,070 mmol), a triethylaminu (TEA, 150 μl , 1,070 mmol) byla rozpuštěna v dichlormethanu (DCM) a ochlazena na 0 °C za pomoci ledové lázně. Poté byl přidán dihydroxyethylamin (126 μl , 1,280 mmol) a pomalu přikapán 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimid (EDCI, 171 μl , 1,600 mmol). Směs byla míchána po 24 hodin při pokojové teplotě. Průběh reakce byl sledován pomocí TLC s mobilní fází hexan/EAC 1:1 ($R_f=0,40$ produktu). Směs byla následně odpařena do sucha na rotační vakuové odparce a čištěna sloupcovou chromatografií s toutéž mobilní fází. NMR analýza nepotvrdila požadovaný produkt.

7.10. Příprava sloučeniny 8

Postup č. 1



Směs sloučeniny **6** (50 mg, 0,179 mmol), sloučeniny **4** (40 mg, 0,213 mmol), $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ (102 mg, 0,356 mmol), CuI (0,68 mg, 3,570 μmol) byla pod ochrannou argonovou atmosférou rozpuštěna v bezvodém THF (1 ml) a zahřáta na $80\text{ }^\circ\text{C}$. Po dosažení teploty byl přidán $(\text{PPh}_3)_4\text{Pd}$ (6 mg, 5,192 μmol) a reakční směs byla dále zahřívána při $80\text{ }^\circ\text{C}$. Průběh reakce byl sledován pomocí TLC s mobilní fází hexan/EAC/kyselina octová 6:3:1. Reakce byla ukončena po 4 hodinách. Výchozí látky se rozložily bez vzniku viditelného produktu. Pro další postup byly zvoleny striktně bezvodé podmínky.

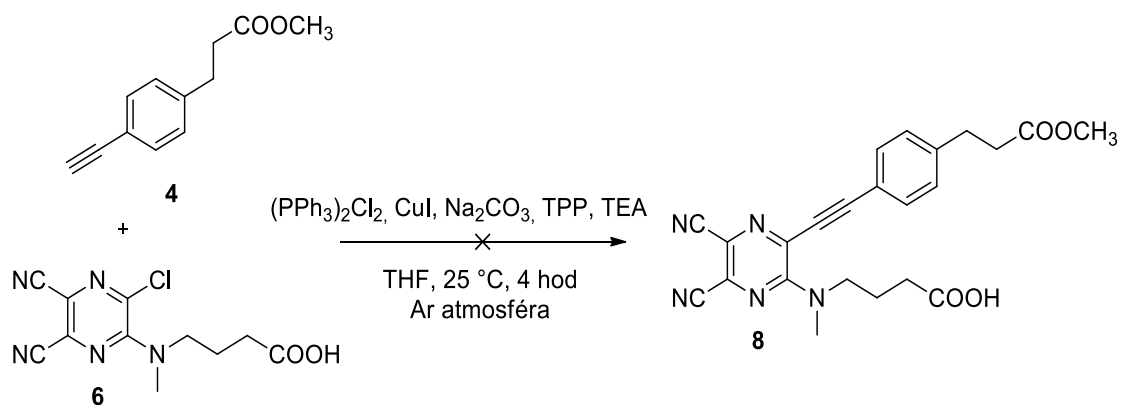
Postup č. 2

Laboratorní sklo bylo předem vysušeno v sušárně. Dvouhrdlá baňka se zpětným chladičem byla naplněna ochrannou argonovou atmosférou. Reakce probíhala ve striktně bezvodých podmínkách v argonové atmosféře.

Směs sloučeniny **6** (50 mg, 0,179 mmol), $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ (102 mg, 0,356 mmol), CuI (0,68 mg, 3,570 μmol) byla pod ochrannou argonovou atmosférou rozpuštěna v bezvodém THF. Sloučenina **4** (40 mg, 0,213 mmol) byla vysušena za sníženého tlaku a rozpuštěna v bezvodém THF (1 ml). Takto připravený roztok byl přidán do reakční směsi. Reakční směs byla zahřáta na $80\text{ }^\circ\text{C}$. Po dosažení teploty byl přidán $(\text{PPh}_3)_4\text{Pd}$ (6

mg, 5,192 μmol) a reakční směs byla dále zahřívána při 80 °C po 12 hodin. Průběh reakce byl sledován pomocí TLC s mobilní fází hexan/EAC/kyselina octová 6:3:1 ($R_f=0,38$ produktu). Po ukončení reakce byla směs odpařena do sucha a čištěna pomocí sloupcové chromatografie s mobilní fází hexan/EAC/kyselina octová 6:3:1. Frakce obsahující předpokládaný produkt (dvě překrývající se skvrny) byly spojeny, odpařeny do sucha. NMR nepotvrdila čistotu produktu. Produkt byl tedy opět čištěn pomocí sloupcové chromatografie, tentokrát s mobilní fází CHCl_3 /aceton/kyselina octová 20:1:1 ($R_f=0,55$ produktu). MS analýza nepotvrdila přítomnost požadovaného produktu.

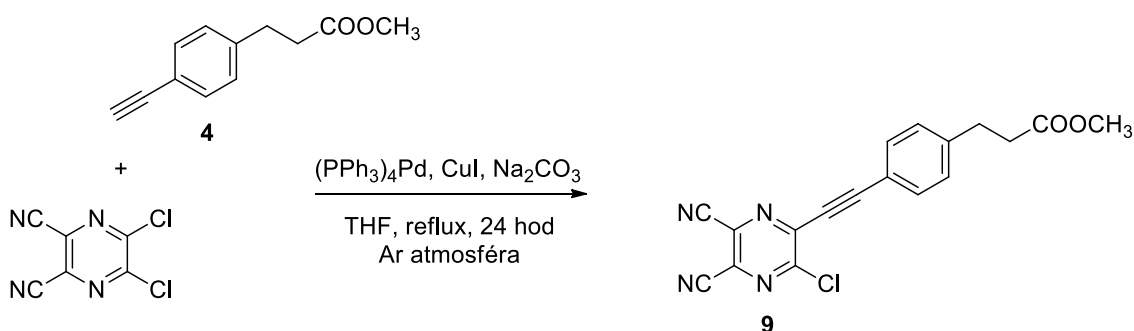
Postup č. 3



Laboratorní sklo bylo předem důkladně vysušeno v sušárně. Reakce byla prováděna v argonové atmosféře. Před zahájením reakce byla soustava několikrát střídavě evakuována a profoukána argonem a následně byla soustava ještě zvenčí vysušena sušící pistolí. Sloučenina **4** (50 mg, 0,266 mmol) byla před uvedením do reakce vysušena na rotační vakuové odparce a rozpuštěna v bezvodém THF. Následně byla k roztoku přidána sloučenina **6** (104 mg, 0,372 mmol), $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$ (152 mg, 0,531 mmol), TPP (1,39 mg, 5,299 mol), CuI (1,01 mg, 5,303 μmol), $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_2\text{Cl}_2$ (1,86 mg, 2,650 μmol). Směs byla míchána při pokojové teplotě. Po 1 hodině byl přidán TEA (300 μl , 2,151 mmol). Průběh reakce byl sledován pomocí TLC s mobilní fází hexan/EAC/kyselina octová 6:3:1 ($R_f=0,36$ produktu). Reakce byla ukončena po 4 hodinách. Směs byla zfiltrována přes celit a filtrát byl několikrát vytřepán s EAC a zředěnou HCl . Organické frakce byly spojeny,

vysušeny bezvodým síranem sodným a odpařeny do sucha. Předpokládaný produkt byl čištěn pomocí sloupcové chromatografie s mobilní fází hexan/EAC/kyselina octová 6:3:1. Sbírané frakce byly sledovány pomocí TLC s mobilní fází CHCl_3 /aceton/kyselina octová 20:1:1 ($R_f=0,55$ produktu). Izolované frakce obsahující předpokládaný produkt byly následně opět čištěny sloupcovou chromatografií tentokrát s mobilní fází CHCl_3 /aceton/kyselina octová 20:1:1. Ani v tomto případě MS analýza nepotvrdila přítomnost požadovaného produktu.

7.11. Příprava methylesteru kyseliny 3-(4-((3-chloro-5,6-dikyanopyrazin-2-yl)ethynyl)fenyl)propanové (9)

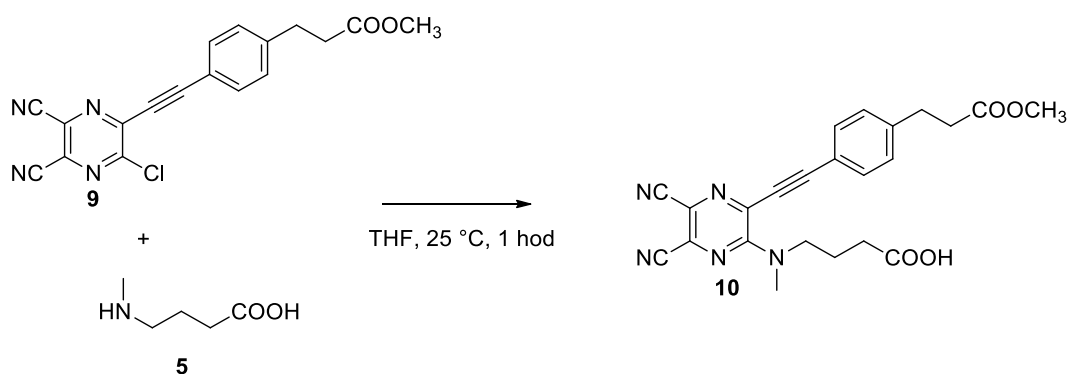


Laboratorní sklo bylo předem důkladně vysušeno v sušárně. Dvouhrdlá baňka se zpětným chladičem byla navíc vysušena pomocí sušící pistole za současné evakuace, následně byla naplněna ochrannou argonovou atmosférou. Reakce probíhala ve striktně bezvodých podmínkách v argonové atmosféře.

Do dvouhrdlé baňky byl přidán 5,6-dichlorpyrazin-2,3-dikarbonitril (881 mg, 4,427 mmol), CuI (51 mg, 0,268 mmol), $(\text{PPh}_3)_4\text{Pd}$ (154 mg, 0,133 mmol), bezvodý Na_2CO_3 (939 mg, 8,859 mmol), a sloučenina 4 (1,00 g, 5,313 mmol) v bezvodém THF (10 ml). Reakce probíhala při teplotě varu rozpouštědla po dobu 24 hodin. Průběh reakce byl sledován pomocí TLC s CHCl_3 jako mobilní fází. Směs byla odpařena a přečištěna sloupcovou chromatografií s mobilní fází CHCl_3 . Frakce obsahující čistý produkt byly spojeny a odpařeny do sucha. Produkt byl ještě dvakrát po sobě překrystalizován EtOH. Vzniklé žluté krystaly jsou požadovaným produktem reakce.

Vzhled: žlutá krystalická látka. Výtěžek: 154 mg (24 %). Molekulová hmotnost: 350,76. Teplota tání: 157,6-158,0 °C. ¹H-NMR (aceton-d₆, 500 MHz): δ_H 2,71 (2H, t, *J* = 8 Hz, CH₂COOCH₃); 3,03 (2H, t, *J* = 8 Hz, CH₂Ar); 3,63 (3H, s, OCH₃); 7,47 (2H, d, *J* = 8 Hz, ArH) a 7,73 (2H, d, *J* = 8 Hz, ArH). ¹³C-NMR (aceton-d₆, 125 MHz): 173,1; 153,2; 146,5; 143,1; 133,8; 132,3; 130,2; 130,1; 118,3; 113,7; 104,9; 84,8; 51,7; 35,3 a 31,5 ppm. IČ (ATR, cm⁻¹): 2918, 2850, 2206 (CN), 1733, 1602, 1521, 1491, 1439, 1416, 1363, 1338, 1306, 1269, 1215, 1197, 1163, 1147, 1027, 985, 948, 902, 850 a 835. MS (APCI+) *m/z*: 351,3 [M+H]⁺

7.12. Příprava sloučeniny 10



Reakce byla prováděna celkem čtyřikrát dle postupu uvedeného níže. Jednotlivé navážky reaktantů a výtěžky reakcí jsou uvedeny v tabulce č. 1:

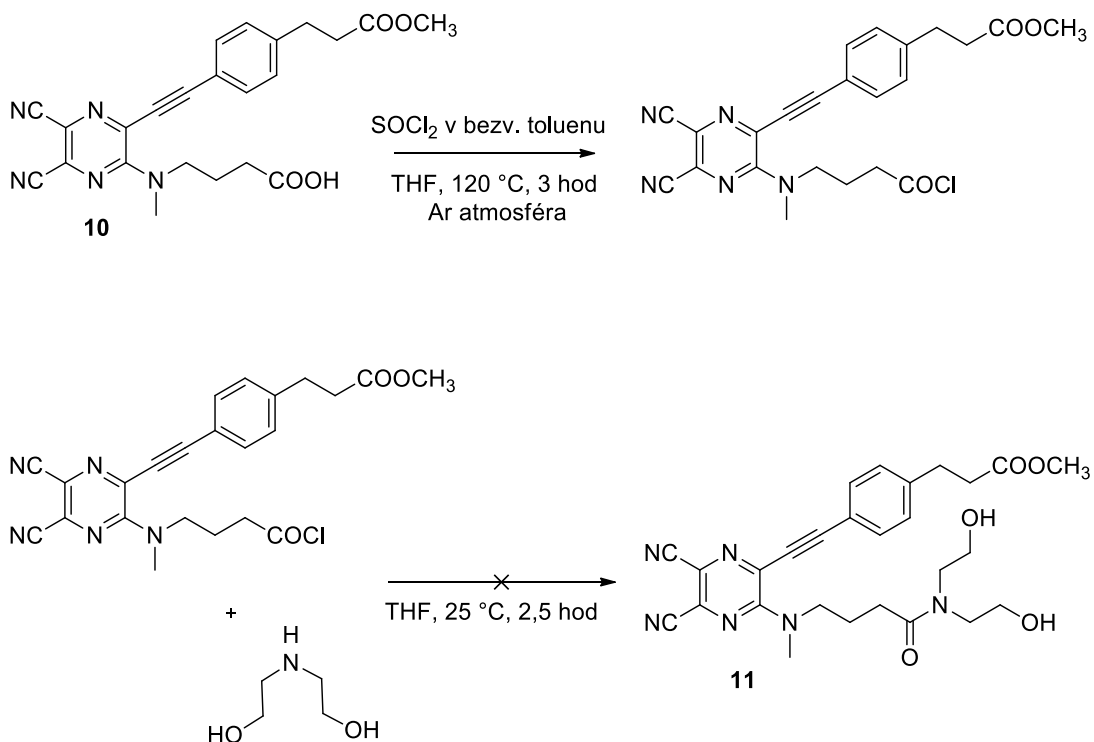
Sloučenina 9	Sloučenina 5	THF	Produkt 10
48 mg, 0,137 mmol	83 mg, 0,710 mmol	5 ml	34 mg, 59 %
50 mg, 0,143 mmol	88 mg, 0,750 mmol	5 ml	43 mg, 71 %
75 mg, 0,212 mmol	131 mg, 1,117 mmol	7 ml	69 mg, 76 %
150 mg, 0,428 mmol	250 mg, 2,138 mmol	10 ml	149 mg, 81 %

Tabulka č. 1: Přehled prováděných reakcí pro přípravu sloučeniny 10

Sloučenina **5** byla v baňce rozpuštěna v THF. Do baňky byla následně přidána sloučenina **9** a směs byla míchána při pokojové teplotě. Průběh reakce byl sledován pomocí TLC s mobilní fází hexan/EAC/kyselina octová 6:3:1 ($R_f=0,40$ produktu). Reakce byla ukončena po 1 hodině. Produkt reakce byl následně přečištěn sloupcovou chromatografií se stejnou mobilní fází.

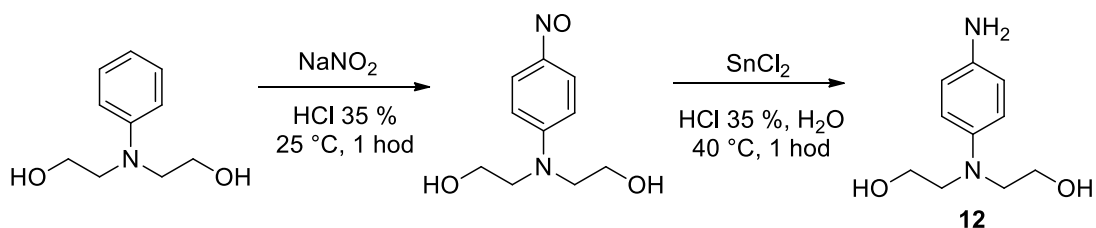
Vzhled: žlutá krystalická látka. Molekulová hmotnost: 431,45. Teplota tání: 97,9-98,3 °C. $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz): δ_{H} 2,36 (2H, t, $J = 6$ Hz, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$); 2,62 – 2,68 (4H, m, CH_2); 2,99 (2H, t, $J = 8$ Hz, CH_2); 3,51 (3H, s, NCH_3); 3,67 (3H, s, OCH_3); 3,89 (2H, t, $J = 6$ Hz, NCH_2); 7,10 (1H, br s, COOH); 7,23 – 7,28 (2H, m, ArH) a 7,49 ppm (2H, d, $J = 8$ Hz, ArH). $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 125 MHz): 214,4; 172,9; 153,3; 143,6; 132,0; 128,9; 128,8; 127,0; 119,3; 118,5; 113,8; 113,5; 99,5; 86,3; 69,9, 54,8, 51,8; 39,0; 35,0; 30,8 a 29,3 ppm. IČ (ATR, cm^{-1}): 2928, 2854, 2228 (CN), 2199, 1729, 1704, 1552, 1516, 1506, 1437, 1402, 1367, 1268, 1195, 1179, 1081, 1063, 1019, 981, 952, 903, 842 a 829. MS (APCI+) m/z : 432,2 $[\text{M}+\text{H}]^+$

7.13. Příprava sloučeniny **11**



Sloučenina **10** (34 mg, 0,079 mmol) byla rozpuštěna v bezvodém THF (2 ml) pod ochrannou argonovou atmosférou. K reaktantu byl přidán SOCl_2 (100 μl , 1,377 mmol) v bezvodém toluenu. Směs byla míchána při 120 °C. Průběh reakce byl sledován pomocí TLC s mobilní fází hexan/EAC/kyselina octová 6:3:1. Reakce byla ukončena po 3 hodinách a nezreagovaný SOCl_2 byl důkladně odpařen na rotační vakuové odparce. Poté byl přidán bezvodý THF (2,5 ml) a dihydroxyethylamin (39 μl , 0,397 mmol). Směs byla míchána při pokojové teplotě po dobu 2,5 hodiny. Průběh reakce byl opět sledován pomocí TLC s mobilní fází hexan/EAC 2:1. Reakční směs byla odpařena do sucha a následně čištěna pomocí sloupcové chromatografie s mobilní fází hexan/EAC 2:1. Byly izolovány dvě skvrny, MS analýza však nepotvrdila produkt ani u jedné z nich.

7.14. Příprava 4-amino[*N,N*-bis(2-hydroxyethyl)]anilinu (**12**)



Příprava sloučeniny **12** byla založena na postupu popsáném již dříve v literatuře^{33,34}.

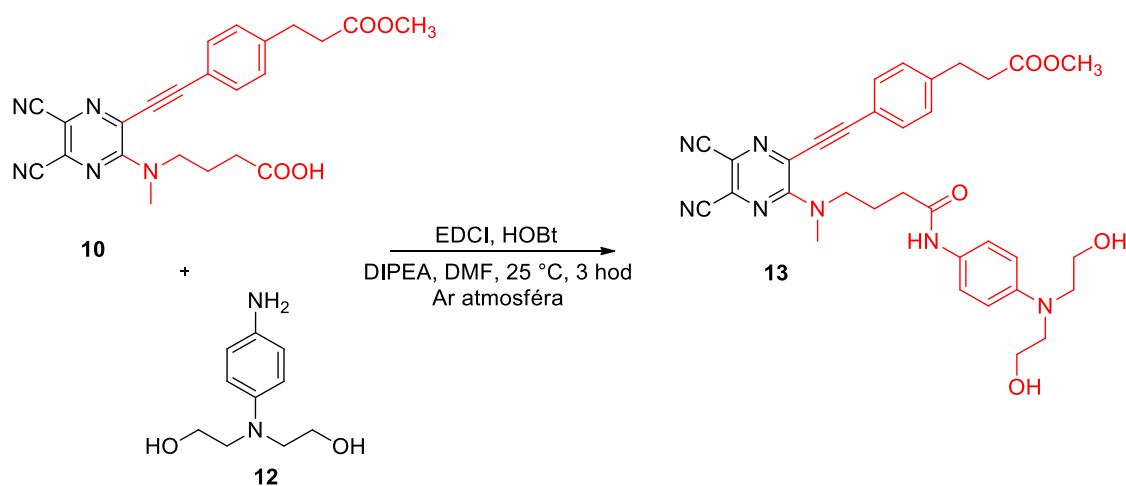
Najemno rozetřený *N,N*-bis(2-hydroxyethyl)anilin (12,00 g, 0,066 mol) byl rozpuštěn v koncentrované HCl (35%, 25 ml). Směs byla míchána do úplného rozpuštění aminu. Roztok byl ochlazen směsí led/sůl přibližně na -10 °C. Do roztoku byl za stálého chlazení pomalu přikapán roztok NaNO_2 (5,00 g, 0,072 mol) v destilované vodě (13 ml). Směs se změnila z průhledné na sytě oranžovou. Reakce byla ukončena po 1 hodině. Směs byla naředěna vodou a vytřepána s DCM . K vodné fázi byl přidán $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ do zásadité reakce. Poté byla vodná fáze opět několikrát vytřepána s DCM , produkt přešel do organické fáze, která byla odpařena do sucha.

K produktu předchozí reakce byla přidána destilovaná voda (13 ml), HCl 35% (25 ml). Po částech byl přidáván $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (14,93 g, 0,066 mol). Směs byla míchána při 40 °C. Po 20 minutách byla ke směsi přidána destilovaná voda (160 ml) a směs byla udržována

za stejných reakčních podmínek dalších 30 minut. Po ukončení reakce bylo upraveno pH pomocí roztoku NaOH (40%) do zásadité reakce. V reakční směsi vznikla bílá sraženina. Směs byla naředěna vodou a vytřepána s DCM. Bílá sraženina přešla do vodné fáze, sraženina byla odfiltrována a filtrát byl vytřepán horkým EAC. Vodná fáze byla odpařena do sucha a produkt byl přečištěn pomocí sloupcové chromatografie s mobilní fází EAC/TEA/MeOH 20:1:1 ($R_f=0,24$ produktu). Organické DCM a EAC fáze byly spojeny a přefiltrovány. Filtrát byl odpařen a produkt byl přečištěn rovněž pomocí sloupcové chromatografie s mobilní fází EAC/TEA/MeOH 20:1:1 ($R_f=0,22$ produktu). Stejně tak bylo postupováno s pevnou látkou zachycenou na filtru. Frakce obsahující čistý produkt byly spojeny a odpařeny do sucha.

Vzhled: hnědá viskózní látka. Výtěžek: 1,42 g, (11 %). Molekulová hmotnost: 196,25. MS (APCI+) m/z : 197,2 $[M+H]^+$. Ostatní naměřená analytická data odpovídají publikovaným hodnotám.

7.15. Příprava sloučeniny 13

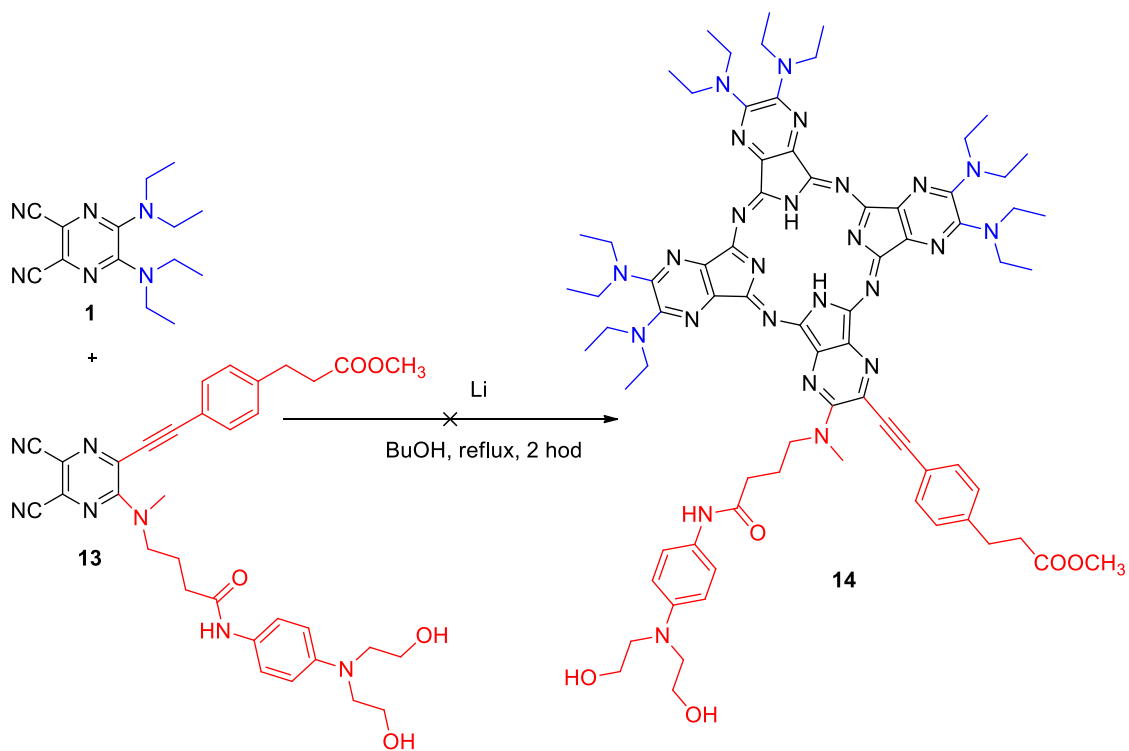


Do dvouhrdlé baňky byla navážena sloučenina **10** (199 mg, 0,461 mmol), sloučenina **12** (109 mg, 0,555 mmol) a HOBt (75 mg, 0,555 mmol) pod ochrannou argonovou atmosférou. Následně byl přidán bezvodý dimethylformamid (DMF, 5 ml) a reakce byla míchána při pokojové teplotě. Po rozpuštění byl ke směsi přidán EDCI (98 μ l, 0,554

mmol) a *N,N*-diisopropylethylamin (DIPEA, 197 μ l, 01,154 mmol). Průběh reakce byl sledován pomocí TLC s mobilní fází EAC/aceton 5:1. Reakce byla ukončena po 2 hodinách. Reakční směs byla přečištěna sloupcovou chromatografií s mobilní fází EAC/aceton 5:1 ($R_f=0,33$ produktu). Frakce obsahující požadovaný produkt byly odpařeny do sucha.

Vzhled: hnědá viskózní látka. Výtěžek: 69 mg (24 %). Molekulová hmotnost: 609,7. $^1\text{H-NMR}$ (acetone- d_6 , 500 MHz): δ_{H} 2,13 – 2,20 (2H, m, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$); 2,43 (2H, t, $J = 7$ Hz, CH_2CONH); 2,67 (2H, m, $\text{CH}_2\text{COOCH}_3$); 2,98 (2H, m, CH_2Ar); 3,51 (4H, t, $J = 6$ Hz); 3,54 (3H, br s, CH_3) 3,63 (3H, s, NCH_3); 3,73 (4H, t, $J = 6$ Hz); 4,07 (2H, t, $J = 7$ Hz); 4,15 (2H, br s, OH); 6,65 (2H, d, $J = 9$ Hz, ArH); 7,37 (4H, t, $J = 9$ Hz, ArH); 7,60 (2H, d, $J = 8$ Hz, ArH) a 8,81 ppm (1H, br s, CONH). $^{13}\text{C-NMR}$ (acetone- d_6 , 125 MHz): 173,2; 170,1; 154,5; 145,7; 144,8; 132,8; 129,9; 129,8; 129,5; 127,8; 121,7; 119,5; 119,4; 115,3; 114,8; 112,9; 99,1; 87,5; 60,4; 55,43; 55,37; 52,4; 51,7; 39,3; 35,4; 34,2; 31,4 a 23,8 ppm. IČ (ATR, cm^{-1}): 3406, 2926, 2228 (CN), 2199, 1728, 1667, 1606, 1547, 1518, 1445, 1400, 1353, 1303, 1281, 1269, 1181, 1070, 1050, 1006, 990, 923, 833 a 811. MS (APCI+) m/z : 610,2 $[\text{M}+\text{H}]^+$

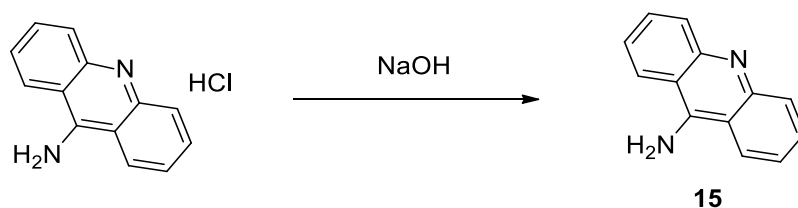
7.16. Příprava cílového AzaPc (14)



Sloučenina **13** (20 mg, 0,033 mmol) a sloučenina **1** (27 mg, 0,099 mmol) byly rozpuštěny v bezvodém čerstvě předestilovaném butanolu (BuOH, 3 ml). Na baňku byl připojen zpětný chladič se sušící rourkou. Reakce probíhala při teplotě varu rozpouštědla. Jakmile se reakční směs začala vařit, bylo do reakce přidáno kovové lithium (6 mg, 0,865 mmol). Reakční směs se zbarvila fialově. Reakce probíhala po dobu 2 hodin. Poté byla reakční směs zakoncentrována za sníženého tlaku a ke směsi byla přidána směs destilované vody/MeOH/kyseliny octové v poměru 10:2:1 (13 ml). Došlo k vysrážení produktu, který byl posbírán filtrací. Směs kongenerů na filtračním papíře byla následně vysušena v sušárně, rozpuštěna v acetonu. Dle TLC analýzy s mobilní fází CHCl₃/THF 10:1, CHCl₃/THF/MeOH 10:1:2 nevznikl námi požadovaný kongener (sloučenina **14**), patrný byl pouze symetrický AzaPc nesoucí diethylaminové substituenty.

7.17. Testovací reakce

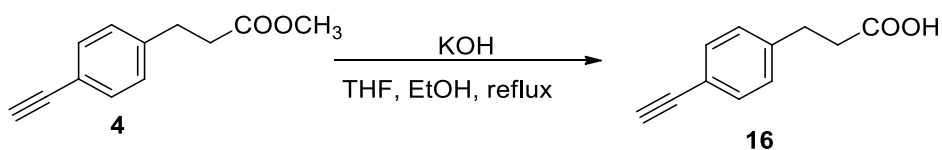
7.17.1. Převedení hydrochloridu 9-aminoakridinu na volnou bazi (**15**)



Hydrochlorid 9-aminoakridinu (1,00 g, 4,335 mmol) byl rozpuštěn v koncentrovaném roztoku NaOH a následně několikrát vytřepán s dimethyletherem. Organické fáze byly spojeny, vysušeny bezvodým síranem sodným. Produkt byl odpařen do sucha.

Vzhled: žlutá krystalická látka. Výtěžek: 290 mg (34 %). Molekulová hmotnost: 194,23.

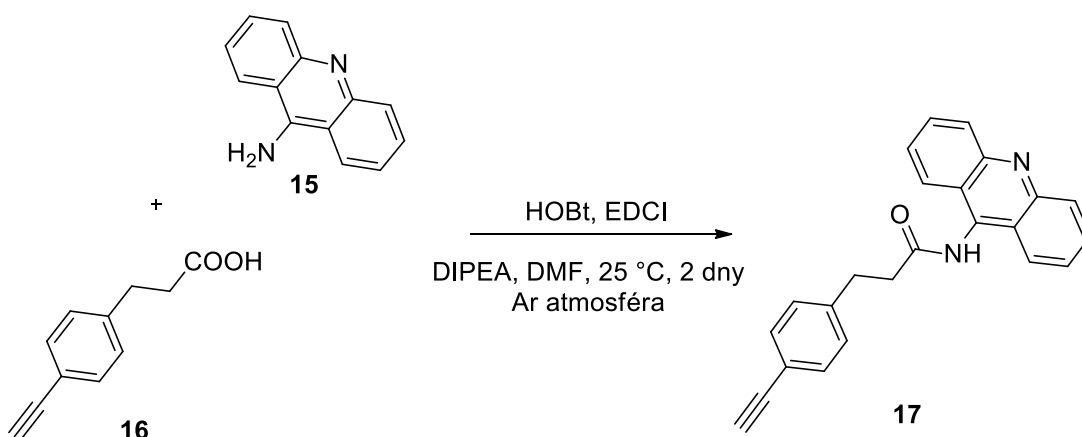
7.17.2. Příprava 3-(4-ethynylfenyl)propanové kyseliny (16)



Sloučenina **4** (95 mg, 0,506 mmol) a nejednodušší nadrcený KOH (86 mg, 1,517 mmol) byly rozpuštěny ve směsi bezvodého EtOH (3 ml) a bezvodého THF (3 ml). Reakční směs byla míchána při teplotě varu rozpouštědla. Průběh reakce byl sledován pomocí TLC s mobilní fází hexan/EAC 10:1. Po ukončení reakce byla směs slabě okyselena pomocí zředěné HCl a přefiltrována, přičemž sraženina na filtru byla navíc promyta malým množstvím destilované vody. Produkt byl přečištěn sloupcovou chromatografií s mobilní fází hexan/EAC/octová kyselina v poměru 15:3:0,5 ($R_f=0,41$ produktu).

Vzhled: světle žlutá krystalická látka. Výtěžek: 79 mg (90 %). Molekulová hmotnost: 174,20. $^1\text{H-NMR}$ (aceton- d_6 , 500 MHz): δ_{H} 2,64 (2H, t, $J = 8$ Hz, CH_2COOH); 2,94 (2H, t, $J = 8$ Hz, CH_2Ar), 3,59 (1H, s, CH); 7,28 – 7,31 (2H, m, ArH) a 7,41 – 7,44 ppm (2H, m ArH). $^{13}\text{C-NMR}$ (aceton- d_6 , 125 MHz): 173,8; 141,1; 132,7; 129,4; 120,9; 84,2; 78,6; 35,5 a 31,3 ppm. IČ (ATR, cm^{-1}): 3274, 2926, 1729, 1559, 1510, 1435, 1412, 1362, 1324, 1307, 1270, 1223, 1116, 931, 839 a 822.

7.17.3. Příprava sloučeniny 17



Příprava sloučeniny byla založena na postupu popsáném již dříve v literatuře³⁵.

Sloučenina **16** (50 mg, 0,287 mmol), sloučenina **15** (56 mg, 0,287 mmol), HOBT (47 mg, 0,348 mmol) byly rozpuštěny v bezvodém DMF (5 ml) pod ochrannou argonovou atmosférou. Poté byl přidán DIPEA (125 μ l, 0,718 mmol) a EDCI (37 μ l, 0,344 mmol). Reakční směs byla nadále míchána při pokojové teplotě 2 dny. Průběh reakce byl sledován pomocí TLC s mobilní fází EAC. Po ukončení reakce byl produkt odpařen do sucha a přečištěn pomocí sloupcové chromatografie nejprve s čistým EAC, poté hexan/EAC 1:1 ($R_f=0,15$ produktu).

Výtěžek: 55 mg (54 %). Molekulová hmotnost: 350,41. $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 500 MHz): δ_{H} 1,11 – 1,30 (2H, m, CH_2CONH); 2,99 – 3,09 (2H, m, CH_2Ar); 4,17 (1H, s, CH); 7,38 (2H, d, $J = 7$ Hz, ArH); 7,49 (2H, d, $J = 7$ Hz, ArH); 7,51 – 7,56 (2H, m, akridin); 7,80 – 7,85 (4H, m, akridin); 8,14 (2H, d, $J = 8$ Hz, akridin) a 10,59 ppm (1H, s, CONH). $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 125 MHz): 171,5; 149,0; 142,3; 140,3; 132,0; 130,5; 129,3; 129,2; 125,8; 124,7; 122,7; 119,7; 83,8; 80,5; 37,0 a 31,1 ppm. IČ (ATR, cm^{-1}): 3270, 2928, 2856, 1659, 1642, 1563, 1502, 1463, 1415, 1374, 1257, 1150, 1018 a 826. MS (APCI+) m/z : 351,2 $[\text{M}+\text{H}]^+$

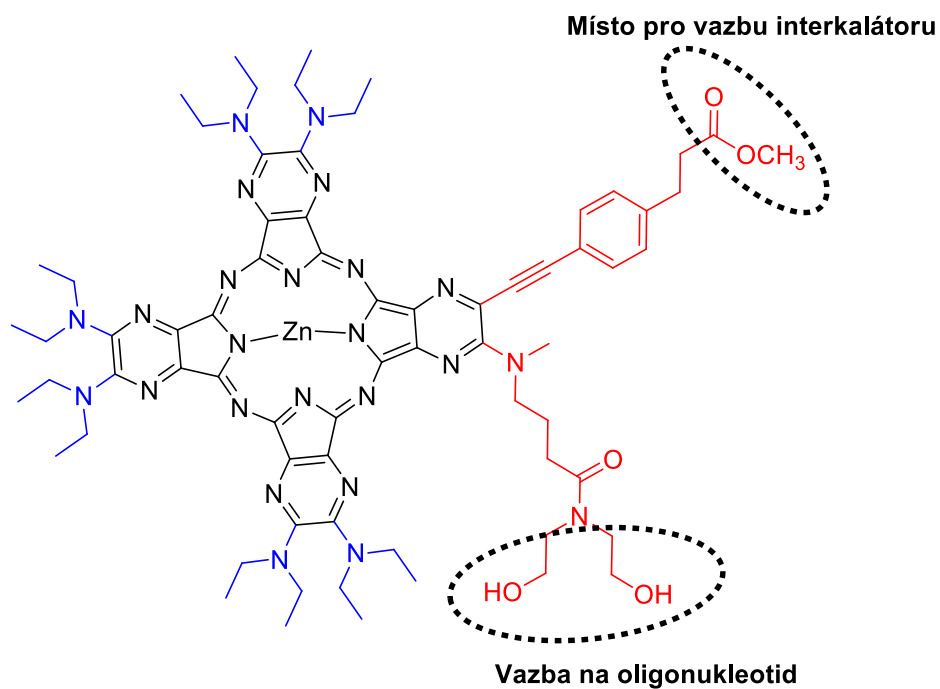
8. VÝSLEDKY A DISKUZE

Cílem mojí diplomové práce bylo připravit alkylamino substituovaný AzaPc, který bude fungovat jako zhášec fluorescencí jiných sloučenin (tzv. quencher). Takového zhášeče může být využito v DNA hybridizačních metodách. V dnešní době je převážně využíváno dvojité značených DNA sond, kdy na jedné sondě je navázán fluorofor a zároveň i zhášec. Jsou-li tyto dvě jednotky dostatečně blízko u sebe, zhášec zháší fluorescenci fluoroforu. Toto zhášení je realizováno statickým a dynamickým zhášením. Blíže je o těchto mechanismech pojednááno v teoretické části diplomové práce (viz kapitola 4.2. Zhášení fluorescence). Jakmile se ale fluorofor a zhášec dostanou do roztoku, zhášec už není schopen zhášet fluorescenci fluoroforu.

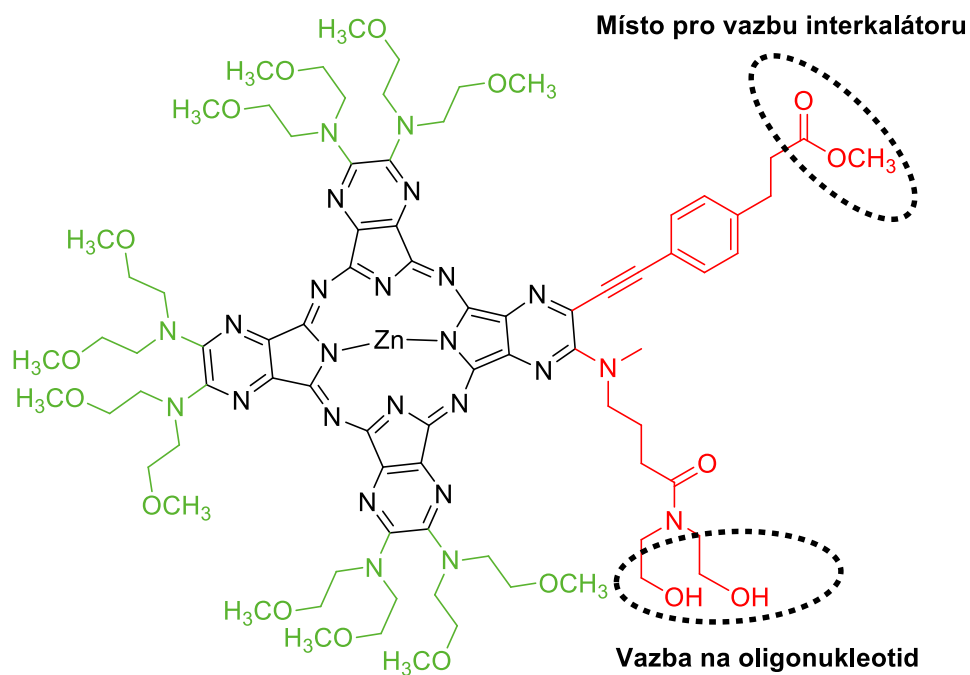
Z uvedených mechanismů zhášení vyplývají požadavky na univerzální zhášec. Prvním požadavkem je žádná vlastní fluorescence, což je splněno u zhášečů označovaných „dark quenchers“. Druhým požadavkem je schopnost tvořit heterodimery s různými fluorofory. V neposlední řadě musí takový zhášec mít široké absorpční spektrum, které pokryje emisi velké škály fluoroforů.

Ukázalo se, že **alkylamino substituované AzaPc** splňují všechny zmíněné požadavky. Pokud je na AzaPc navázáno čtyři a více alkylaminových substituentů, probíhá tzv. ICT, který velice účinně zháší excitované stavy molekuly. Důsledkem je fakt, že takové AzaPc nejsou sami o sobě fluorescenční, patří tedy do skupiny „dark quenchers“. Díky planárnímu uspořádání AzaPc jsou schopny tvořit dimery s různými fluorofory, tudíž mohou působit mechanismem statického zhášení. A na rozdíl od ostatních zhášečů mají široké absorpční spektrum, které pokrývá emisní spektrum všech v praxi používaných fluoroforů. Tím pádem mohou působit i druhým zmiňovaným mechanismem – mechanismem dynamického zhášení.

Cílem této diplomové práce byla syntéza dvou molekul znázorněných na Obr. č. 16 a 17.



Obr. č. 16: Struktura cílového AzaPc A



Obr. č. 17: Struktura cílového AzaPc B

Molekula finálního AzaPc by měla být vystavěna ze dvou různých prekurzorů v poměru 3:1. Díky šesti dialkylaminovým substituentům na periferii by měla molekula

fungovat jako dark quencher, neboť v molekule probíhá ICT. Dvě hydroxylové skupiny slouží pro vazbu na oligonukleotid doprostřed sondy. Esterová skupina je místem určeným pro vazbu interkalátoru, který slouží ke zpevnění vazby do žlábků DNA.

Syntéza prvního prekursoru pro statistickou kondenzaci (sloučenina **1**, resp. **2**) byla prováděna pomocí nukleofilní substituce 5,6-dichlorpyrazin-2,3-dikarbonitrilu, kde došlo k substituci chlor substituentů v poloze 5 a 6 pyrazinového kruhu. I přesto, že nukleofilní substituce za normálních okolností neprobíhají na aromatickém jádře dobře, zmíněná reakce probíhá téměř kvantitativně (72 %, resp. 99 %) díky aktivaci výchozí sloučeniny nitrilovými skupinami (mezomerní efekt) a pyrazinovými dusíky (indukční efekt), kdy se pozice 5 a 6 pyrazinového cyklu stávají silně elektron-deficitní. Aby reakce proběhla rovnou do druhého kroku (disubstituce), byla reakční směs zahřívána.

Příprava druhého prekursoru (sloučenina **13**), který má tvořit ¼ finálního AzaPc a nese potřebné funkční skupiny pro vazbu interkalátoru a oligonukleotidu, probíhala v několika krocích.

Prvním krokem při přípravě druhého prekursoru byla příprava sloučeniny **6**. Výchozími látkami pro přípravu této látky byly 5,6-dichlorpyrazin-2,3-dikarbonitril a *N*-methyl- γ -aminomáselná kyselina (**5**). Tato aminokyselina není komerčně dostupná, proto byla nejprve připravena bazickou hydrolýzou *N*-methylpyrollidonu pomocí hydroxidu barnatého a to ve výtěžku 55 %. Reakce pro přípravu sloučeniny **6** probíhala při pokojové teplotě, tím bylo dosaženo nukleofilní substituce pouze v poloze 5, nedošlo tedy k substituci obou chlor substituentů. Při reakci sloužila *N*-methyl- γ -aminomáselná kyselina zároveň i jako baze vychytávající odstupující chloridové ionty. Byla proto v reakci použita v dostatečném nadbytku, ne však v řádově vyšším nadbytku, který by mohl mít za následek disubstituci obou chlor substituentů. Sloučenina **6** byla získána ve výtěžku 68 %.

Dalším krokem byla amidace karboxylové skupiny sloučeniny **6**. Příprava sloučeniny **7** byla zkoušena dvěma různými postupy. Prvním způsobem byla amidace přes chlorid kyseliny, kdy v první fázi reakce byl pomocí chloridu thionylu připraven chlorid kyseliny sloučeniny **6**. Tento meziprodukt byl bez čištění následně podroben reakci s dihydroxyethylaminem. Produkt této reakce byl analyzován pomocí hmotnostní a NMR spektroskopie, které ukázaly, že došlo k nukleofilní substituci chloru v poloze 6 (**7a**), nikoliv k amidaci karboxylové skupiny (chloridu). Druhým zkoušeným postupem

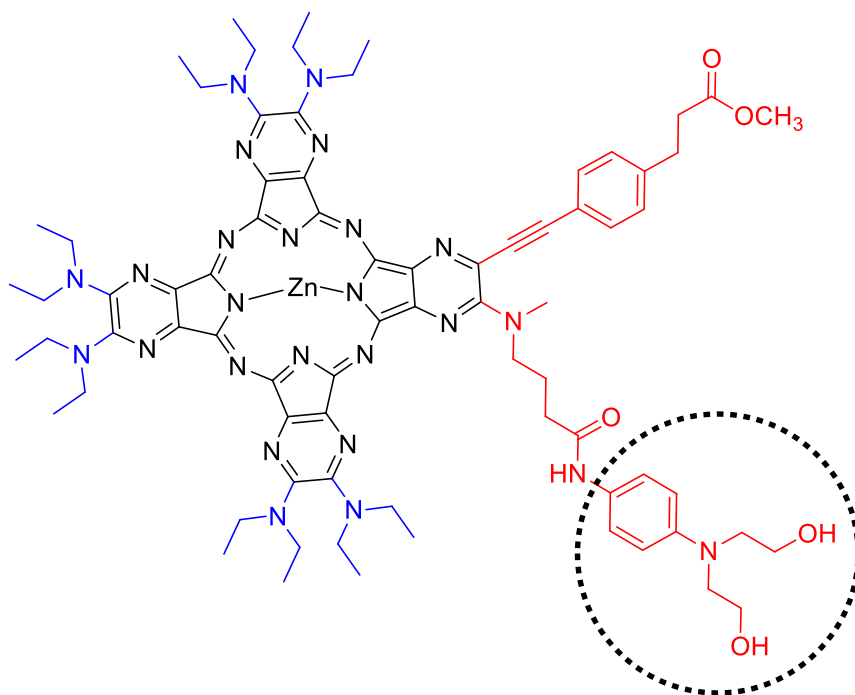
byla amidace pomocí EDCI. Tato reakce byla prováděna dvakrát stejným způsobem pouze s odlišnou délkou reakční doby. V prvním případě byla reakce míchána 24 hodin. NMR analýza provedená po zpracování reakce nepotvrdila přítomnost požadovaného produktu. Za předpokladu, že byla reakční doba příliš dlouhá a potenciálně vzniklý produkt se opět rozložil, byla reakční doba v druhém pokusu zkrácena. Nicméně ani tento postup se neosvědčil a požadovaný produkt nevznikl. Po těchto neúspěšných amidacích jsme se rozhodli změnit postup a připravit nejprve sloučeninu **8** pomocí couplingových reakcí a až v následujícím kroku provést amidaci dihydroxyethylaminem. Pro syntézu sloučeniny **8** bylo nezbytné připravit nejprve vhodného couplingového partnera **4**, jehož příprava vycházela z kyseliny 3-(4-bromfenyl)propanové. Ta byla v prvním kroku podrobena esterifikaci pomocí acetylchloridu. Striktní dodržení bezvodých podmínek umožňuje této reakci kvantitativní průběh. Produktem je methylester výchozí kyseliny (sloučenina **3**). Druhým krokem bylo pak zavedení terminální ethynylové skupiny pomocí tzv. Sonogashirova couplingu (viz kapitola 6.3 Sonogashira coupling). Požadovaného produktu bylo dosaženo pomocí trimethylsilylacetyleny, kdy v první fázi došlo k substituci bromu v poloze 4 a v druhé fázi byla následně odstraněna trimethylsilylová skupina, která zde působila jako chránící skupina zabraňující reakci i na druhém uhlíku trojné vazby. Tento postup nám umožnil získat sloučeninu **4** ve výtěžku 47 %.

Pro přípravu sloučeniny **8** vycházející ze sloučeniny **6** jsme zvolili opět Sonogashirův coupling, bohužel tato reakce neposkytla požadovaný produkt. Rozhodli jsme se proto prohodit pořadí vazby příslušných substituentů. Nejprve jsme provedli Sonogashirův coupling 5,6-dichlorpyrazin-2,3-dikarbonitrilu se sloučeninou **4**, který poskytl sloučeninu **9**. Při této reakci se osvědčilo využití $(PPh_3)_4Pd$ jakožto katalyzátoru, kdy reakce poskytla požadovaný produkt ve výtěžku 24 %. V následujícím kroku pak byla do molekuly zavedena *N*-methyl- γ -aminomáselná kyselina (**5**) pomocí nukleofilní substituce za podmínek podobných jako při přípravě sloučeniny **6**. Získali jsme tak požadovaný meziprodukt **10** v maximálním výtěžku 81 %.

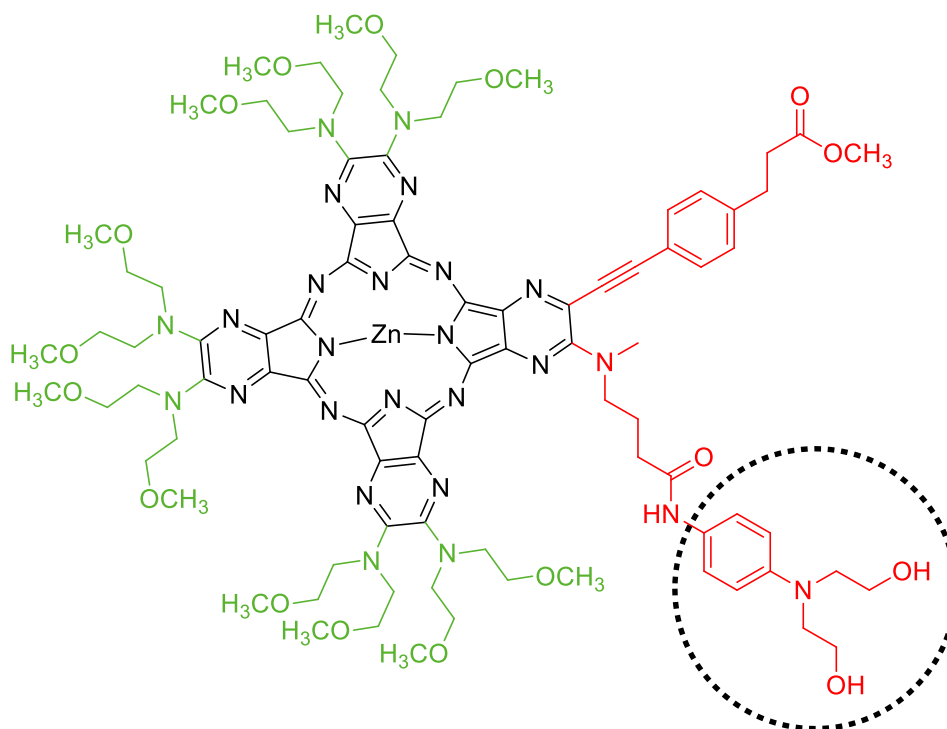
Zbývajícím krokem byla amidace volné karboxylové skupiny sloučeniny **10**. V tomto případě byl zvolen postup přes chlorid kyseliny získaný pomocí chloridu thionylu. Sloučenina **10** již nemá chlor substituent v poloze 6 jako sloučenina **6**, proto byla vyloučena možnost nukleofilní substituce jako v předchozím případě. Bohužel ani

v tomto případě se nám nepodařilo prokázat vznik požadovaného produktu amidace – sloučeninu **11**.

Neúspěšné amidace nás vedly k úpravě cílové molekuly, přičemž klíčové funkční skupiny zůstaly zachovány. Předpokladem bylo, že amidace aromatickými aminy probíhají lépe než amidace alifatickými aminy. Rozhodli jsme se tedy použít bis(hydroxyethyl)anilin (**12**) namísto dihydroxyethylaminu (viz Obr. č. 19 a 20).



Obr. č. 19: Změna struktury cílového AzaPc A



Obr. č. 20: Změna struktury cílového AzaPc B

Sloučenina **12** potřebná pro tuto reakci opět není komerčně dostupná a byla připravena z bis(hydroxyethyl)anilinu zavedením nitroso skupiny a následnou redukcí pomocí chloridu cínatého. Produkt této reakce (sloučenina **12**) není stabilní, již při zpracování reakce docházelo k rozkladu produktu, proto je výtěžek reakce poměrně nízký (11 %). Amidace využívající EDCI sloužící stejně jako při jedné z neúspěšných amidací (přípravě sloučeniny **8**) jako aktivátor karboxylové skupiny pro reakci s primárním či sekundárním aminem poté poskytla požadovaný produkt **13**. Konečně byl tedy získán potřebný prekurzor pro statistickou kondenzaci a přípravu cílového AzaPc.

Výchozími látkami pro statistickou kondenzaci při přípravě AzaPc byly připravené prekurzory **1** a **13**. Tyto prekurzory měly poskytnout statistickou směs šesti kongenerů z různě nakombinovaných podjednotek **1** (A) a **13** (B). Naším cílem bylo pak chromatograficky vyzolovat AzaPc typu AAAB. Pořadí frakcí je dáno polaritou vzniklých kongenerů, námi požadovaný kongener bývá druhou frakcí. Bohužel kongener AAAB (**14**) v reakci nevznikl nebo vznikl v pouze velice malém množství. TLC analýza ukázala, že produktem reakce je především kongener AAAA. Nicméně je potřeba zmínit, že se jednalo pouze o první pilotní pokus z velice malých množství výchozích prekurzorů

a požadovaný kongener mohl vzniknout v tak malém množství, že nebyl v porovnání se symetrickým AzaPc typu AAAA na TLC patrný. Podmínky této reakce bude potřeba v budoucnu optimalizovat, případně vyzkoušet další metody, které se běžně pro přípravu AzaPc používají.

V rámci diplomové práce byla také vyzkoušena vazba interkalátoru na esterovou skupinu AzaPc. Pro pilotní reakce byla zvolena vazba 9-aminoakridinu. Výchozí látkou byl hydrochlorid 9-aminoakridinu, který byl nejprve převeden na volnou bazi 9-aminoakridin (**15**). Získaná sloučenina **15** byla následně podrobena reakci se sloučeninou **16**, která byla získána bazickou hydrolýzou sloučeniny **4**. Požadované sloučeniny **17** pak bylo dosaženo ve výtěžku 54 %.

Závěrem lze konstatovat, že jsme našli a optimalizovali přípravu prekurzorů vhodných pro syntézu navrženého AzaPc vhodného pro vazbu doprostřed oligonukleotidové sondy a pilotně vyzkoušeli možnost vazby interkalátoru. Na tématu se bude dále pokračovat v rámci řešení projektu Grantové agentury České Republiky „Azaphthalocyanines – dark quenchers in DNA hybridization probes (GAČR: 17-19094S)“.

9. ZÁVĚR

V rámci této diplomové práce byly úspěšně připraveny:

- ✓ 5,6-bis(dimethylamino)-pyrazin-2,3-dikarbonitril (**1**)
- ✓ 5,6-bis((2-methoxyethyl)amino)pyrazin-2,3-dikarbonitril (**2**)
- ✓ Methylester kyseliny 3-(4-bromfenyl)propanové (**3**)
- ✓ Methylester kyseliny 3-(4-ethynylfenyl)propanové (**4**)
- ✓ *N*-methyl- γ -aminomáselná kyselina (**5**)
- ✓ 4-[(3-chloro-5,6-dikyanopyrazin-2-yl)methyl]amino]butanová kyselina (**6**)
- ✓ Methylester kyseliny 3-(4-((3-chloro-5,6-dikyanopyrazin-2-yl)ethynyl)fenyl)propanové (**9**)
- ✓ Sloučenina **10**
- ✓ 4-amino[*N,N*-bis(2-hydroxyethyl)]anilin (**12**)
- ✓ Sloučenina **13**
- ✓ 3-(4-ethynylfenyl)propanová kyselina (**16**)
- ✓ Sloučenina **17**

Všechny produkty byly charakterizovány běžnými postupy (NMR, MS, IČ spektroskopie, elementární analýza).

10. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

¹ VALEUR, B., BERBERAN-SANTOS, M. N. *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*. 2. vydání. Weinheim: Wiley-VCH, 2012. 592 s. ISBN 978-3-527-32837-6.

² Fluorescence Tutorials. *ThermoFisher Scientific* [online]. 2017 [cit. 2017-02-02]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/cz/en/home/support/tutorials.html#vid1>.

³ LAKOWICZ, J. R. *Principles of fluorescence spectroscopy*. 3. vydání. New York: Springer, 2006. 953 s. ISBN 978-0-387-31278-1.

⁴ FIŠAR Z. Fluorescenční spektroskopie v neurovědách: *Principy fluorescenční spektroskopie*. [online]. 2009 [cit. 2017-02-01]. Dostupné z: <http://psych.lf1.cuni.cz/fluorescence/Default.htm>. ISSN: 1803-6619.

⁵ Luminiscence. *Informační systém Masarykovy univerzity* [online]. 2012 [cit. 2017-02-07]. Dostupné z: https://is.muni.cz/el/1431/jaro2012/F9600/Taborsky_luminiscence.pdf.

⁶ JOHANSSON, M. K., COOK, R. M. Intramolecular dimers: A new design strategy for fluorescence-quenched probes. *Chem. - Eur. J.*, 2003, **9**(15), 3466-3471.

⁷ JOHANSSON, M. K., FIDDER, H., DICK, D., COOK, R. M. Intramolecular Dimers: A New Strategy to Fluorescence Quenching in Dual-Labeled Oligonucleotide Probes. *J. Am. Chem. Soc.*, 2002, **124**(24), 6950-6956.

⁸ MARRAS, S. A. E., KRAMER, F. R., TYAGI, S. Efficiencies of fluorescence resonance energy transfer and contact-mediated quenching in oligonucleotide probes. *Nucleic Acids Res.*, 2002, **30**(21), e122.

⁹ NOVÁKOVÁ, V. Příprava a studium vlastností azaanalogů ftalocyaninů. Hradec Králové, 2011. Disertační práce. Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové.

¹⁰ NOVAKOVA, V., ZIMCIK, P., MILETIN, M., VACHOVA, L., KOPECKY, K., LANG, K., CHABERA, P., POLIVKA, T. Ultrafast intramolecular charge transfer in tetrapyrazinoporphyrazines controls the quantum yields of fluorescence and singlet oxygen. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2010, **12**(11), 2555-2563.

¹¹ NOVAKOVA, V., HLADIK, P., FILANDROVA, T., ZAJICOVA, I., KREPSOVA, V., MILETIN, M., LENCO, J., ZIMCIK, P. Structural factors influencing the intramolecular charge transfer and photoinduced electron transfer in tetrapyrazinoporphyrazines. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2014, **16**(11), 5440-5446.

¹² HUANG, Q. Y., LIU, Z. Z., LIAO, Y. Q., CHEN, X. Y., ZHANG Y., LI, Q. G. Multiplex Fluorescence Melting Curve Analysis for Mutation Detection with Dual-Labeled, Self-Quenched Probes. *PLoS One*, 2011, **6**(4), e19206.

¹³ KOPECKÝ, K., Azaftalocyaniny jako nová skupina zhášečů fluorescence. Hradec Králové, 2008. Disertační práce. Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové.

¹⁴ KOPECKY, K., NOVAKOVA, V., MILETIN, M., KUCERA, R., ZIMCIK, P. Synthesis of new azaphthalocyanine dark quencher and evaluation of its quenching efficiency with different fluorophores. *Tetrahedron*, 2011, **67**(33), 5956-5963.

¹⁵ CIDLINA, A., MILETIN, M., FATHI-RASEKH, M., NEMYKIN, V., ZIMCIK, P., NOVAKOVA, V. OFF-ON-OFF Red-Emitting Fluorescent Indicators for a Narrow pH Window. *Chem. - Eur. J.*, 2017, **23**(8), 1795-1804.

¹⁶ LOCHMAN, L., SVEC, J., ROH, J., KIRAKCI, K., LANG, K., ZIMCIK, P., NOVAKOVA, V. Metal cation recognition in water by a tetrapyrazinoporphyrazine-based tweezer receptor. *Chem. - Eur. J.*, 2016, **22**(7), 2417-2426.

¹⁷ KOPECKY, K., NOVAKOVA, V., MILETIN, M., KUCERA, R., ZIMCIK, P. Solid-Phase Synthesis of Azaphthalocyanine-Oligonucleotide Conjugates and Their Evaluation As New Dark Quenchers of Fluorescence. *Bioconjugate Chem.*, 2010, **21**(10), 1872-1879.

¹⁸ KOPECKY, K., SATINSKY, D., NOVAKOVA, V., MILETIN, M., SVOBODA, A., ZIMCIK, P. Synthesis of mono-, di-, tri- and tetracarboxy azaphthalocyanines as potential dark quenchers. *Dyes Pigm.*, 2011, **91**(2), 112-119.

¹⁹ MILETÍN, M., ZIMČÍK, P., KOPECKÝ, K., MUSIL, Z., NOVÁKOVÁ, V., HALUZA, R., BUNČEK, M. Nefluoreskující deriváty ftalocyaninů a azaftalocyaninů jako zhášeče fluorescence. CZ Patent 300906, 2009.

²⁰ HRABÁLEK, A. *et al. Laboratorní cvičení z organické chemie pro farmaceuty*. 1. vydání. Praha: Karolinum, 2004. 162 s. ISBN 80-7184-968-5.

²¹ MCMURRY, J. *Organická chemie*. 1. vydání. Praha: VŠCHT Praha, 2007. 1270 s. ISBN 978-80-7080-637-1.

²² Coupling Reagents Bachem. *Bachem* [online]. 2017 [cit. 2017-03-03]. Dostupné z: http://documents.bachem.com/coupling_reagents.pdf.

²³ HAN, S. Y., KIM, Y. A. Recent development of peptide coupling reagents in organic synthesis. *Tetrahedron*, 2004, **60**(11), 2447-2467.

²⁴ AL-WARHI, T. I., AL-HAZIMI, H. M. A., EL-FAHAM, A. Recent development in peptide coupling reagents. *J. Saudi Chem. Soc.*, 2012, **16**(2), 97-116.

-
- ²⁵ SONOGASHIRA, K., TOHDA, Y., HAGIHARA, N. A convenient synthesis of acetylenes: catalytic substitutions of acetylenic hydrogen with bromoalkenes, iodoarenes and bromopyridines. *Tetrahedron Lett.*, 1975, **16**(50), 4467-4470.
- ²⁶ CHINCHILLA, R., NAJERA, C. Recent advances in Sonogashira reactions. *Chem. Soc. Rev.*, 2011, **40**(10), 5084-5121.
- ²⁷ CHINCHILLA, R., NAJERA, C. The sonogashira reaction: A booming methodology in synthetic organic chemistry. *Chem. Rev.*, 2007, **107**(3), 874-922.
- ²⁸ BOHM, V., HERRMANN, W. Coordination chemistry and mechanisms of metal-catalyzed C-C coupling reactions, 13 - A copper-free procedure for the palladium-catalyzed Sonogashira reaction of aryl bromides with terminal alkynes at room temperature. *Eur. J. Org. Chem.*, 2000, (22), 3679-3681.
- ²⁹ LOUKOTOVÁ, V. Syntéza asymetrických derivátů azaftalocyaninů I. Hradec Králové, 2007. Diplomová práce. Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové.
- ³⁰ CHRITIANSEN, E., DUE-HANSEN, M. E., ULVEN, T. A Rapid and Efficient Sonogashira Protocol and Improved Synthesis of Free Fatty Acid 1 (FFA1) Receptor Agonists. *J. Org. Chem.*, 2010, **75**(4), 1301-1304.
- ³¹ GALAKATOS, N. G., KEMP, D. S. New S-protection from known N-protection: thio esters of N-urethanyl-N-methyl-gamma-aminobutyric acid as a class of protective groups for thiols in peptide synthesis. *J. Org. Chem.*, 1985, **50**(8), 1302-1304.
- ³² XUN, M. M., ZHANG, X. C., ZHANG, J., JIANG, Q. Q., YI, W. J., ZHU, W., YU, X. Q. Low molecular weight PEI-based biodegradable lipopolymers as gene delivery vectors. *Org. Biomol. Chem.*, 2013, **11**(7), 1242-1250.

³³ DEVECI, P., TANER, B., USTUNDAG, Z., OZCAN, E., SOLAK, A. O., KILIC, Z. Synthesis, enhanced spectroscopic characterization and electrochemical grafting of N-(4-aminophenyl)aza-18-crown-6: Application of DEPT, HETCOR, HMBC-NMR and X-ray photoelectron spectroscopy. *J. Mol. Struct.*, 2010, **982**(1-3), 162-168.

³⁴ Clairol Incorporated. Oxidative hair dye compositions. US Patent 3970423, 1976.

³⁵ Coupling reagents. *BioCIS* [online]. 2012 [cit. 2017-03-06]. Dostupné z: http://www.biocis.u-psud.fr/IMG/pdf/Coupling_Reagents.pdf.