

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



Příprava fluorescenčních azaftalocyaninů pro značení
oligonukleotidových sond I.

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Michaela Beranová



Školitel: doc. PharmDr. Miroslav Miletín, Ph.D.

Hradec Králové, 2018

„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

podpis

Poděkování

Za odborné vedení méj diplomové práce, ochotu, trpělivost a podporu bych chtěla poděkovat svému školiteli doc. PharmDr. Miroslavu Miletínovi, Ph.D..

Za praktické rady, pomoc a příjemné pracovní prostředí patří můj dík i celé Azaphthalocyanine group, jmenovitě mgr. Filipu Kostelanskému, mgr. Jiřímu Demuthovi, mgr. Janu Kollárovi a PharmDr. Lukáši Lochmanovi, Ph.D..

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

Za finanční podporu chci poděkovat Univerzitě Karlově, grant SVV 260401.

Za pochopení a podporu děkuji své rodině a svým přátelům.

Abstrakt

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy

Kandidát Michaela Beranová

Školitel doc. PharmDr. Miroslav Miletín, Ph.D.

Název práce Příprava fluorescenčních azaftalocyaninů pro značení oligonukleotidových sond I.

Azaftalocyaniny (AzaPc) jsou makrocyclické sloučeniny s rozsáhlým systémem konjugovaných vazeb, díky kterému se uplatňují jako výborná barviva či pigmenty, a je intenzivně zkoumán jejich potenciál jako diagnostických a terapeutických prostředků. Tato diplomová práce se zabývá přípravou prekurzorů pro vytvoření asymetrických fluorescenčních tetrapyrazinoporfyrinů (TPyzPz) metodou syntézy na pevné fázi nesoucích dva různé substituenty, jeden pro vázání na pevný nosič a druhý pro navázání oligonukleotidové sondy. V úvodní části jsou definovány základní termíny týkající se AzaPc, rozebrány hlavní principy syntézy TPyzPz a možnosti úpravy jejich výsledné struktury. Významnou část práce tvoří popis typických vlastností TPyzPz, vliv struktury na jednotlivé parametry a obory jejich využití. V další části je popsána příprava jednotlivých prekurzorů pro cyklotetramerizaci. Experimentální část práce byla zahájena přípravou 4-hydroxy-3,5-diisopropylbenzoové kyseliny, stericky objemné molekuly, která při využití k periferní substituci potlačuje agregaci makrocyclů. Příprava byla provedena různými metodami, které byly následně zhodnoceny z hlediska efektivity a výtěžnosti. V dalším kroku byla připravená kyselina převedena na amidy, k čemuž bylo využito různých aminů, nesoucích ve své struktuře azidovou či primární alkoholickou funkční skupinu. Amidace byla provedena za různých podmínek, které byly postupně optimalizovány. Takto připravené prekurzory byly následně použity k substituci chlorů v 5,6-dichlor-2,3-dikyanpyrazinu do prvního či druhého stupně. Při těchto syntézách byla zohledněna citlivost kyanoskupin na bazické prostředí a podmínky substituce byly optimalizovány k dosažení co nejvyšší možné čistoty produktu a výtěžnosti reakce, přičemž se nejvhodnějším prostředím pro přípravu těchto prekurzorů ukázal být roztok uhličitanu draselného, resp. hydrogenuhličitanu sodného. Syntetizované molekuly byly popsány NMR spektry, případně i IČ spektry. Připravené prekurzory byly vázány na pevnou fázi, jež byla aktivovaná trichloracetimidátovou nebo propynylovou skupinou. Postup přípravy asymetrických TPyzPz metodou pevné fáze byl zvolen vzhledem k možnosti získat jinak obtížně izolovatelné nesymetrické TPyzPz typu ABBB, kde B jsou části struktury nesoucí na periférii silně polární substituenty.

Abstract

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmaceutical Chemistry and Pharmaceutical analysis

Candidate Michaela Beranová

Supervisor doc. PharmDr. Miroslav Miletín, Ph.D.

Title of thesis Preparation of fluorescent azaphthalocyanines for labeling of oligonucleotide probes I.

Azaphthalocyanines (AzaPc) are macrocyclic compounds with large system of conjugated bonds and are therefore used as dyes and pigments. Their potential as diagnostic and therapeutic means is also under intensive examination. The aim of this thesis is a synthesis of precursors for cyclotetramerization of asymmetric fluorescent tetrapyrzinoporphyrazines (TPyzPz) via solid phase method bearing two various moieties, one suitable for binding to solid phase and the other intended for binding of the final TPyzPz to oligonucleotides. At the beginning of the thesis, basic terms related to AzaPc are defined. Also the main principles of synthesis of TPyzPz as well as possible modifications of their final structure are discussed. An important part of the thesis is the description of the typical properties of TPyzPz, the influence of the structure on the individual parameters and the fields of their use. Afterwards the preparation of each precursor with two different substituents for cyclotetramerization is described. Procedure was started by preparation of the essential intermediate 4-hydroxy-3,5-diisopropylbenzoic acid, a bulky compound preventing aggregation of macrocycles when used as a peripheral substituent. Various methods for the synthesis were used, their efficiency was evaluated and the most yielding one was selected. After 4-hydroxy-3,5-diisopropylbenzoic acid was prepared, it was functionalized to amides using variety of amines bearing an azido moiety or primary alcoholic group. Several methods of amidation were tested and optimized to obtain high yield and purity of the product. Prepared precursors were used for replacement of chlorines in 5,6-dichloro-2,3-dicyanopyrazine to first or second degree. Due to cyanogroups sensitivity to basic environment, the substitution conditions were optimized to obtain pure product and high-yielding reaction. Potassium carbonate or sodium hydrogen carbonate were found the most suitable to run these reactions. The synthesized compounds were characterized by NMR and in majority of cases also by IR spectroscopy. Prepared monomers were bound to the solid phase activated by either trichloroacetimidate group or propynyl moiety. The solid phase method of cyclotetramerization could enable assembly of the ABBB macrocycle with B bearing highly polar peripherally substituted structure.

Obsah

PODĚKOVÁNÍ	- 3 -
ABSTRAKT	- 4 -
ABSTRACT	- 5 -
OBSAH	- 6 -
1. SEZNAM ZKRATEK.....	- 8 -
2. KÓDOVÉ OZNAČENÍ SLOUČENIN.....	- 10 -
3. ÚVOD	- 11 -
4. TEORETICKÁ ČÁST	- 12 -
4.1. SYNTÉZA AZAPC	- 12 -
4.1.1. <i>Syntéza prekurzorů</i>	- 13 -
4.1.2. <i>Syntéza makrocyclu</i>	- 14 -
4.1.3. <i>Kovy</i>	- 15 -
4.1.4. <i>Asymetrie</i>	- 16 -
4.1.5. <i>Modifikace</i>	- 16 -
4.2. VLASTNOSTI AZAPC.....	- 17 -
4.2.1. <i>Absorbce – UV a vis spektra</i>	- 17 -
4.2.2. <i>Fotosenzitivita</i>	- 19 -
4.2.3. <i>Agregace</i>	- 23 -
4.2.4. <i>Acidobazické vlastnosti</i>	- 24 -
4.3. VYUŽITÍ AZAPC.....	- 25 -
4.3.1. <i>Fotosenzitizéry v PDT</i>	- 25 -
4.3.2. <i>Zhášení fluorescence</i>	- 26 -
5. CÍL PRÁCE	- 28 -
6. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	- 29 -
6.1. OBECNÁ SCHÉMATA PŘÍPRAVY	- 30 -
6.1.1. <i>Retrosyntéza I</i>	- 30 -
6.1.2. <i>Retrosyntéza II</i>	- 31 -
6.2. PŘÍPRAVA PREKURZORŮ	- 32 -
6.2.1. <i>SPP-01</i>	- 32 -
6.2.2. <i>SPP-07</i>	- 34 -
6.2.3. <i>SPP-09</i>	- 37 -

6.2.4.	SPP-11	- 38 -
6.2.5.	SPP-14	- 39 -
6.3.	VÁZÁNÍ PREKURZORŮ	- 40 -
6.3.1.	SPP-05	- 40 -
6.3.2.	SPP-08	- 41 -
6.3.3.	SPP-10	- 42 -
6.3.4.	SPP-12	- 43 -
6.3.5.	SPP-20	- 44 -
6.3.6.	SPP-15	- 45 -
6.3.7.	SPP-16	- 46 -
6.3.8.	SPP-17a	- 47 -
6.3.9.	SPP-17b	- 48 -
6.4.	ALTERNATIVNÍ ŘADA PREKURZORŮ.....	- 49 -
6.4.1.	AP-1	- 49 -
6.4.2.	AP-4	- 50 -
6.4.3.	AP-5	- 51 -
6.4.4.	AP-6	- 52 -
6.4.1.	AP-7	- 53 -
6.5.	VAZBA NA PEVNÝ NOSIČ	- 54 -
6.5.1.	SP SPP-17.....	- 54 -
6.5.2.	Trichloracetimidátovaná pryskyřice.....	- 55 -
6.5.1.	SP SPP-16.....	- 56 -
6.5.2.	SP AP-7	- 57 -
6.5.3.	Propargylovaná pryskyřice.....	- 60 -
6.5.4.	SP SPP-10 click.....	- 61 -
7.	DISKUZE	- 62 -
7.1.	SYNTÉZA SUBSTITUENTŮ	- 62 -
7.1.1.	SPP-01, SPP-07, SPP-05, SPP-08	- 62 -
7.1.2.	SPP-09, SPP-11, SPP-14	- 63 -
7.1.3.	SPP-10, SPP-12, SPP-20, SPP-15, SPP-16, SPP-17	- 64 -
7.1.4.	Řada AP.....	- 64 -
7.2.	VAZBA NA PEVNÝ NOSIČ A CYKLOTETRAMERIZACE.....	- 64 -
8.	ZÁVĚR	- 67 -
9.	POUŽITÁ LITERATURA	- 69 -

1. SEZNAM ZKRATEK

AA	kyselina octová
AC	aceton
BF ₃ .OEt ₂	komplex fluoridu boritého a diethyletheru
BuOH	butanol
DAMN	diaminomaleonitril
DBU	1,8-diazabicyklo[5.4.0]undec-7-en
DCM	dichlormethan
DIPEA	<i>N,N</i> -diisopropylethylamin
DMAP	4-dimethylaminopyridin
DMF	<i>N,N</i> -dimethylformamid
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EAC	ethyl-acetát
EDCI	<i>N</i> -ethyl- <i>N'</i> -(3-dimethylaminopropyl)karbodiimid
EE	diethylether
FA	kyselina mravenčí
HEX	hexan
HOBt	<i>N</i> -hydroxybenzotriazol hydrát
IPA	propan-2-ol
ICT	intramolekulární přenos náboje (Intramolecular Charge Transfer)
LiHMDS	lithium bis(trimethylsilyl)amid
MeOH	methanol
MPAB	methylester <i>p</i> -aminobenzoové kyseliny
NMR	nukleární magnetická rezonance
PCR	polymerázová řetězová reakce (Polymerase Chain Reaction)

PET	fotonem vyvolaný přenos elektronu (Photoinduced Electron Transfer)
PHBA	<i>p</i> -hydroxybenzoová kyselina
PTD	fotodynamická terapie
RET	rezonanční přenos energie (Resonance Energy Transfer)
R _f	retenční faktor
ROS	reaktivní formy kyslíku
T	toluen
TBD	1,5,7-triazabicyklo[4.4.0]dec-5-en
TFA	trifluoroctová kyselina
THF	tetrahydrofuran
TLC	tenkovrstvá chromatografie (Thin Layer Chromatography)

2. KÓDOVÉ OZNAČENÍ SLOUČENIN

SPP-01	4-hydroxy-3,5-diisopropylbenzoová kyselina
SPP-05	4-((3-chloro-5,6-dikyanpyrazin-2-yl)oxy)-3,5-diisopropylbenzoová kyselina
SPP-07	methyl-4-hydroxy-3,5-diisopropylbenzoát
SPP-08	dimethyl-4,4'-((5,6-dikyanpyrazin-2,3-diyl)bis(oxy))bis(3,5-diisopropylbenzoát)
SPP-09	<i>N</i> -(3-azidopropyl)-4-hydroxy-3,5-diisopropylbenzamid
SPP-10	<i>N</i> -(3-azidopropyl)-4-((3-chloro-5,6-dikyanpyrazin-2-yl)oxy)-3,5-diisopropylbenzamid
SPP-11	<i>N</i> -(2-(2-(2-(2-azidoethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl)-4-hydroxy-3,5-diisopropylbenzamid
SPP-12	<i>N</i> -(2-(2-(2-(2-azidoethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl)-4-((3-chloro-5,6-dikyanpyrazin-2-yl)oxy)-3,5-diisopropylbenzamid
SPP-14	(4-hydroxy-3,5-diisopropylfenyl)(4-(2-hydroxyethyl)piperidin-1-yl)metanon
SPP-15	<i>N</i> -(2-(2-(2-(2-azidoethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl)-4-((5,6-dikyan-3-(2-(2-hydroxyethoxy)ethoxy)pyrazin-2-yl)oxy)-3,5-diisopropylbenzamid
SPP-16	<i>N</i> -(2-azidoethyl)-4-((5,6-dikyan-3-(4-(4-(2-hydroxyethyl)piperidine-1-carbonyl)-2,6-diisopropylfenoxy)pyrazin-2-yl)oxy)-3,5-diisopropylbenzamid
SPP-17	4-((3-(4-((3-azidopropyl)karbamoyl)-2,6-diisopropylfenoxy)-5,6-dikyanpyrazin-2-yl)oxy)-3,5-diisopropylbenzoová kyselina
SPP-20	5-chloro-6-(2-(2-hydroxyethoxy)ethoxy)pyrazin-2,3-dikarbonitril
AP-1	1-(4-azidofenyl)ethan-1-on
AP-4	1-(4-azidofenyl)propan-1,2-dion
AP-5	5-(4-azidofenyl)-6-oxo-1,6-dihydropyrazin-2,3-dikarbonitril
AP-6	5-(4-azidofenyl)-6-chloropyrazin-2,3-dikarbonitril
AP-7	5-(4-azidofenyl)-6-((2-hydroxyethyl)thio)pyrazin-2,3-dikarbonitril
ZIP-21	5,6-bis(terc-butylthio)pyrazin-2,3-dikarbonitril
ZIP-87	5,6-bis(2,6-diisopropylfenoxy)pyrazin-2,3-dikarbonitril

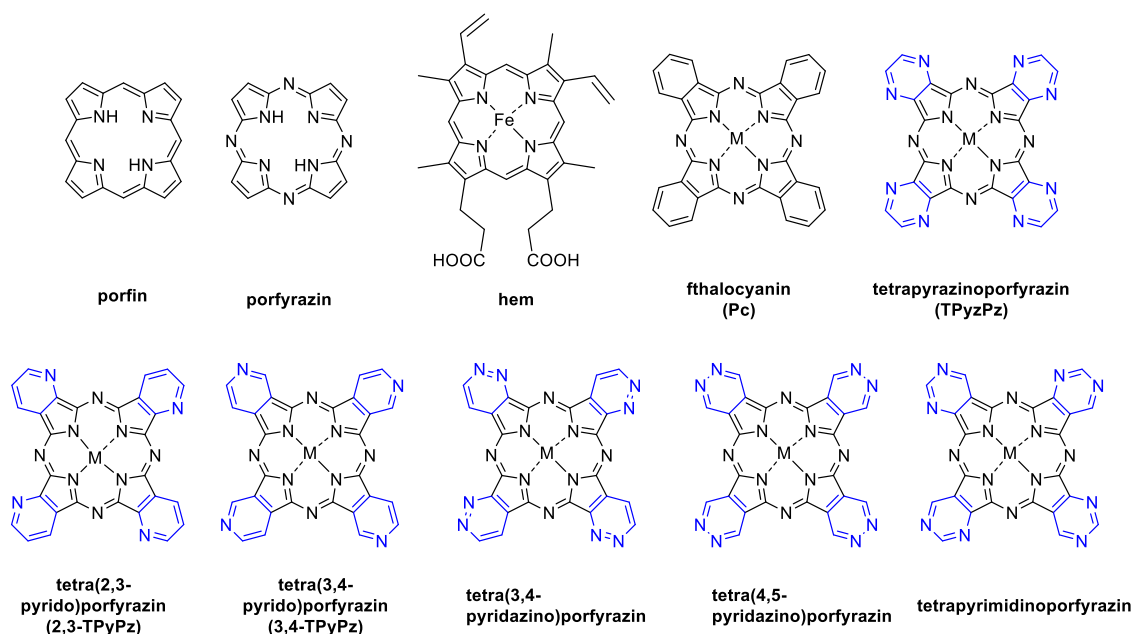
Nekontinuální označení připravených sloučenin je způsobeno tím, že jsme připravili větší množství molekul, z nichž některé se následně ukázaly jako nepřínosné pro náš záměr, a proto nejsou v diplomové práci uvedeny. Různými typy kódu jsou odlišeny sloučeniny dle charakteru vazby substituentu na pyrazinové jádro a látky již dříve připravené spolupracovníky.

3. ÚVOD

Ftalocyaniny (Pc) jsou syntetické sloučeniny, strukturou blízké porfyrinu. Pro své optické, fotofyzikální a fotochemické vlastnosti jsou objektem zájmu vědců mnoha disciplín a našly i praktické uplatnění v řadě oborů. (1) Jejich základní skelet může být obměněn nahrazením některých uhlíků v molekule jinými atomy, nejčastěji se využívají dusíkaté analogy, azaftalocyaniny (AzaPc). Pc a AzaPc jsou ploché makrocycly s rozsáhlým systémem konjugovaných vazeb, díky němuž se tyto sloučeniny staly významnými barvivy a pigmenty. Vložením dalších dusíků do struktury Pc se částečně změní absorpční spektra sloučenin, a tím se do určité míry posouvají možnosti jejich praktického využití. Pc a AzaPc našly během několika desetiletí výzkumu uplatnění v mnoha různých odvětvích, jedním z nich je i oblast zdravotnictví, kde se využívají díky své výjimečné schopnosti produkovat po excitaci aktivní kyslíkové radikály. Některé Pc se uplatňují jako terapeutický prostředek při léčbě nádorových onemocnění a některých kožních onemocnění. Využívají se ale i jejich další vlastnosti, jimiž jsou schopnost emitovat fluorescenci a také schopnost fluorescenci zhaset. Především mají AzaPc potenciál využití pro značení oligonukleotidových sond při diagnostice genetických chorob nebo při monitoringu multiplikace DNA pomocí PCR v reálném čase. Široké využití Pc a AzaPc je umožněno jejich rozmanitou strukturou, již lze modifikovat jak na základním cyklickém skeletu, tak i formou různých periferních i neperiferních substituentů. Oba typy modifikací dalekosáhle ovlivňují všechny fotochemické a fotofyzikální vlastnosti výsledných sloučenin. My jsme se snažili ověřit alternativní možnost syntézy takových AzaPc, které by se mohly vázat na oligonukleotidové sondy, a které by se zároveň rozpouštěly ve vodě lépe než většina doposud připravených sloučenin tohoto typu. Současně jsme chtěli zamezit agregaci, což je jedna z negativních vlastností AzaPc, bránící plnému využití jejich potenciálu.

4. TEORETICKÁ ČÁST

AzaPc jsou dusíkaté deriváty, tzv. aza-analogy Pc, což jsou organická barviva zkoumaná již po řadu let. Termín aza-analogy znamená, že některé uhlíky v makrocyclickém skeletu sloučeniny jsou zaměněny za dusíky. Na základě počtu dusíkových atomů a též jejich pozice v jádře rozlišujeme několik druhů záměny v makrocyklu (benzen za pyridin, pyrimidin, pyrazin, pyridazin), v této práci se budeme soustředit na tetrapyrazinoporfyraziny (TPyzPz), ve kterých dusíky nahradily methinové skupiny v benzenovém kruhu v pozicích 1,4 a jejichž centrální část představuje porfyrazin. Ten svou strukturu odvozuje od porfinu, což je tetrapyrrol, tedy sloučenina vzniklá kondenzací čtyř pyrrolových jader, a to přes methinové můstky. (2) Tento kondenzovaný heterocykl se vyskytuje i jako základ důležitých molekul v lidském těle, kde váže železnaté ionty jako hem a formou hemoglobinu tak může plnit funkci krevního barviva.



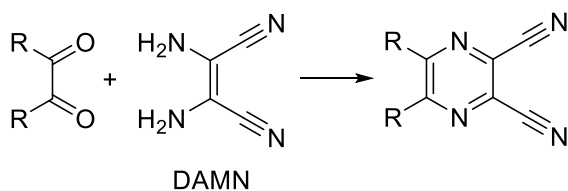
Obrázek 1 - Struktury obecných makrocyklů založených na porfinovém jádře

4.1. Syntéza AzaPc

Příprava AzaPc a všech struktur podobných Pc se skládá z několika stupňů. Nejprve je potřeba připravit vhodné prekurzory – monomery, jejichž zacyklením neboli cyklotetramerizací vznikají makrocykly.

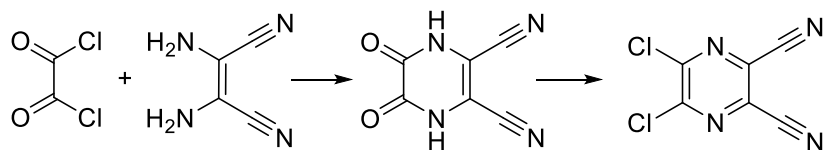
4.1.1. Syntéza prekurzorů

AzaPc vznikají cyklotetramerizačními reakcemi substituovaného či nesubstituovaného prekurzoru, kterým je ve většině případů pyrazin-2,3-dikarbonitril. (3) Právě nitrilové skupiny dělají tento prekurzor nejvhodnější, ve výsledné sloučenině totiž tvoří centrální pyrrolová jádra a podílí se i na výstavbě azomethinových můstků mezi jednotlivými pyrrolovými kruhy. Výše uvedený prekurzor může být připraven kondenzační reakcí z alifatických výchozích látek – vicinálním diketonem a diaminomaleonitrilem (DAMN). Tyto dvě sloučeniny spolu reagují v kyselém prostředí, představovaném kyselinou octovou či roztokem kyseliny chlorovodíkové. (2)



Obrázek 2 - Schéma přípravy pyrazin-2,3-dikarbonitrilu

Substituenty, vázané na volné uhlíky v heterocyklu, se po tetramerizaci budou nacházet na periférii makrocyklu. Fáze, ve které se substituenty připojují, je určena tím, zda je prvním atomem substituentu, sousedícím s kruhem, heteroatom. Pokud jím je, je výhodné využít jako výchozí vicinální dioxosloučeninu dichloroethanal. Výsledný pyrazin (5,6-dichlorpyrazin-2,3-dikarbonitril), vzniklý dvoustupňovou reakcí přes odpovídající dioxoderivát, je substituovaný chlorem, který je elektrondeficientní a ochotně odstupuje nukleofilním skupinám, jakými jsou alkoxidy, thioly a aminy. (2)



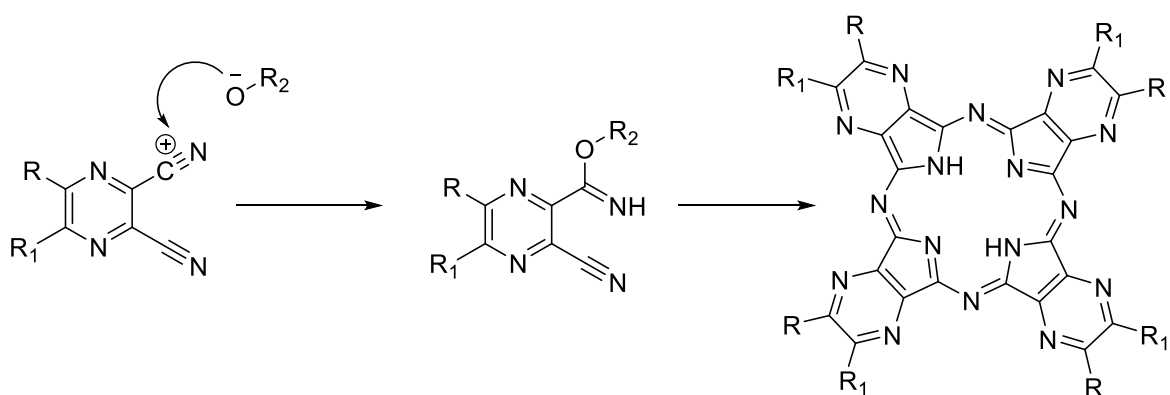
Obrázek 3 - Schéma přípravy 5,6-dichlorpyrazin-2,3-dikarbonitrilu

Pokud se nukleofilní substituce provede ve dvou krocích s různými sloučeninami, lze docílit vzniku asymetricky substituovaných AzaPc. V prvním kroku, kdy dochází ke vzniku monosubstituovaných makrocyklů, je však nutné chlazení. (3) V případě substituentů vázaných přes uhlík je lepší je do sloučeniny zakomponovat ještě před kondenzací ve formě příslušného diketonu či α -ketokyseliny.

I když není DAMN jediným prekurzorem pro kondenzaci, je jedním z nevhodnějších, jelikož u dalších možných sloučenin je třeba myslet na donory dusíku, díky čemuž čistota produktu klesá.

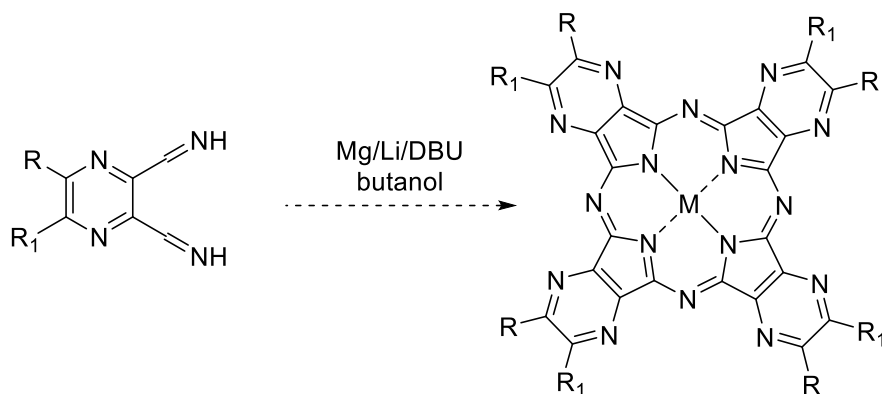
4.1.2. Syntéza makrocyklu

Další krok syntézy AzaPc je cyklotetramerizace, k níž jsou potřeba čtyři molekuly pyrazin-2,3-dikarbonitrilu a jejíž mechanismus může probíhat dle dvou různých schémat. První je iniciováno nedostatkem elektronů na nitrilovém uhlíku. Nukleofilní skupiny jako alkoholátové jsou elektrondeficienci přitahovány a uhlík atakují, tím jako meziproduct reakce vzniká alkylkarboximidát. Ten napadá další kyanoskupiny do vytvoření tetrameru. Takto vznikají TPyzPz bez centrálního atomu kovu. (4)



Obrázek 4 - Schéma cyklotetramerizace za iniciace alkoholátu

Druhou možností je právě využití templátového efektu kationtu kovu. Ten kolem sebe seskupí jednotlivé monomery, které se tím k sobě dostanou na těsnou vzdálenost a za dodání energie vytvoří makrocyklus. Použitý kov je samozřejmě chelátován ve výsledném makrocyklu. Tento mechanismus dosahuje menší výtěžnosti, ovšem s výhodou se využívá u monomerů s alkoxy- a aryloxysubstituenty, kde brání štěpení a nahrazování substituentů (viz dále).



Obrázek 5 - Schéma cyklotetramerizace za využití templátového efektu kationtu kovu

Podmínky reakce závisí především na charakteru substituentů a centrálním atomu kovu. Pokud jsou substituenty elektron odtahující zvyšují tak reaktivitu nitrilové skupiny a reakce může úspěšně proběhnout už za mírně zvýšené teploty, ale pouze v případě, že výsledný makrocyclus bude bez centrálního atomu kovu. Naopak jedná-li se o skupinu, jež je donorem elektronů, snižuje se rychlost reakce a jsou vyžadovány extrémnější podmínky. Za těchto podmínek je nutné využít vysoko vroucích organických rozpouštědel, těmi jsou chinolin, dimethylformamid, *N,N*-dimethylacetamid, *N,N*-dimethylaminoethanol. (3) Vysoká teplota ovšem může vyvolat problém se stabilitou navázaných substituentů, především alkylsulfanylových a alkoholátových skupin, jež mohou být případně nahrazeny jinou přítomnou nukleofilní skupinou, např. alkoholátem. Alkylaminoskupiny jsou naopak relativně stálé. (2) Jejich stabilita je také ovlivněna použitím různých kovů obsažených v alkoholátech. Většinou se využívají lithné nebo hořečnaté alkoholáty, přičemž lithné sloučeniny jsou reaktivnější, a proto se u labilních funkčních skupin, jako jsou alkylsulfanylové deriváty, používá druhý zmíněný typ alkoholátu. (5) Navíc při použití hořečnatých sloučenin dochází k podpoře průběhu reakce díky templátovému efektu kationtu kovu, a substituenty jsou tedy nepříznivým podmínkám vystaveny kratší dobu. (3) Snaha o zvýšení stability vazby substituentů díky použití objemných skupin, které by stericky bránily reaktivním radikálům, se ukázala jako lichá a rozměry substituentů nemají na stabilitu tak silný vliv, jak se myslelo, (2) vyjma některých substituentů jako jsou *n*-oktylsulfanyl nebo *tert*-butylsulfanyl. (6)

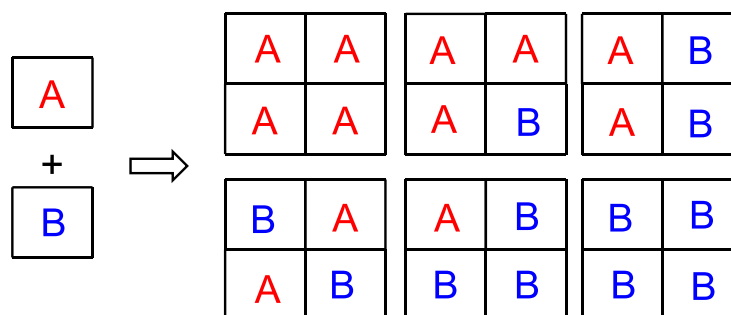
4.1.3. Kovy

Koordinčně se do centra makrocyclu může navázat mnoho různých druhů kovů, které následně ovlivňují vlastnosti konečných sloučenin. V této práci se budeme zabývat diamagnetickými kovy a polokovy (Zn, Mg), jelikož je jejich vliv výrazný především v oblasti fotochemických vlastností sloučenin (viz dále).

Atom kovu se může do sloučeniny inzerovat i po využití alkoholátu jako iniciátoru přípravy porfyrzinového jádra, tedy bez použití kovového templátu. Jedná se o vcelku nenáročnou reakci, kdy se do nekovového makrocyclu pouze komplexuje atom kovu. Vše probíhá za zvýšené teploty v přítomnosti vhodné soli obsahující požadovaný kov. (7) Ty mohou nejčastěji představovat bezvodé acetáty či chloridy. (2) Někdy může být zdrojem samotný kov, (7) (8) zde je ovšem potřeba v určitých případech přidat močovinu nebo molybdenan amonný jako katalyzátor. Celá reakce probíhá ve vysokovroucím organickém rozpouštědle. (2)

4.1.4. Asymetrie

Kvůli specifickým požadavkům na vlastnosti AzaPc bylo třeba vyvinout syntézu makrocyclů, které by obsahovaly různé substituenty a nebyly by složeny pouze z jednoho typu monomeru. Přestože je známo několik selektivních metod, je dnes nejvyužívanější metodou statistická kondenzace, (2; 3) kde se k separaci všech produktů užívá chromatografických metod. V průběhu syntézy totiž vznikají všechny statisticky možné kombinace dvou prekurzorů A a B, tedy AAAA, AAAB, ABAB, AABB, ABBA a BBBB. To je výhodné, pokud jsou všechny sloučeniny předmětem studia, v opačném případě tak klesá výtěžnost reakce. (2) Navíc pokud pyrazinové jádro nese polární substituenty, je izolace jednotlivých kongenerů metodou sloupcové chromatografie složitá. Dalším nevídaným jevem je agregace produktů, které bude věnována samostatná kapitola.



Obrázek 6 - Schéma vzniku šesti kongenerů statistickou kondenzací

Speciálním druhem statistické kondenzace je využití původní nevýhody u mechanismu postupné tetramerizace pomocí alkoholátů (viz výše). Reakce tedy vychází z jednoho prekurzoru nesoucího jeden typ alkoholátů a druhý monomer makrocyclu vzniká in situ záměnou některých aryloxy substituentů za alkoholát použitý pro iniciaci cyklotetramerizace. (3)

4.1.5. Modifikace

Úprava hotové molekuly AzaPc se provádí pouze z vážných důvodů, protože riziko poškození její struktury je příliš vysoké. Zvláště pokud přihlídneme k náročné syntéze, a především velmi komplikované izolaci. Nicméně se k nim přistupuje ve třech konkrétních případech. Zaprvé se AzaPc modifikují, pokud je cílem příprava makrocyclů s kvartérními amoniiovými substituenty. Cyklotetramerizací prekurzorů již nesoucích kvartérní amoniiové skupiny totiž porfyrinový skelet nevzniká. Je proto nutné, aby byly připraveny AzaPc s terciárními aminy na periferii a jejich kvarternizace byla provedena následně. (9) Ve druhém případě postcyklotetramerizační úpravy se jedná o optimalizaci struktury substituentů kvůli dalšímu využití v různých oblastech. Jde o

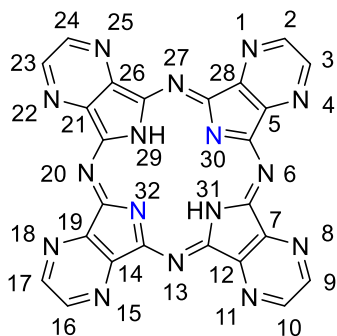
vázání na různé nosiče se specifickými vlastnostmi. Těmi mohou být různé polymery či jiné nosiče upravující vlastnosti AzaPc pro následné technologické zpracování. (10) Posledním důvodem pro postcyklotetramerizační úpravy je příprava nestabilních substituentů. Jedná se o funkční skupiny, které by v podmínkách cyklotetramerizace podlely nezamýšleným změnám. Mnoho takových substituentů je potřeba pro navázání AzaPc na biomolekuly, kterými jsou např. oligonukleotidové sondy. (3) I této problematice se věnuje praktická část diplomové práce.

4.2. Vlastnosti AzaPc

4.2.1. Absorbce – UV a vis spektra

Pro Pc a sloučeniny od nich odvozené je schopnost absorpce ve viditelné oblasti spektra důležitou charakteristikou. Schopnost absorbovat záření určité vlnové délky jim dává rozsáhlý systém konjugovaných vazeb. Na základě pozice jejich absorpčního pásu mohou ve viditelném spektru nabývat různých barev anebo vytvářet jiné fotochemické jevy, pro něž nacházíme široká uplatnění mimo jiné i ve fotodynamické terapii (viz dále).

AzaPc mají výrazný Q-pás ve vlnových délkách mezi 600 a 700 nm s relativně vysokým extinkčním koeficientem přes 200 000 M⁻¹ cm⁻¹. B-pás neboli Soretův se naopak nachází v oblasti světla modré barvy ve viditelné části spektra (okolo 360–370 nm). Právě díky těmto pásům se uskutečňuje π - π^* přenos elektronů. Především Q-pás, jeho tvar a plocha, je velmi citlivým ukazatelem při zkoumání vlivu struktury, odhalí i fyzikálněchemické změny v rozpustnosti či interakce s jinými molekulami. U makrocyclů s heteroalkylovým substituentem se může projevit i absorpce v novém pásu, a to nejčastěji v oblasti vlnových délek 420–520 nm. Občas dochází pouze k projevu částečného přenosu ve formě ramena. Celý tento jev je popisován jako n - π^* přenos samotného páru elektronů v ne vazebném orbitalu heteroatomu. (11) Signifikantněji jej však lze pozorovat u AzaPc bez centrálního atomu kovu, což vede k teorii, že centrální dusíky N³⁰ a N³² se značnou měrou podílejí na intenzitě tohoto přenosu. (12)



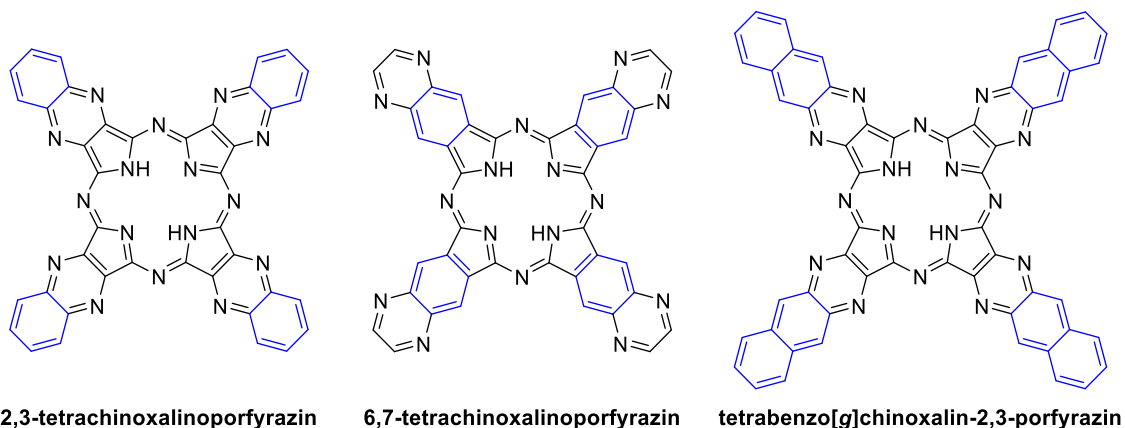
Obrázek 7 - Očíslovaný vzorec TPzPz

Zde se dostáváme k rozdílu TPyzPz oproti Pc, protože záměna methinových skupin za dusíky způsobuje hypsochromní posun pozice Q-pásu, a to v rozsahu 40-60 nm. (6) Vliv na jeho přesnou pozici může mít mnoho různých faktorů. Projevuje se zde mnoho strukturních efektů díky velké skupině různých substituentů a zejména nelze opomenout ani vliv centrálního atomu kovu. Jeho bathochromní posun se projevuje se stejnou tendencí jak u substituovaných, tak u nesubstituovaných makrocyclů – nejvyšší posun vykazují komplexy se $ZrCl_2$, o něco menší efekt se projeví u atomu mědi a zhruba odpovídá skupině $SiCl_2$, ještě menší posun způsobují atomy zinku a hořčíku a nejmenší posun je pak zaznamenán u sloučenin s kobaltem. (13; 5; 14)

Na výsledné pozici Q-pásu se také z velké části projevuje charakter atomu, jenž připojuje periferní substituent, protože pouze tak se mohou případné volné elektrony substituentu zapojit do konjugace v jádře. Pouhý alifatický uhlík jako substituent nemá na posun vůbec žádný vliv a dá se svými hodnotami téměř srovnat s nesubstituovanými makrocycly. (14) Stejně tak pokud na něj navážeme další aromatické jádro, jeho efekt na posun je pořád téměř nulový. Kyslíkový můstek způsobuje jako jediný hypsochromní posun, v ostatních případech, ať už se jedná o síru nebo dusík je způsoben posun bathochromní. (2)

Případné napojení dalšího konjugovaného π systému lze částečně uskutečnit i přes mírnou rotaci aromatických jader. Rozdíl vlnové délky se projevuje i v počtu členů připojeného cyklu. Šestičlenné cykly, jako pyridinyl a fenyl, způsobí posun cca o 30 nm a pětičlenné, například thiofenyl a furanyl, dokonce až o 50 nm do vyšších vlnových délek. (2) Tato skutečnost je zapříčiněna menším sterickým bráněním mezi dvěma *ortho*-substituenty aromatického kruhu, a díky tomu lepší konjugací. Délku posunu ovlivňuje i poloha heteroatomu vůči vazbě na tetrapyrazinoporfyrazin, přičemž 2-yl izomer napomáhá bathochromnímu posunu přibližně o 12 nm více oproti 3-yl izomeru. Výrazný bathochromní posun (až o 40 nm) můžeme sledovat po prodloužení chromoforu díky konjugaci s acetylenovou skupinou. Na podobném principu funguje i navázání styrylových substituentů, které díky rozšíření konjugovaného systému způsobí ještě silnější bathochromní posun. (2)

Další způsob, jak docílit posunu, je rozšíření TPyzPz makrocyclu. Toho lze dosáhnout přidáním dalšího benzenového kruhu a tím vytvořit jeden z chinoxalinoporfyrazinů. Výsledný posun se liší tím, zda je benzenový kruh připojen za pyrazinový (tetra-2,3-chinoxalinoporfyrazin), nebo je vmezeřen mezi porfyrazin a pyrazin (tetra-6,7-chinoxalinoporfyrazin). (15) V prvním případě je posun bathochromní asi o 80 nm, kdežto ve druhém se Q-pás posune až o 120 nm do vyšších vlnových délek.



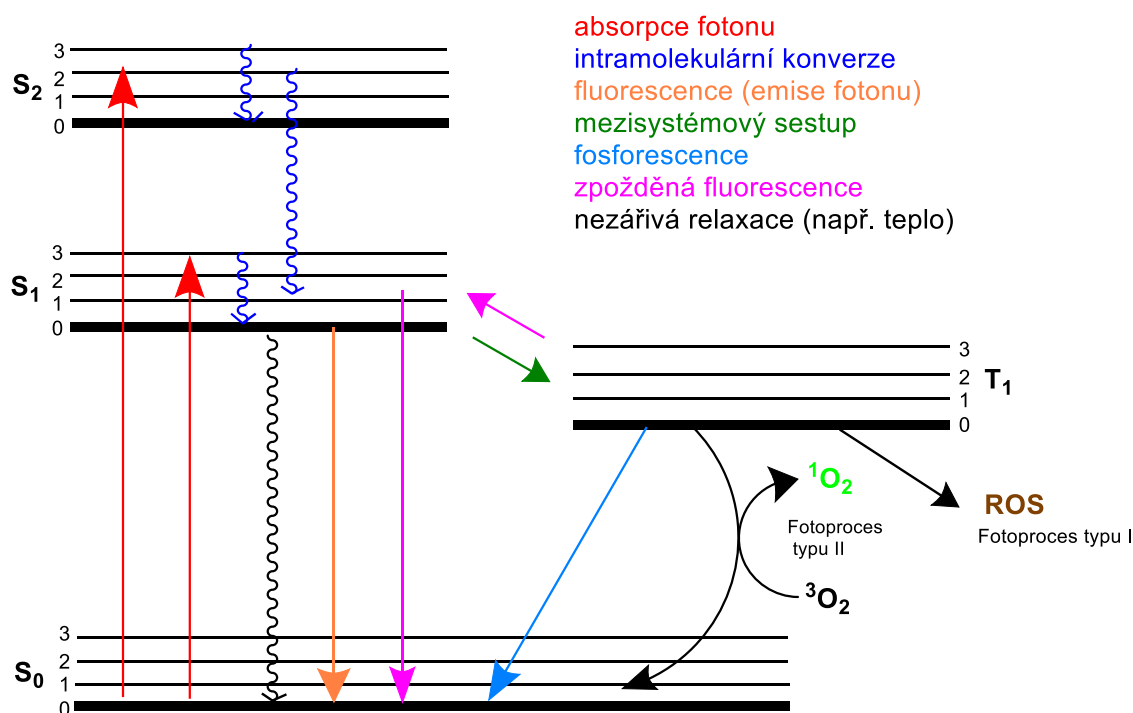
Obrázek 8 - Obecné vzorce některých AzaPc s rozšířenými makrocycly

Postupným přidáváním dalších benzenových kruhů k chinolinovým jednotkám posun Q-pásu lineárně narůstá vždy o 22 nm. Kombinací několika benzenových kruhů a chinolinu vznikne tetrabenzo(g)chinoxalin-2,3-porfyrazin, který absorbuje elektromagnetické záření o vlnové délce dokonce přes 800 nm. (16)

Bylo provedeno ještě mnoho dalších úprav struktury AzaPc včetně přípravy asymetrických jader s a bez centrálního atomu kovu, většina z nich způsobuje bathochromní posun. (5; 15)

4.2.2. Fotosenzitivita

AzaPc mohou přijetím energie dosáhnout excitovaného stavu, zajímavé jsou jejich tzv. relaxační cesty neboli způsob, jakým z vyšší energetické hladiny opět klesají do základního stavu. Běžně se uvolňuje nadbytečná energie formou tepla, dále je častá fluorescenční emise fotonu a setkáváme se i se systémovým přechodem do tripletového stavu. V tomto energetickém mezistupni může molekula zbytek energie opět vyzářit jako fluorescenci, ztratit ji odtržením elektronu či protonu a jednoduše ho předat sousedním molekulám (fotoproces typu I), nebo může molekula předat energii kyslíku fotoprocesem typu II. (2) Všechny tyto možnosti přesunu graficky přehledně znázorňuje modifikovaný Jablonského diagram. Pravděpodobnost odevzdání energie určitou cestou lze vypočítat a udávat v kvantových výtěžcích (quantum yields). Je to množství jednotek daného procesu (molekul singletového kyslíku, emitovaných fotonů apod.) na počet absorbovaných fotonů. (3)



Obrázek 9 - Modifikovaný Jablonského diagram, podle (17)

4.2.2.1 Fluorescence a produkce singletového kyslíku

Obě tyto vlastnosti celé skupiny Pc spolu úzce souvisí co do podstaty i co do významu. Vznik velmi agresivního, cytotoxického radikálu, jakým je singletový kyslík, hraje významnou roli ve fotodynamické terapii. Jeho princip je založen na vlastnostech fotosenzitizéru, který po absorbování záření dané vlnové délky přechází do excitovaného tripletového stavu a pro navrácení se do energeticky optimálního stavu přenáší energii na základní stav molekulárního kyslíku. To má za následek vznik excitovaného stavu kyslíku označovaného jako kyslík singletový (¹O₂). Jeho vzniku předchází inverze spinu jednoho z elektronů vnějšího orbitalu.

Fotosenzitizér může vysokou hladinu absorbované energie uvolnit i v jiné formě – emisí fotonů neboli fluorescencí. I tato vlastnost nalézá využití v medicíně, a to především v diagnostice.

4.2.2.1.1. Struktura makrocyclu

Při porovnání stejných vlastností u Pc a jejich dusíkových analogů se ukazuje, že AzaPc mají vyšší tendenci k fluorescenci než k produkci singletového kyslíku. U Pc je situace zcela opačná. AzaPc by proto mohly nalézt využití při fluorescenčním značení sond (viz dále).

4.2.2.1.2. Centrální ionty

Na to, která emise u sloučeniny převládne a v jakém množství, mají vliv především centrální ionty kovu a periferní substituenty. Všeobecně vyšší hodnotu kvantového výtěžku singletového kyslíku mají AzaPc se zinkem jako centrálním iontem ($\phi_{\Delta} = 0,53-0,68$ (17); $\phi_{F^{\circ}} = 0,26$ (3)). Naopak je tomu u komplexů hořčíku, jenž emituje výraznou fluorescence ($\phi_{\Delta} = 0,25$ (3); $\phi_{F} = 0,50-0,73$ (17)). Tato situace nastává díky efektu těžkého atomu. To znamená, že čím vyšší atomové číslo má chelatovaný kov, tím více inklinuje k jiným systémovým přechodům, než je fluorescence. Lze dokonce vysledovat linearitu mezi nárůstem kvantových výtěžků singletového kyslíku a zvyšujícím se atomovým číslem. Naopak nepřímo úměrně klesají kvantové výtěžky fluorescence. (2) Pokud v sobě žádný centrální kov sloučenina neobsahuje, emituje sníženou hladinu jak singletového kyslíku, tak fluorescence. Její energie je totiž uvolněna skrze kompetitivní procesy, jako například kolizemi. (2)

4.2.2.1.3. Substituenty

Stejně důležitou roli v hodnotách emisí hrají i substituenty. Konkrétně záleží na tom, ve kterých polohách jsou substituenty vázány a zda jsou připojeny přes heteroatom a popřípadě přes který. Z hlediska fluorescence je velmi výhodným heteroatomem kyslík, neboť právě u TPyzPz se substituenty napojenými přes kyslík je emise nejvyšší. Síra se stává velmi výhodnou díky svým fotodynamickým vlastnostem, alkylsulfonylové substituenty mají totiž nejvyšší produkci singletového kyslíku. Naopak TPyzPz s dusíkatými substituenty neprodukuje téměř žádná nebo jen velmi malá množství kvant jak singletového kyslíku, tak i fluorescence. Typ alkylové části substituentu nehraje zásadnější roli, ať je alifatický či cyklický, vliv heteroatomů je analogický. Fotodynamická aktivita pouze alkylsubstituovaných derivátů bez připojení přes jakýkoliv heteroatom vychází méně výhodně, avšak hodnoty fluorescenčních kvant jsou vyšší. (2)

4.2.2.2 Zhášení fluorescence

I tento jev patří mezi fotochemické a fotoelektrické vlastnosti AzaPc. Jedná se o AzaPc se sníženou schopností fluorescence, či její naprostou absenci. V principu jde o jiný typ snížení energetické hladiny excitovaného stavu molekuly, ke kterému dochází různými mechanismy, které jsou popsány dále. Jedná se o kompetitivní průběh deaktivace excitovaného stavu molekuly oproti předešlým procesům. Pokud je molekula schopna tohoto přenosu energie, pak tyto mechanismy obvykle převládají díky své rychlosti. (3) Zhášeče vycházejí pouze z několika strukturálních typů. AzaPc jsou speciálním typem zhášečů tzv. „dark quenchers“ neboli temné zhášeče, které postrádají schopnost vnitřní fluorescence, což je s výhodami využíváno při

monitoringu průběhu molekulárně biologických a biochemických reakcí (viz dále). (18) Také jejich schopnost vytvářet singletový kyslík by měla být snížena ideálně na minimum. V těchto případech jsou jako substituenty často využívány alkylamino- a dialkylamino- skupiny, z nich pak nejčastěji diethylamin. (19) Pokud dojde nějakým způsobem k excitaci fluoroforu, uvolní nadbytečnou energii formou emise fotonu (fluorescence), aby se vrátil do základního stavu. Uvolněnou energii zachytí molekula quencheru, efektivita záchyty přitom závisí na vzdálenosti obou molekul. Záchyt fluorescence vyvolá excitaci quencheru, ten se v případě AzaPC relaxuje nejčastěji dvěma způsoby. (19; 20; 21) Prvním z nich je PET (photoinduced electron transfer), který nastává u molekul, v jejichž struktuře není dusík v periferním substituentu vázán bezprostředně na makrocyklus a není s ním ani jinak v přímé konjugaci, což zapříčiní vynucený přeskok elektronu z donorové na akceptorovou skupinu. Druhým způsobem, jímž se přeuspořádává přenesená energie, je mechanismus ICT (intramolecular charge transfer). Pro rychlý ICT je nutné, aby byl substituent zhášče na jádro napojen přímo přes atom dusíku nebo jiný elektrondonorový atom či skupinu. Díky jeho volnému elektronovému páru a konjugaci, do které se zapojuje, je hustota náboje po excitaci rychle přerozdělena v molekule a proces deaktivace jádra tak nedoprovází radiace. (18; 3) Během přenosu totiž na okamžik dochází k výraznému posílení charakteru násobné vazby právě mezi dusíkem a zbytkem molekuly kvůli přesunu volného elektronového páru z dusíku v rámci konjugovaného systému, a to až do té míry, že vzniká i intramolekulární stav oddělených nábojů (charge separated state). (22) Obdobnému jevu dochází v případě, kdy je dusík konjugován k makrocyklu přes aromatický článek. (23; 24)

4.2.2.2.1. Statické zhášení

Nejčastějším mechanismem metod detekce je statické zhášení, kde se efekt zakládá na tom, že fluorofor a zhášec jsou spolu v těsné blízkosti (20 Å) (25; 7) a vytváří tak spolu nefluoreskující komplex. Tento dimer reaguje na excitaci jinak než jeho jednotlivé komponenty a celkově výsledné vlastnosti komplexu nejvíce závisí na orientaci a velikosti jednotlivých dipólových momentů. Obě sloučeniny se nachází v základním energetickém stavu.

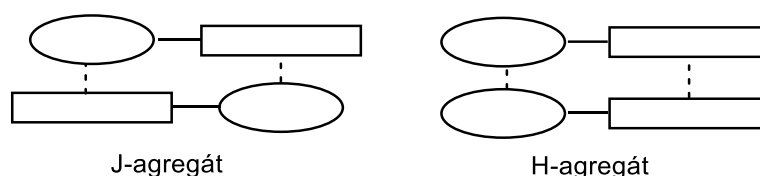
4.2.2.2.2. Dynamické zhášení

Detekce probíhá i díky dalšímu mechanismu přenosu energie mezi molekulami, kterým je dynamické zhášení známé jako RET (resonance energy transfer). Ani při tomto mechanismu donor energie neemituje foton, a tedy nedochází k fluorescenci. (26; 27) A i tento přenos energie je realizován dvěma různými způsoby. Tím hlavním je Försterův mechanismus, fluorofor

předává svou energii excitovaného stavu elektronu quencheru, a tím ho excituje. Tato schopnost molekul je limitována dvěma faktory, prvním z nich je rozsah absorpčního spektra, které se musí z části překrývat spektrum emisní. To je jedna z výhod AzaPc jako zhášečů, jelikož jejich rozsah je velmi široký, a to především ve vysokých vlnových délkách nad 630 nm, (19) kam spektra většiny ostatních typů zhášečů nedosáhnou, s výjimkou BBQ® 650 a BHQ®-3. Druhým omezením je vzdálenost mezi fluoroforem a quencherem. Tento fakt je zapříčiněn interakcí dipólů, jež se ovlivňují do vzdálenosti 20-100 Å. Pro každou dvojici makromolekul je tato vzdálenost specifická a označuje se jako Försterův poloměr (R_0), což je vzdálenost, při níž je efektivita přenosu energie mezi fluoroforem a zhášečem přesně 50 %.

Druhý mechanismus se nazývá Dexterův nebo také kolizní zhášení a dochází k němu pouze při prostorovém překryvu orbitalů obou makromolekul, tedy na relativně krátkou vzdálenost, což omezuje jeho využití u DNA sond. Značnou nevýhodou dynamického zhášení oproti statickému je skutečnost, že absorpční spektrum quenchera musí z větší části překrývat emisní spektrum fluoroforu, jinak dochází k výraznému šumu, což výrazně omezuje možnosti jeho využití.

Dle měření dosahuje celkově účinnost zhášení 96 %, u dark quachers pak až dokonce přes 99 %. (3) To záleží především na typu komplexu, přičemž rozlišujeme dva typy – H-dimer (sendvičový, face-to-face dimer) u něhož je díky přesně opačné orientaci dipólů emise fluorescence výrazně snížena, nebo J-dimer, kde jsou zpravidla kvantové výtěžky fluorescence vyšší.



Obrázek 10 - Schématické znázornění J- a H-dimerů

4.2.3. Agregace

AzaPc mají vzhledem ke své planární struktuře vysokou tendenci sesedat (agregovat) vlivem silných π - π interakcí. (28) Je to jedna z jejich nežádoucích vlastností. Zásadně snižuje rozpustnost komplexů, komplikuje jak proces izolace, tak čištění produktů, (18) a navíc zkracuje poločas tripletového stavu, což silně negativně ovlivňuje účinnost AzaPc při fotodynamické terapii, a jelikož agregované makrocikly uvolňují svou energii v excitovaném stavu převážně teplem, nejsou fotochemicky aktivní. Tento problém se řeší volbou vhodného periferního substituentu, který stericky zabrání přiblížení další molekuly AzaPc. (5)

Jev agregace lze objektivně měřit pomocí konstanty dimerizace (K_d). (2) Touto metodou se porovnálo a průkazně zjistilo, že prostorově objemnější substituenty jako *terc*-butyl zabraňují

sedimentaci více než substituenty ve formě dlouhého uhlíkového řetězce. Navíc se zjistilo, že se nežádoucí vlastnost sesedání více projevuje u AzaPc než u samotných Pc. (5) Největším problémem agregovaných dimerů je jejich nerozpustnost v polárních rozpouštědlech, tedy především ve vodě, protože v takovéto formě nemohou ani dostatečně lipofilní sloučeniny prostupovat buněčnými membránami a pro účely PDT jsou tak nepoužitelné. (2)

Jeden ze substituentů, který příznivě ovlivňuje agregaci, je *terc*-butyl a v *ortho* polohách k napojujícímu heteroatomu pak fenoxyskupiny, jež stericky brání i tvorbě asociované pevné vrstvy. (29) Pro prevenci agregace lze využít i centrální atom, pokud je čtyřvazný. Na jeho dvě zbývající vazby lze navázat substituenty tyčící se pod a nad úroveň planárního makrocyklu a lze tak efektivně zabránit tvorbě agregátů. Ovšem objemnost substituentů lze využít pouze v nepolárních rozpouštědlech.

Pro rozpustnost v polárních rozpouštědlech se často využívá změny náboje v substituentech. U TPyzPz se všemi nabitými (nejčastěji kvarternizovanými) substituenty je velmi dobrá rozpustnost ve vodě, podpořená vytvořením hydrochloridu sloučeniny. (30) Počet nábojů musí být ovšem dostatečný. Při počtu čtyř nabitých substituentů z osmi možných se zlepší vlastnost solubilizace, problém agregace se ovšem neřeší. Pro absolutní monomerizaci sloučeniny je nezbytně nutné, aby všech osm substituentů bylo s nábojem. Lze využít jak kladně nabitě substituenty jako aminoskupiny, tak i záporně nabitě substituenty jako karboxylové nebo sulfonové skupiny.

Rozpustnost hraje nejdůležitější roli především v následné distribuci v lidském těle, kde je vodné prostředí, ovšem jednotlivé kompartmenty jsou odděleny lipidovou dvojrivrstvou. Proto je důležitý koeficient rozpustnosti v polárních a nepolárních rozpouštědlech, jinak látky nedosáhnou místa účinku a jejich terapeutická hodnota klesá.

4.2.4. Acidobazické vlastnosti

Hlavní vliv na tyto vlastnosti mají dusíky přítomné v azomethinových skupinách a v pyrazinu. Pokud se v makrocyklech nevyskytují centrální ionty kovu, hrají zde zásadní roli i kyselé vodíky pyrrolových cyklů a sloučeniny se mohou chovat jako *N*-kyseliny. Z tohoto důvodu mohou mít některé AzaPc amfoterní charakter. (2) Při srovnání acidobazických vlastností TPyzPz a Pc vychází AzaPc jako méně zásadité. Tento jev lze vysvětlit elektrony odtahujícím efektem pyrazinových kruhů a také to zdůvodňuje, proč mají AzaPc bez centrálního atomu kovu kyselý charakter. Proto se primárním cílem při protonizaci nestávají centrální dusíky, nýbrž periferní pyrazinové dusíky. Pokud se v tetrapyrazinoporfyrazinech vyskytují periferní substituenty s dusíkem, automaticky

se z nich stávají primární cíle protonizace v přítomnosti i relativně slabých kyselin, jako je kyselina octová. (2)

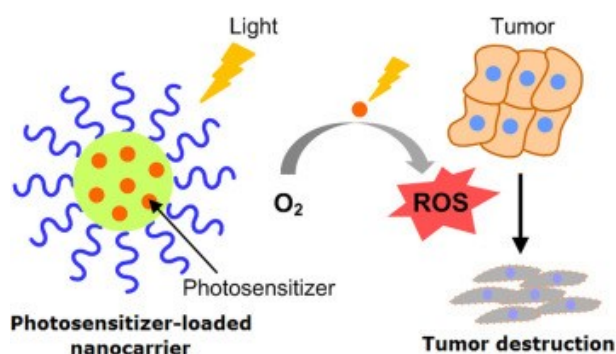
Chování snadno odstupujících vodíků centrálních dusíků u AzaPc bez centrálního atomu kovu lze pozorovat při zkoumání UV-VIS spekter. V zásaditém prostředí, kde se sloučeniny stávají úplně deprotonované (na obou dusících zároveň), totiž jejich spektra v podstatě odpovídají svým analogům s centrálním iontem kovu, protože nabývají symetrické struktury. (12)

Nekovové formy AzaPc mohou tvořit se slabě bazickými sloučeninami (aminy, DMF, pyridin) stejně jako nekovové Pc tzv. proton-transferový komplex, ve kterém není centrální vodík zcela odstraněn. Rychlost utváření tohoto stavu opět do velké míry závisí na substituentech navázaných na makrocyclech. Donory elektronů (např. diethylaminoskupina) formování stavu zpomalují, jelikož snižují aciditu centrálních vodíků. Naopak elektron odtahující skupiny zvyšují rychlost procesu. (2)

4.3. Využití AzaPc

4.3.1. Fotosenzitizéry v PDT

Fotodynamická terapie (PDT – photodynamic therapy) je jedním z nejnovějších způsobů zobrazení a léčby především nádorových a kožních chorob. Mechanismus léčby je založen schopnosti Pc a AzaPc po excitaci produkovat singletový kyslík a další ROS (reactive oxygen species – reaktivní formy kyslíku). Tyto sloučeniny jsou jakožto radikály samozřejmě značně reaktivní a ihned po vzniku se váží na blízké biomolekuly (bílkoviny a lipidy). Takto deformované struktury již nemohou plnit svou primární funkci a tím dochází k přerušení biochemických drah v rámci buňky, která následně umírá, ať už apoptoticky či nekroticky. (31)



Obrázek 11 - Schéma PDT, převzato z (32)

Fotosenzitizéry jsou aplikovány topicky či intravenózně a mnoho z nich se přednostně akumuluje v nádorových buňkách díky zvýšené permeabilitě jejich cév. Toto je jeden z důvodů,

proč jsou v této oblasti využívány porfyriny (např. Photofrin) nebo i Pc. Jakožto fluorescenční barviva mohou sloužit i jako diagnostický nástroj k samotné detekci tumorů a mohou ložiska přesně lokalizovat při jejich resekci, což účinně redukuje šanci k opětovnému propuknutí nemoci. (31; 33)

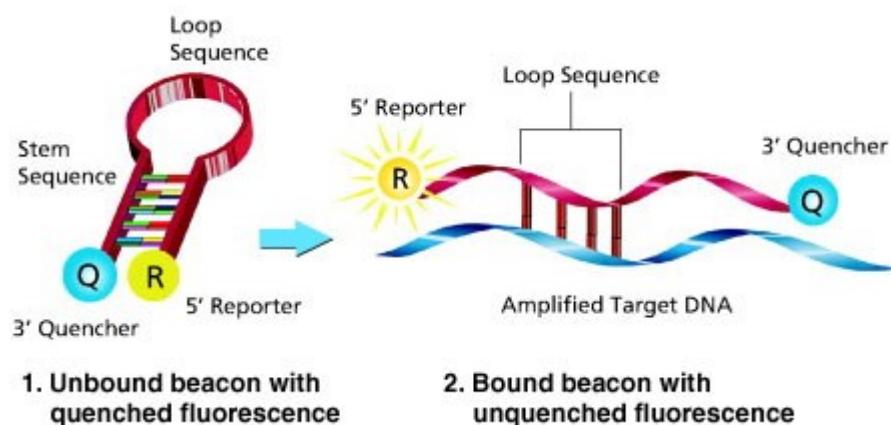
Přestože je tato metoda léčby považována za velmi selektivní, protože radikály mají velmi krátkou životnost a tím i omezenou vzdálenost, kterou mohou ROS dosáhnout, je snaha tuto selektivitu dále zvyšovat. Jeden způsob logicky vyplývá z cesty excitace fotosenzitizérů – cílené ozařování aktivujícím světlem. Z toho ovšem plyne i limitující faktor využití této léčby i použitých Pc. Vezmeme-li v potaz, že pro dosažení dostatečné propustnosti světla tkání je při PDT pro produkci ROS optimální rozsah vlnových délek 630-800 nm, je možné použít PDT pouze v případě povrchových nebo nepřilíš rozsáhlých solidních nádorů, u kterých si pronikající světlo ještě zachová dostatek energie pro tvorbu tripletových stavů s produkcí singletového kyslíku. (3) Ovšem i cílené ozařování může aktivovat fotosenzitizéry ve zdravých buňkách kolem místa aplikace léčby, a proto jsou molekuly léčiv upraveny napojením na peptidy nebo protilátky, které zajistí receptorem zprostředkovaný přenos léčiva pouze do nádorových buněk. Nevýhodou této metody jsou nevázané Pc, které se z organismu vylučují velmi pomalu a jsou zdrojem nežádoucí fototoxicity a fluorescence. (33) Tento problém byl řešen alternativní modifikací makrocyclů, čímž vznikly tzv. „aktivovatelné fotosenzitizéry“ (Activatable photosensitisers). (31; 33) Ty na sobě mají navázané sekvence DNA nebo dlouhé peptidy spolu se zhášeci. Zhášeci deaktivují fotosenzitizéry do té doby, dokud jsou obě molekuly společně navázané na spojovací můstek, který je štěpen pouze v cílové buňce nádoru. V této metodě je tedy molekula léčiva přítomna ve všech buňkách těla, ale fotodynamicky aktivní ergo potenciálně nebezpečná je pouze v tumorové tkáni.

4.3.2. Zhášení fluorescence

Zhášení fluorescence se v posledních desetiletích stalo zásadní metodou v oblasti detekce a identifikace mutací a kvantifikace nukleových kyselin, ale i dalších procesech molekulární biologie a biochemie. (19) Do nedávné doby však byly využívány pro tyto vlastnosti pouze molekuly podstatně jednodušších struktur, převážně deriváty difenyldiazenu a xanthenu. (19)

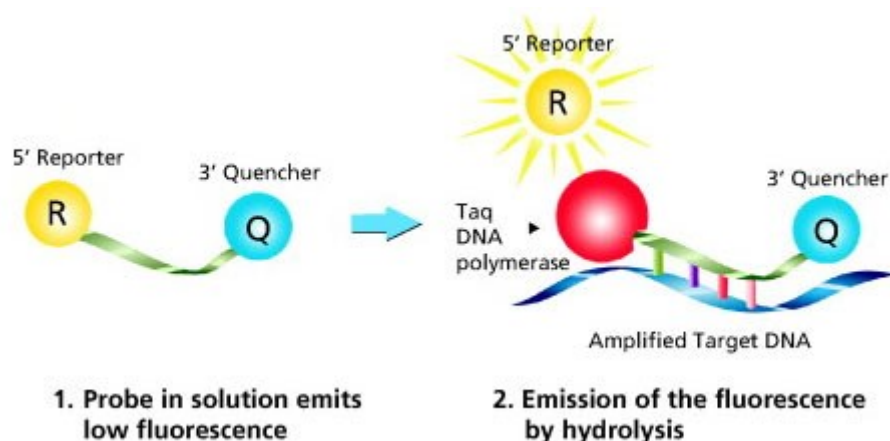
Při aplikování této metody dochází k užití dvou molekul různé struktury. První je donorem fluorescence (fluorofor) a druhá jejím akceptorem neboli zhášecem (quencher). Ty spolu vytvářejí komplex, jenž je vázán slabými ne vazebnými interakcemi, jakými jsou π - π hydrofobní interakce, elektrostatické síly a sterické vlastnosti molekul. (34).

Molekuly fluoroforu a zhášedce jsou navázány na DNA sondy. Každá molekula může být navázána na svůj řetězec oligonukleotidů, takové sondy označujeme za jednoduše značené (mono-labeled probes). Jednotlivé řetězce k sobě mohou a nemusí být komplementární a mohou být i částečně modifikované (adjacent probes, yin-yang probes, light up probes). Běžně využívané jsou také dvojité značené sondy (dual-labeled probes), což jsou jednovláknové sondy, jež mají na jednom konci navázaný fluorofor a na druhém zhášedč. Toto vlákno může být opět částečně komplementární (molecular beacons, scorpion primers), díky tomu pak vytváří smyčky. Vlákno ale také vůbec obsahovat komplementární báze nemusí (TaqMan probes). (19)



Obrázek 12 - Schéma dvojité značené sondy (Molecular beacon), převzato z (35)

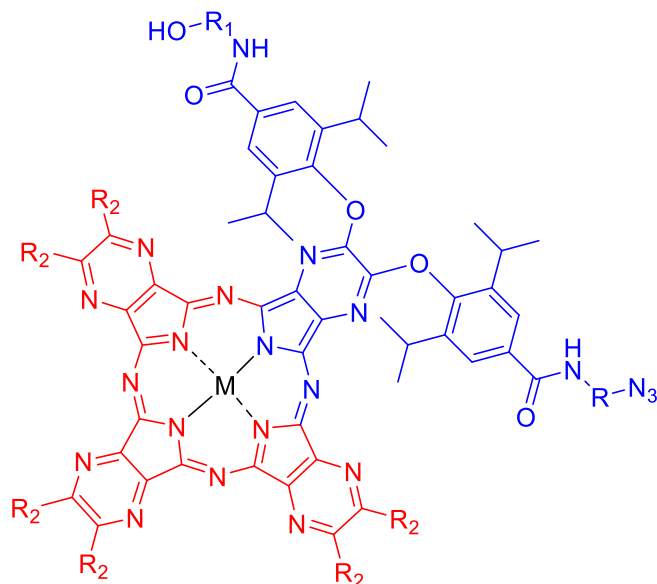
Jednotlivé druhy sond se díky svým rozličným vlastnostem využívají k detekci v různých oblastech biologických věd, ať už se jedná o genotypizaci lokusů konkrétních onemocnění a mutací či alel jiných lidských genů, nebo hybridizaci v živých buňkách. Například „light-up probes“ se využívají hlavně ve virologii, pro možnost využití krátkých sekvencí a stabilnějších duplexů. (19) TaqMan probes mají již podle svého názvu nezastupitelné místo v polymerázové řetězové reakci (PCR – Polymerase Chain Reaction) při amplifikaci daných sekvencí DNA. (19)



Obrázek 13 - Schéma dvojité značené sondy (TaqMan probe), převzato z (36)

5. CÍL PRÁCE

Tato práce se zabývá syntézou asymetrických fluorescenčních AzaPc typu AB₃, nesoucích vhodné funkční skupiny pro navázání dalších struktur za účelem aplikace v molekulární biologii.



Obrázek 14 - Kongener AB3

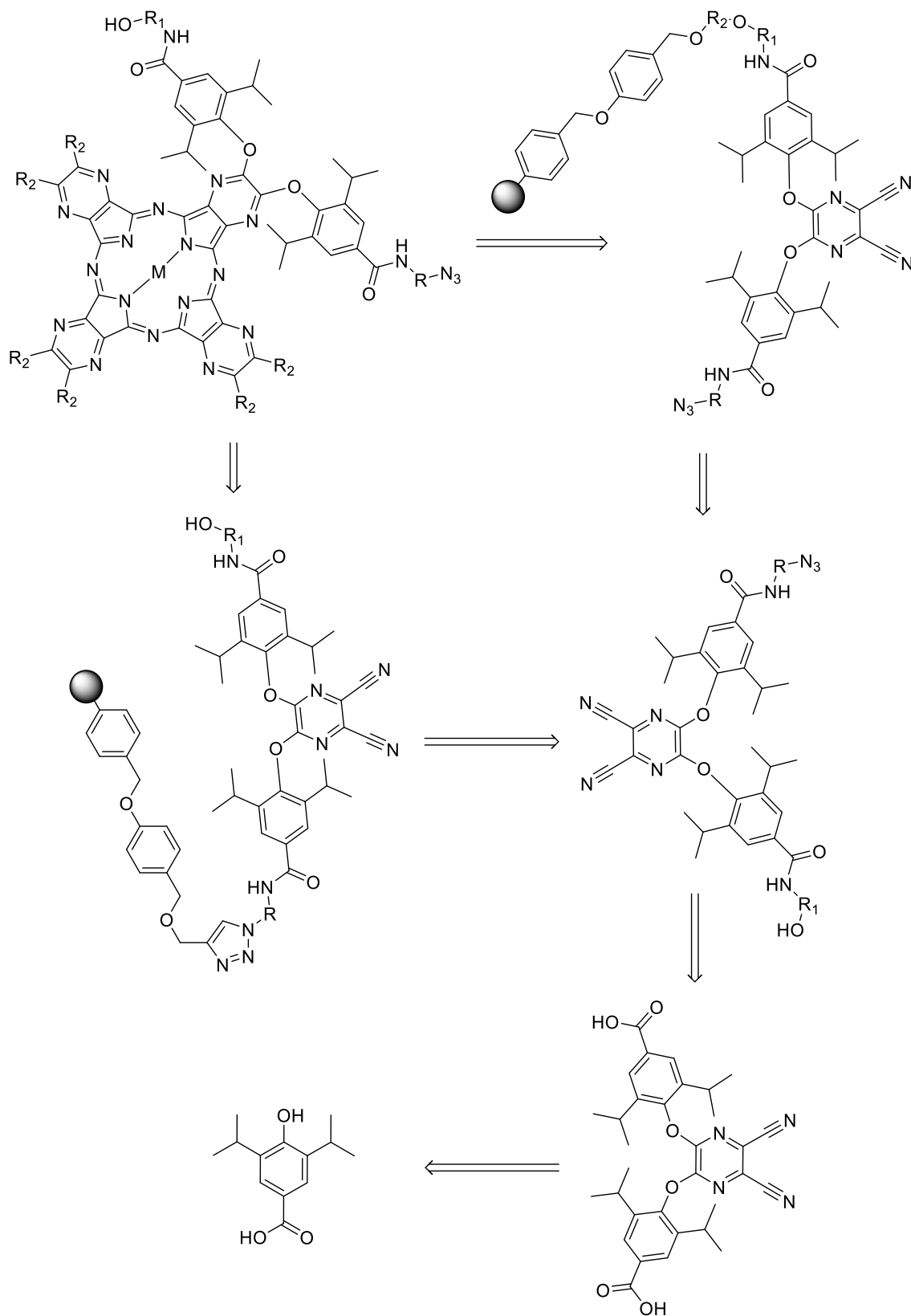
Pro tento účel je třeba AzaPc s výrazně polárními, nejlépe ionogenními periferními substituenty. Takovéto polární nesymetrické makrocykly je ovšem obtížné, až nemožné po syntéze metodou statistické cyklotetramerizace separovat ze směsi vzniklých kongenerů. Cílem této práce proto bylo ověření možnosti přípravy nesymetrických AzaPc na pevné fázi, na které by zůstala zakotvená pouze nesymetrická cílová molekula, čímž by odpadla nutnost následné složité purifikace. Předpokladem byla syntéza vhodného prekurzoru A, schopného navázání na pevnou fázi a zároveň po cyklotetramerizaci poskytujícího AzaPc se schopností konjugace s příslušně modifikovaným řetězcem oligonukleotidu. Podjednotky B by přitom nesly stericky objemné a zároveň polární substituenty, bránící agregaci i ve vodném prostředí. Dílčím cílem práce byla tedy příprava prekurzoru A, obsahujícího ve struktuře azidovou funkční skupinu, umožňující velmi efektivní vazbu „click“ reakcí typu Huisgenovy cykloadice na cyklooktynem modifikovaný řetězec oligonukleotidu. (37) Jako druhý substituent na prekurzoru A byla zamýšlena primární alkoholická skupina, která by sloužila k navázání pevné fáze.

6. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

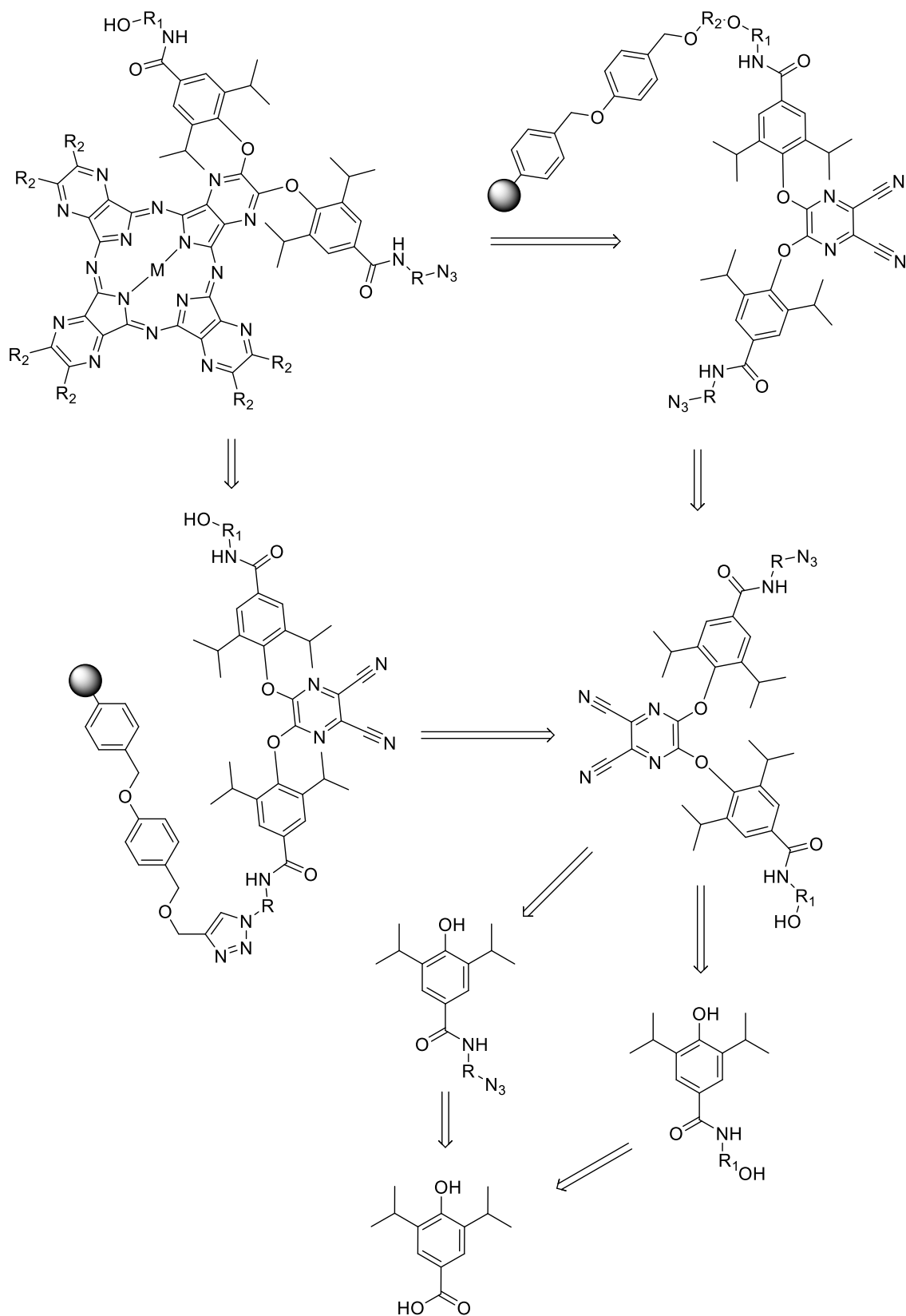
Výchozí látky a rozpouštědla pro reakce byly zakoupeny od firem Lach-Ner, Penta a Merck. Průběh reakcí a čistota výsledných produktů byli sledovány pomocí tenkovrstvé chromatografie (thin layer chromatography, TLC) na deskách Merck Kieselgel 60 F254, detekce UV lampou probíhaly za vlnové délky 254 nm nebo 366 nm. Čištění produktů bylo realizováno pomocí sloupcové chromatografie na stacionární fázi Merck Kieselgel 60 (0,040 – 0,063 mm) nebo pomocí Flash chromatografie na přístroji *CombiFlash*[®] Rf na Katedře farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy. Mobilní fáze, které byly použité při čištění, jsou uvedené u jednotlivých reakcí níže. IČ spektra byly měřené na IČ spektrofotometru Nicolet 6700 v ATR módu na Katedře anorganické a organické chemie. ¹H NMR a ¹³C NMR spektra byla měřené na přístroji Varian VNMR S500 na Katedře anorganické a organické chemie.

6.1. Obecná schémata přípravy

6.1.1. Retrosyntéza I

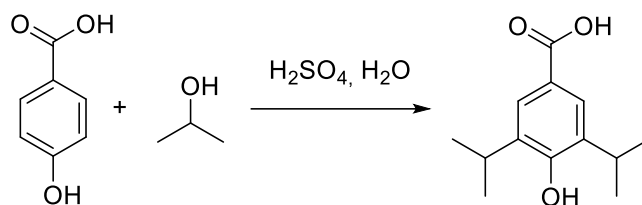


6.1.2. Retrosyntéza II



6.2. Příprava prekurzorů

6.2.1. SPP-01



PHBA	(MW=138,12 g/mol)	10 g	72,4 mmol
propan-2-ol	(MW= 60.1 g/mol, ρ=1,05 g/cm ³)	13 g ≈ 16,6 ml	217 mmol

H₂SO₄ (36 ml) byla přikapávána do 2,5 ml vody vychlazené na 5 °C a snížená teplota byla udržována i nadále, kdy byla po částech přidána PHBA a poté propan-2-ol. Poté byla směs zahřívána na 55-60 °C po celou dobu reakce (cca 5 hodin). (38; 39; 40) Na TLC (HEX:EAC:AA 20:3:1) sledováno vymizení PHBA (R_f = 0,4). Po ukončení byla směs ochlazená a opatrně převedena do směsi 100 ml vody a 80 ml toluenu s teplotou 5 °C. Po celou dobu byla teplota udržována pod 20 °C. Celá směs byla protřepána a organická vrstva oddělena, znovu protřepána s 30 ml 20% solanky, vysušena bezvodým síranem sodným a na závěr odpařena ve vakuu. Zbytek po odpaření byl rozpuštěn v 30 ml methanolu a zředěn vodou do vysrážení produktu, který byl následně odsát a promyt cyklohexanem. Sraženina (9 g) byla ovšem silně znečištěna vedlejšími produkty, ty nebyly úplně odstraněny ani sloupcovou chromatografií (300 g) s mobilní fází HEX:EAC:AA 20:3:0,5, ani další krystalizací ze směsi methanol:voda. Po dalším sloupci byly odděleny pouze čisté frakce, které se sice nepodařilo vykrytalizovat ze soustavy ethanol:voda, ale při odpaření většiny rozpouštědel se získávaný olej změnil na sraženinu, která byla odsáta a promyta vodou a hexanem, z čehož bylo získáno 3,5 g čisté látky, což odpovídá 21,75 %.

Během dalších příprav byl optimalizován postup izolace a krystalizace, jenž vypadá následovně: Celá reakční směs se vytřepe s toluenem, organická fáze se vysuší bezvodým síranem sodným a po přefiltrování se odpaří rozpouštědlo. Vysušená látka se rozpustí v methanolu a vytřepe se s hexanem, do kterého sice přechází i malá část produktu, ale především do něj přecházejí jinak těžko oddělitelné vedlejší produkty, na TLC pohybující se stíny těsně nad a pod cílovým produktem. Jejich zbytky potom již nečiní v reakční směsi větší překážky. Methanolká fáze se odpaří a směs se rozpustí ve vodném roztoku NaOH, který se vytřepe s toluenem. Vodná fáze se

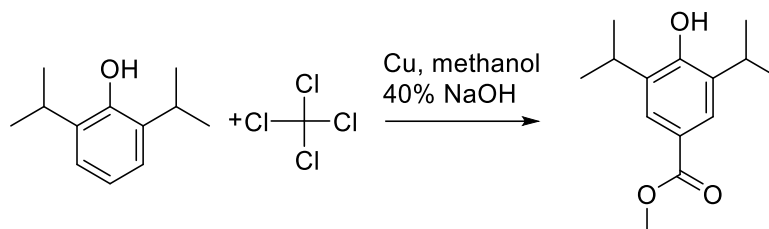
poté okyslí HCl a z mírně kyselého roztoku vypadává bílá až světle růžová sraženina. Rekrytalizace se provádí rozpuštěním sraženiny ve vroucím methanolu, do kterého se poté postupně přidává voda. Roztok ovšem musí být stále čirý. Nakonec se nechá krystalizovat přes noc. Odsáté krystaly obsahují prakticky čistou SPP-01. Výtěžek reakce je 71 %.

^1H NMR (500 MHz, MeOH- d_6) δ (ppm) 7,79 (s, 2H, ArH), 3,33 (m, 2H, CH), 1,24 (s, 12H, CH₃).

^{13}C NMR (125 MHz, MeOH- d_6) δ (ppm) 170,76; 156,96; 136,16; 126,59; 122,84; 27,85; 23,23.

IČ (ATR) ν_{max} = 1641 (CONH), 1667 (COOH), 2873, 2965 (CH₂CH₂CH₃), 3456 (OH) cm^{-1} .

6.2.2. SPP-07

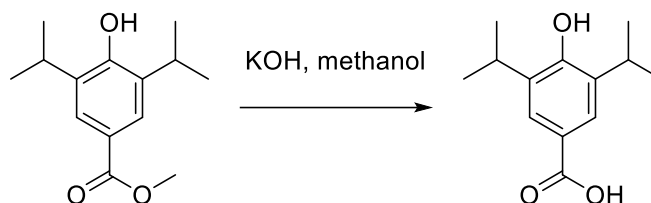


Cu prášek	(MW=63,55 g/mol)	0,2 g	3,15 mmol
2,6-diisopropylfenol	(MW=178,27 g/mol, $\rho=1,54 \text{ g/cm}^3$)	5,7 g \approx 3,7 ml	0,032 mmol
CCl_4	(MW=153,81 g/mol, $\rho=1,59 \text{ g/cm}^3$)	4,45 g \approx 2,8 ml	0,029 mmol

K mědi byl přidán propofol a 15 ml 40 % hydroxidu sodného. Směs byla naředěna 15 ml methanolu, zahřáta pod zpětným chladičem na teplotu v rozmezí 40-50 °C a během několika minut byl přikapán CCl_4 . Poté byla teplota zvýšena na 60 °C a ponechána tak po 4 hodiny. Vychladlá směs byla vlita do 50 ml vody a 3x vytřepána s 20 ml toluenu. (41) Organická fáze byla poté vytřepána se solankou a zbylá voda byla odstraněna bezvodým síranem sodným. Po přefiltrování bylo za vakua odpařeno rozpouštědlo. Výsledkem reakce bylo 3,5 g směsi. Na TLC (HEX:EE 7:1) se objevila převaha skvrny s R_f 0,4, výchozí látka byla patrná ve zbytkovém množství s R_f 0,8. Směs byla přečištěna sloupcovou chromatografií (250 g silikagelu) mobilní fází použitou na TLC, avšak se stoupajícím gradientem z poměru 10:1 se po vymytí nečistot přešlo na rychlejší poměr 5:1. Výtěžek činil 61 %.

^1H NMR (500 MHz, Ac-d_6) δ (ppm) 7,95 (s, 1H, OH), 7,78 (s, 2H, ArH) 3,83 (s, 3H, CH_3), 3,39 (m, 2H, CH), 1,25 (s, 12H, CH_3). ^{13}C NMR (125 MHz, Ac-d_6) δ (ppm) 167,47; 156,18; 135,46; 125,93; 125,89; 122,75; 51,78; 30,26; 30,10; 29,95; 29,80; 29,65; 29,49; 23,05.

6.2.2.1 Hydrolýza SPP-07 na SPP-01

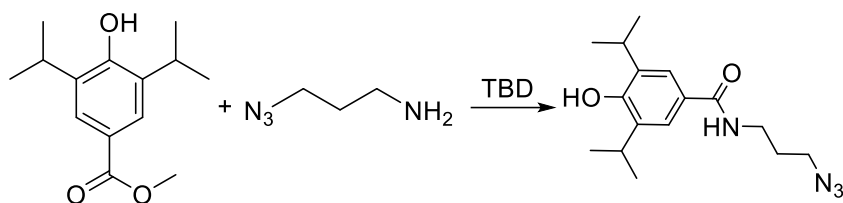


SPP-07	(MW=236,31 g/mol)	118 mg	0,5 mmol
KOH	(MW=56,11 g/mol)	112 mg	2 mmol

KOH byl rozpuštěn ve 2 ml methanolu, poté byla přidána SPP-07. Po 12 hodinách míchání za laboratorní teploty se TLCjevilo beze změny, proto byly přidány další 3 ml methanolu a směs zahřívána k varu pod zpětným chladičem. Stále bez výsledku. Byly přidány 2ml vody a mícháno za laboratorní teploty 4 hodiny. Ani za těchto podmínek hydrolyza neprobíhala. Teprve po zahřívání na 70 °C 4 hodiny byla hydrolyzována zhruba polovina SPP-07. Po dalších 24 hodinách při zahřívání na 87 °C pak výchozí látka zcela zhydrolyzovala. Po odpaření rozpouštědla byl produkt rozpuštěn ve vodě a tento roztok byl okyselen. Ve výsledku vykrystalizoval téměř čistý SPP-01 s výtěžkem 186,5 mg, což odpovídá 84 %.

Tato cesta výroby SPP-01 byla alternativou v období, kdy jsme řešili problém s nečistotami provázejícími původní reakci pro výrobu tohoto prekurzoru. Po odstranění komplikací s izolací SPP-01 (viz výše) byla původní reakce pro svou rychlost a čištění pomocí krystalizace zvolena jako výchozí. Nicméně je tento způsob přípravy využitelný.

6.2.2.2 Aminolýza SPP-07 na SPP-09

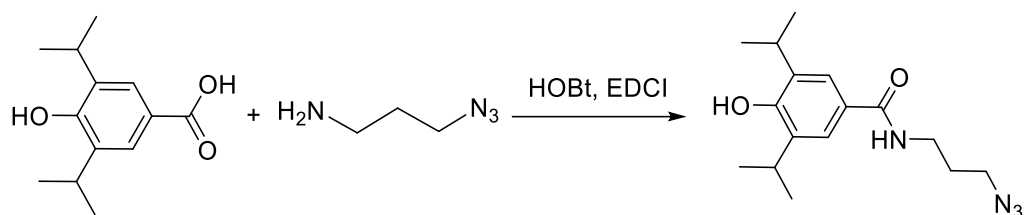


SPP-07	(MW=236,31 g/mol)	236,3 mg	1 mmol
3-azido-1-propylamin	(MW=100.13 g/mol, ρ=1,02 g/cm ³)	120,16 mg	1,2 mmol
TBD	(MW=139,20 g/mol)	41,76 mg	0,3 mmol

Všechny složky byly smíseny v baňce, ovšem v deklarovaném množství se pevné látky v tekutém aminu nerozpouštěly, proto byl přidán THF (10 ml). Ten byl postupně odpařen zahříváním na 80 °C. (42) Reakční směs se jevila beze změny, proto do ní byl přidán trojnásobný molární přebytek azidopropylaminu. Směs byla i nadále zahřívána na 80 °C přes noc. Po kontrole na TLC (HEX:EE 5:1) byl zjištěn vznik produktu držíciho se na startu. V reakční směsi bylo zjištěno stále mnoho SPP-07, proto byl opětovně přidán azidopropylamin (3 x 1,2 mol). Ani po dalším míchání směsi za laboratorní teploty ale nevznikl výrazný očekávaný produkt, na TLC se zobrazovaly pouze výchozí látky a skvrna na startu, a proto byla reakce ukončena.

Pro získání požadované sloučeniny byla nakonec zvolena jiná cesta popsaná v následující kapitole.

6.2.3. SPP-09



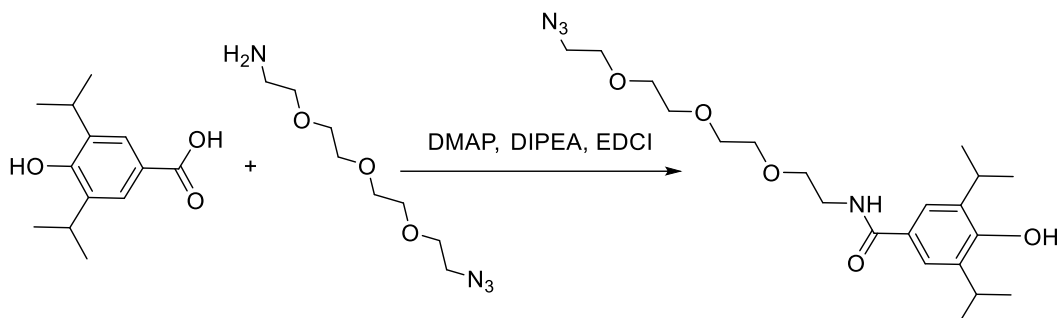
SPP-01	(MW=222,28 g/mol)	814,8 mg	3,57 mmol
HOBt	(MW=155.24 g/mol)	554,4 mg	3,57 mmol
3-azido-1-propylamin	(MW=100.13 g/mol, ρ=1,02 g/cm ³)	425 mg ≈ 416,6 μl	4,25 mmol
EDCI báze	(MW=155 g/mol, ρ=0,877 g/cm ³)	1318 mg ≈ 1502 μl	8,50 mmol

SPP-01 s HOBt bylo rozpuštěno a mícháno asi 15 min v DCM s THF (50 ml cca v poměru 1:1, v samotném DCM se nerozpustilo, i po rozpuštění byl roztok mléčně zbarven) a během následujících 15 min byl přidán azidopropylamin s EDCI bází rozpuštěnou v DCM (10 ml, ihned po přidání se roztok vyčeril a zoranžověl). Společně mícháno 1 hodinu. (43; 44) Z výsledné směsi byla odpařena za sníženého tlaku rozpouštědla a pevný zbytek poté rozpuštěn v EAC a vytřepán s 1 M HCl, dále s 10% roztokem NaOH a solankou (vše cca 200ml). Zbytková voda byla odstraněna bezvodým síranem sodným. Na TLC (HEX:EAC:AA 20:6:2,5) bylo patrné zmizení výchozích látek a výrazná skvrna produktu. Pod produktem byl vidět i menší šum, který byl odstraněn FLASH chromatografií. Čistý výtěžek reakce byl 386,7 mg, což odpovídá 47 %.

Reakce byla prováděna i s aktivátory DMAP (4,28 mmol) a DIPEA (7,14 mmol), ovšem výtěžek reakcí činil pouze 18 %.

¹H NMR (500 MHz, Ac-d₆) δ (ppm) 7,85 (s, 1H, NH), 7,69 (s, 2H, ArH), 3,45 (m, 4H, CH₂), 3,39 (m, 2H, CH) 1,91 (t, 2H, CH₂), 1,23 (s, 12H, CH₃). ¹³C NMR (125 MHz, Ac-d₆) δ (ppm) 167,93; 154,46; 135,27; 127,41; 123,58; 49,93; 37,72; 30,26; 30,11; 29,96; 29,89; 27,47; 23,16. IČ (ATR) ν_{max} = 1634 (CONH), 2096 (N₃), 2362 (CN), 2871, 2932, 2963 (CH₂CH₂CH₃), 3307 (OH) cm⁻¹.

6.2.4. SPP-11



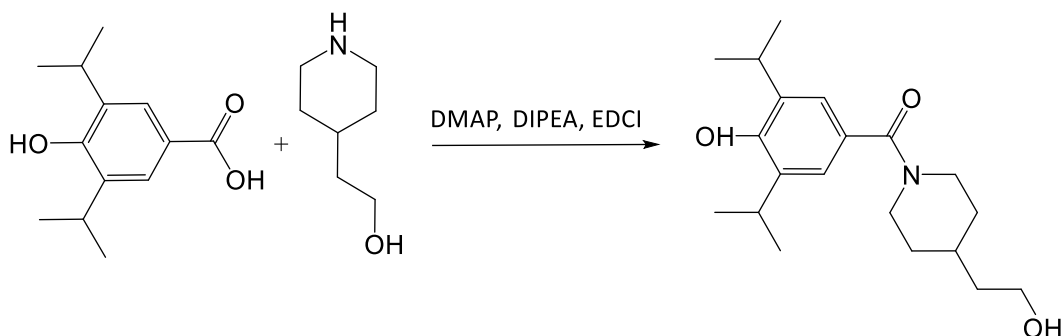
SPP-01	(MW=222,28 g/mol)	288 mg	1,30 mmol
11-azido-3,6,9-trioxaundek-1-amin	(MW=218,26 g/mol)	367 mg	1,68 mmol
DMAP	(MW=122 g/mol)	98 mg	0,80 mmol
DIPEA	(MW=129,24 g/mol; $\rho=0,742 \text{ g/cm}^3$)	292 mg \approx 393 μl	2,26 mmol
EDCI báze	(MW=155 g/mol, $\rho=0,877 \text{ g/cm}^3$)	462 mg \approx 526,8 μl	2,98 mmol

SPP-01, DMAP a DIPEA byly společně s azidotrioxaundekaminem rozpuštěny v 30 ml DCM a míchány za laboratorní teploty. Po rozpuštění všech složek byla po kapkách během několika minut přidávána EDCI báze. Poté byla směs míchána 4 hodiny. (43; 44) Dle TLC (HEX:EAC:AA 10:3:1) během uplynulé doby zreagovala přibližně polovina výchozí látky SPP-01 ($R_f = 0,7$), směs byla nechána míchat přes noc. I když skvrna produktu ($R_f = 0,2$) narostla, výchozích látek bylo na TLC stále signifikantní množství.

Postup byl ještě jednou zopakován. Reakce opět probíhala přes noc. Azidotrioxaundekamin a DIPEA byly přidány v malém přebytku, aby bylo dostatečně zaktivováno a zreagováno dané množství SPP-01. Celkové množství směsi (380 mg) bylo převedeno na silikagel a přečištěno sloupcovou chromatografií. Nejprve byla použita stejná mobilní fáze jako na TLC, tedy HEX:EAC:AA 10:3:1, po vymytí výchozí látky SPP-01 byla na rychlejší soustavu 10:10:1.

^1H NMR (500 MHz, Ac-d_6) δ (ppm) 7,71 (s, 2H, ArH), 3,6-3,7 (m, 12H, O-CH₂), 3,55 (m, 4H, N-CH₂), 3,38 (m, 2H, CH₂), 1,23 (s, 12H, CH₃). ^{13}C NMR (125 MHz, Ac-d_6) δ (ppm) 206,12; 167,71; 154,39; 135,22; 127,51; 123,58; 71,24; 71,14; 70,95; 70,64; 70,52; 51,32; 40,32; 30,26; 30,10; 29,95; 29,80; 29,65; 29,49; 29,34; 27,48; 23,17. IČ (ATR) ν_{max} = 1633 (CO), 2101 (N₃), 2358 (CN), 2868, 2960 (CH₂CH₂CH₃), 3291 (OH) cm^{-1} .

6.2.5. SPP-14



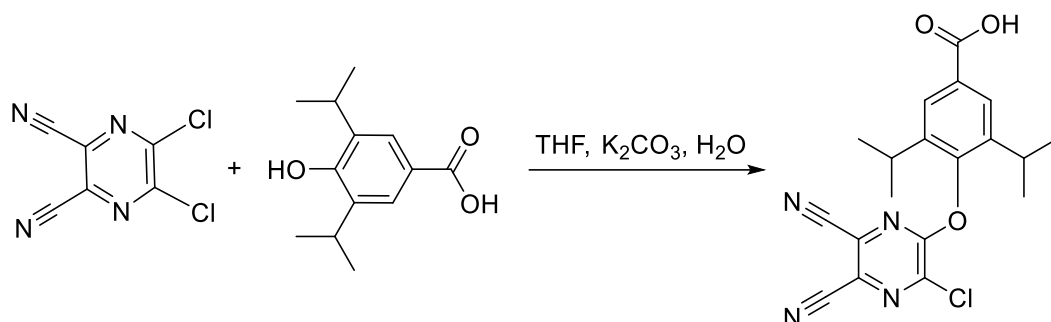
4-piperidinylethanol	(MW=129,2 g/mol)	259 mg	2 mmol
DMAP	(MW=122 g/mol)	61 mg	0,5 mmol
DIPEA	(MW=129,24 g/mol; $\rho=0,742 \text{ g/cm}^3$)	259 mg \approx 350 μl	2 mmol
EDCI báze	(MW=155 g/mol, $\rho=0,877 \text{ g/cm}^3$)	310 mg \approx 354 μl	2 mmol
SPP-01	(MW=228,3 g/mol)	342 mg	1,5 mmol

Všechny výchozí látky vyjma SPP-01 byly smíchány v 50 ml DCM za laboratorní teploty. Po jejich rozpuštění bylo pomalu přidáváno SPP-01, po čemž se v roztoku vytvořila sraženina, jež se rozpustila až po přidání 20 ml DMF (přídavek 20 ml THF byl neúčinný). Směs byla takto míchána přes noc. (43; 44) Na TLC (T:AC:AA 25:5:0,3) byla stále trochu patrná výchozí látka ($R_f = 0,6$), avšak většina se jevila jako produkt ($R_f = 0,2$). Směs byla vyčištěna pomocí sloupcové chromatografie. Nejprve byla použita úvodní mobilní fáze a po vymytí SPP-01 byl do soustavy přidán aceton až do poměru 20:10:0,3. Čistý výtěžek ze sloupce činil 247 mg, což odpovídá 49 %.

^1H NMR (500 MHz, Ac-d_6) δ (ppm) 7,15 (s, 2H, ArH), 3,57-3,65 (m, 6H, N-CH₂, O-CH₂), 3,39 (m, 2H, CH), 1,77 (k, 4H, CH₂), 1,5 (m, 3H, CH₃), 1,22 (d, 12H, CH₃). ^{13}C NMR (125 MHz, Ac-d_6) δ (ppm) 170,17; 151,97; 134,46; 128,40; 122,79; 59,00; 39,47; 32,98; 32,52; 29,46; 29,30; 29,15; 29,00; 28,84; 28,68; 28,53; 26,59; 22,38. IČ (ATR) $\nu_{\text{max}} = 1614$ (CO), 2861, 2926, 2955 (CH₂CH₂CH₃), 3233 (OH) cm^{-1} .

6.3. Vázání prekurzorů

6.3.1. SPP-05



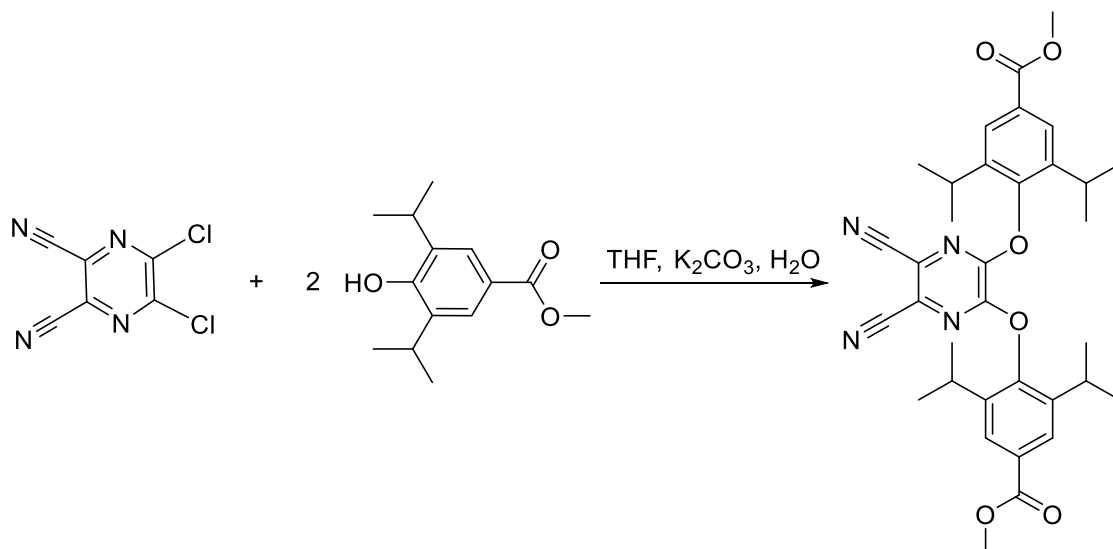
5,6-dichlor-2,3-dikyanpyrazin	(MW=199 g/mol)	100 mg	0,5 mmol
SPP-01	(MW=222,28 g/mol)	166 mg	0,75 mmol
K ₂ CO ₃	(MW=138 g/mol)	166 mg	1,2 mmol

5,6-dichlor-2,3-dikyanpyrazin byl rozpuštěn v THF a k němu byl přikapán SPP-01 rozpuštěný v roztoku K₂CO₃. Celá směs byla míchána za laboratorní teploty. Po odpaření THF byl vodný roztok K₂CO₃ neutralizován 35% HCl až do mírně kyselého pH, čímž došlo k vysrážení bílé látky. Ta byla odsáta v surovém výtěžku 240 mg. Poté byla přečištěna sloupcovou chromatografií nejdříve mobilní fází HEX:EAC:AA 20:5:1 do eluce horní skvrny, pak přes chloroform na CHCl₃:MeOH:AA 20:1:1 pro získání spodních dvou světle modře zžářejících skvrn, předpokládaného di- a monosubstituovaného derivátu. V dostatečně čistém stavu se podařilo získat pouze monosubstituovaný derivát ve velmi nízkém výtěžku 15 mg, což odpovídá 15 %.

Tato reakce byla provedena v několika různých bazických prostředích. Pyridin však podporoval vznik tmavé směsi neizolovatelných produktů. Roztok NaOH měl příliš bazický charakter a přednostně reagoval s kyanoskupinami 5,6-dichlor-2,3-dikyanpyrazinu za vzniku nežádoucího produktu.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm) 7,83 (s, 2H, ArH), 2,89 (m, 2H, CH), 1,17 (d, 12H, CH₃). ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm) 167,35; 155,34; 152,56; 150,20; 141,08; 129,91; 126,02; 122,49; 115,24; 113,04; 112,73; 69,15; 57,12; 40,49; 40,41; 40,32; 40,25; 40,16; 39,99; 39,82; 39,68; 39,49; 30,10; 30,01; 27,19; 23,45.

6.3.2. SPP-08

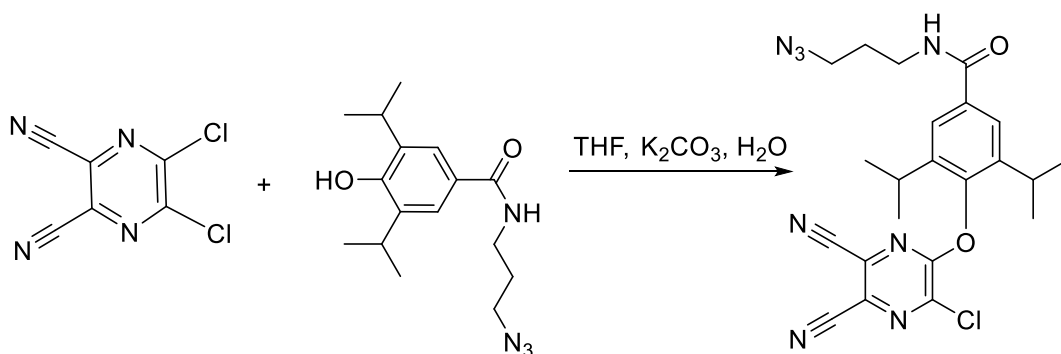


5,6-dichlor-2,3-dikyanpyrazin	(MW=199 g/mol)	70 mg	0,35 mmol
SPP-07	(MW=236,31 g/mol)	177 mg	0,75 mmol
K ₂ CO ₃	(MW=138 g/mol)	55 mg	0,40 mmol

5,6-dichlor-2,3-dikyanpyrazin byl rozpuštěn v 10 ml THF a míchán za laboratorní teploty. Paralelně byl připraven roztok K₂CO₃ ve vodě (2 ml) a k němu přidán SPP-07 v THF, po rozpuštění obou složek byla tato směs během 15 minut pomalu přikapána k roztoku dikyanpyrazinu. Během reakce bylo možno na TLC (HEX:EAC:AA 45:5:1) pozorovat vznik dvou světlých skvrn pod skvrnami výchozích látek (produkt R_f = 0,2. Po odpaření THF se v reakční směsi vytvořila sraženina, která byla odsáta, promyta vodou a následně přečištěna sloupcovou chromatografií, na kterou byla použita stejná mobilní fáze jako na TLC. Po přečištění byly získány dvě frakce produktů, přičemž našim zamýšleným produktem byla sloučenina s nižším retenčním faktorem, jejíž čistý výtěžek činil 140 mg, což odpovídá 67 %.

¹H NMR (500 MHz, Ac-d₆) δ (ppm) 8,01 (s, 4H, ArH), 3,96 (s, 6H, CH₃), 3,18 (m, 4H, CH), 1,25 (d, 24H, CH₃). IČ (ATR) ν_{max} = 1708 (CO), 1734 (COO), 2235 (CN), 2973 (CH₂CH₂CH₃) cm⁻¹.

6.3.3. SPP-10

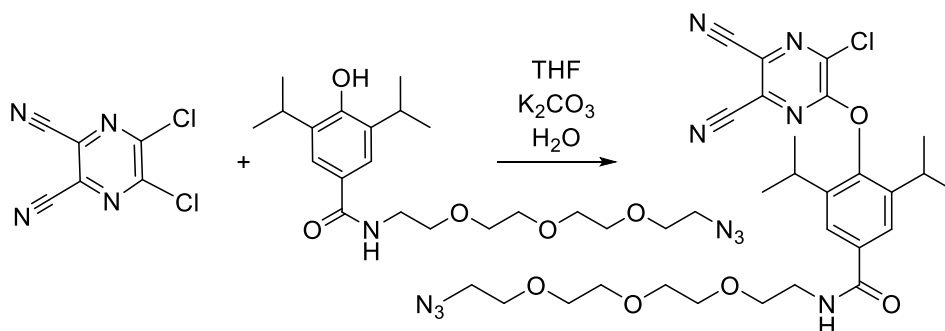


5,6-dichlor-2,3-dikyanpyrazin	(MW=199 g/mol)	19,9 mg	0,1 mmol
SPP-09	(MW=304.4 g/mol)	30,4 mg	0,1 mmol
K ₂ CO ₃	(MW=138 g/mol)	7,6 mg	0,055 mmol

5,6-dichlor-2,3-dikyanpyrazin byl úplně rozpuštěn v 3 ml THF a k němu byl během 30 minut pomalu přikapán SPP-09 rozpuštěný ve vodném roztoku K₂CO₃ (1 ml). Celá směs byla ještě 30 minut míchána za laboratorní teploty. Na TLC (T:AC 5:1) zcela zmizel dikyanpyrazin. Produkt se eluuje s R_f = 0,5. Rozpouštědla byla poté odpařena za sníženého tlaku a pevný zbytek přečištěn Flash chromatografií, místo původní soustavy využít acetonitril (R_f produktu 0,8), protože toluen interferuje s detekční vlnovou délkou chromatografu. Výtěžek po chromatografii činil 25 mg, což odpovídá 54 %. Během syntézy bylo zjištěno, že v roztoku se produkt rozkládá na silně polární sloučeninu, která na TLC svítí žlutě, proto je třeba dodržovat reakční dobu právě nutnou k proběhnutí reakce.

¹H NMR (500 MHz, Ac-d₆) δ (ppm) 8,09 (s, 1H, NH), 7,89 (s, 2H, ArH), 3,52 (m, 4H, CH), 2,97 (m, 2H, CH), 1,90 (m, 2H, CH₂), 1,21 (d, 12H, CH₃). ¹³C NMR (125 MHz, Ac-d₆) δ (ppm) 166,92; 157,73; 149,12; 143,02; 141,31; 135,43; 130,40; 126,86; 124,73; 113,65; 133,55; 49,85; 37,89; 30,25; 30,10; 29,95; 29,79; 29,71; 29,64; 29,48; 29,33; 28,26; 24,20; 22,52. IČ (ATR) ν_{max} = 1635 (CONH), 2111 (N₃), 2872, 2932, 2971 (CH₂CH₂CH₃) cm⁻¹.

6.3.4. SPP-12

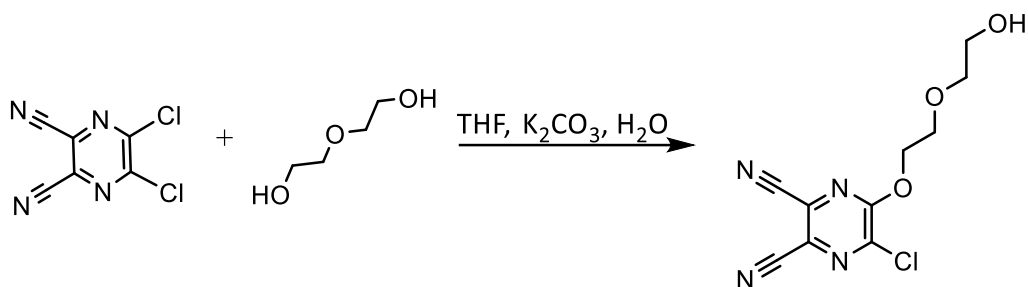


5,6-dichlor-2,3-dikyanpyrazin	(MW=199 g/mol)	77,9 mg	0,4 mmol
SPP-11	(MW=422,53 g/mol)	169,5 mg	0,4 mmol
K ₂ CO ₃	(MW=138 g/mol)	30,5 mg	0,22 mmol

5,6-dichlor-2,3-dikyanpyrazin byl rozpuštěn v THF (cca 2 ml) a míchán za laboratorní teploty. Paralelně byl připraven roztok K₂CO₃ ve vodě (cca 1 ml) a k němu přidán roztok SPP-11 v THF (cca 2 ml), po rozpuštění obou složek byla tato směs během 30 minut pomalu přikapána k roztoku dikyanpyrazinu a vše bylo mícháno další 2 hodiny. Poté byla za vakua odpařena rozpouštědla, surový produkt byl promyt vodou, vysušen a připraven k přečištění na Flash chromatografii. K přečištění byl zvolen acetonitril, produkt s R_f 0,75 byl mobilní fází eluován rychleji než výchozí látky. Čistý výtěžek z reakce činil 152 mg, což odpovídá 65 %.

¹H NMR (500 MHz, Ac-d₆) δ (ppm) 7,69 (s, 2H, ArH), 3,6-3,7 (m, 12H, O-CH₂), 3,55 (m, 4H, N-CH₂), 3,40 (m, 2H, CH), 1,25 (d, 12H, CH₃). ¹³C NMR (125 MHz, Ac-d₆) δ (ppm) 167,61; 154,27; 137,79; 135,09; 129,61; 129,43; 128,40; 128,86; 128,73; 128,65; 127,55; 127,85; 123,89; 78,25; 71,10; 71,95; 70,79; 70,71; 70,64; 69,88; 56,33; 51,26; 40,20; 30,52; 30,15; 30,10; 30,00; 29,94; 29,85; 29,80; 29,70; 29,54; 29,38; 29,23; 27,37; 24,76; 24,62.

6.3.5. SPP-20

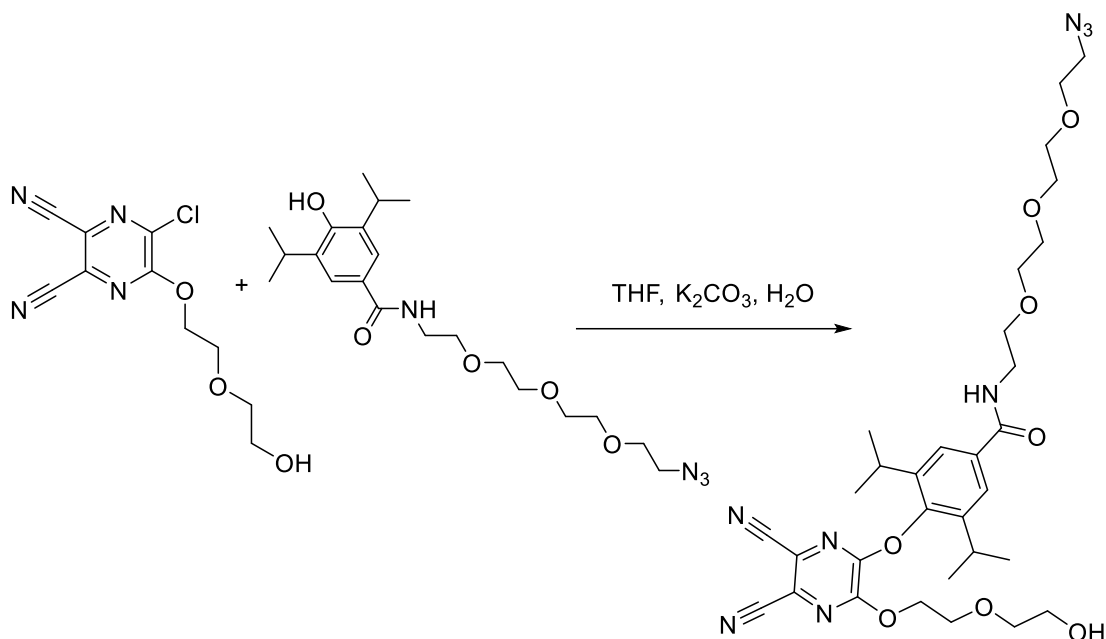


5,6-dichlor-2,3-dikyanpyrazin (MW=199 g/mol)		199 mg	1 mmol
		597 mg	3 mmol
diethylenglykol (MW=106,12 g/mol, ρ=1,118 g/cm ³)		106 mg ≈ 95 μl	1 mmol
		318 mg ≈ 284 μl	3 mmol
K ₂ CO ₃ (MW=138,2 g/mol)		69 mg	0,5 mmol
		207 mg	1,5 mmol

5,6-dichlor-2,3-dikyanpyrazin byl rozpuštěn ve 3 ml THF. Paralelně byl připraven roztok diethylenglykolu a K₂CO₃ ve vodě (1,5 ml). Tato směs byla po úplném rozpuštění přikapávána během 20 minut k prvnímu roztoku. Celá směs byla dále míchána při laboratorní teplotě přes noc. Poté se na TLC (HEX:EAC 1:1) nacházela ještě malá část 5,6-dichlor-2,3-dikyanpyrazinu s R_f = 0,75. Patrný byl i vedlejší produkt na startu, zamýšlený produkt se nacházel uprostřed s R_f = 0,45. Celá směs byla přečištěna sloupcovou chromatografií za použití mobilní fáze HEX:EAC 1:3 do vymytí zbytku výchozí látky, pak čistým EAC eluován čistý produkt (TLC v EAC R_f = 0,3) ve výtěžku 100 mg, což odpovídá 37 %.

¹H NMR (500 MHz, Ac-d₆) δ (ppm) 4,75 (t, 2H, CH₂), 3,96 (t, 2H, CH₂), 3,61 (t, 4H, CH₂). ¹³C NMR (125 MHz, Ac-d₆) δ (ppm) 158,62; 143,39; 130,19; 124,52; 113,85; 113,83; 73,61; 70,64; 68,89; 61,90; 30,26; 30,11; 29,95; 29,80; 29,64; 29,48; 29,33.

6.3.6. SPP-15

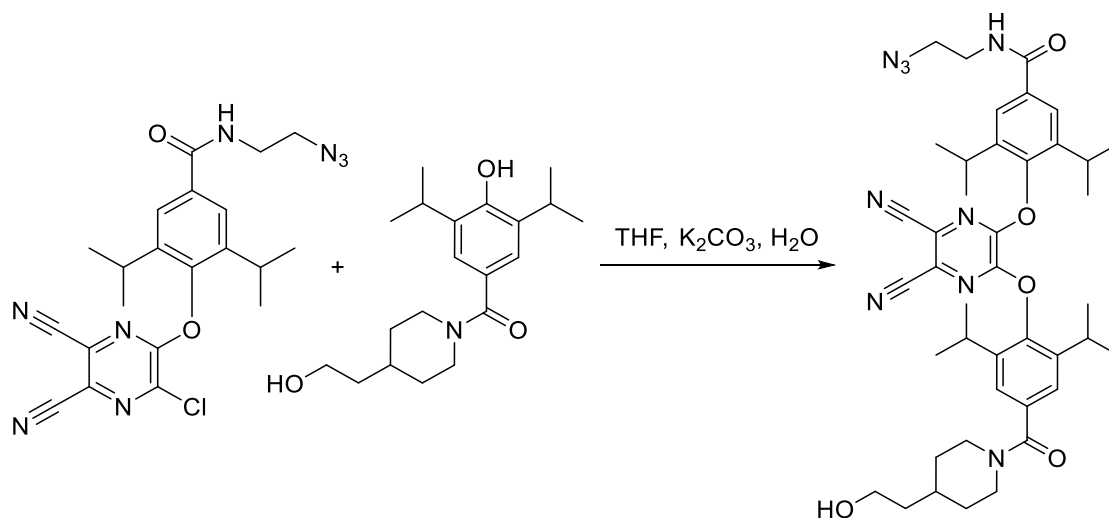


SPP-20	(MW=268.66 g/mol)	81 mg	0,3 mmol
SPP-11	(MW=422.53 g/mol)	100,0 mg	0,24 mmol
K ₂ CO ₃	(MW=138 g/mol)	19 mg	0,14 mmol

Sloučeniny SPP-20 a SPP-11 byly smíchány v THF (cca 2 ml) a za laboratorní teploty míchaný do úplného rozpuštění. K₂CO₃ byl rozpuštěn ve vodě (cca 1 ml) a následně pomalu k roztoku přikapán během 10 minut. Zhruba po 2 hodinách se TLC (EAC, R_f = 0,2) jevílo bez výchozích látek. Rozpouštědla byla odpařena za sníženého tlaku, pevný podíl přečištěn sloupcovou chromatografií za eluce ethylacetátem, čistý výtěžek činil 96 mg, což odpovídá 61 %.

¹H NMR (500 MHz, Ac-d₆) δ (ppm) 7,88 (s, 2H, ArH), 4,8 (s, 1H, OH), 4,0 (t, 2H, CH₂), 3,55-3,75 m, 18H, N-CH₂, O-CH₂), 3,39 (m, 2H, CH), 2,97 (m, 2H, CH₂), 2,01 (t, 2H, CH₂), 1,22 (d, 12H, CH₃). ¹³C NMR (125 MHz, Ac-d₆) δ (ppm) 206,09; 205,93; 167,01; 166,98; 153,19; 152,22; 151,89; 149,23; 141,47; 141,37; 135,29; 135,06; 125,60; 125,38; 124,74; 124,62; 123,25; 114,50; 114,33; 114,15; 73,77; 71,25; 71,18; 71,00; 70,65; 70,37; 69,74; 69,08; 61,99; 51,34; 40,58; 40,55; 30,26; 30,11; 29,95; 29,80; 29,72; 29,64; 29,49; 29,33; 28,50; 28,18; 23,28. IČ (ATR) ν_{max} = 1638 (CONH), 2104 (N₃), 2359 (CN), 2871, 2928 (CH₂CH₂CH₃), 3334 (OH) cm⁻¹.

6.3.7. SPP-16

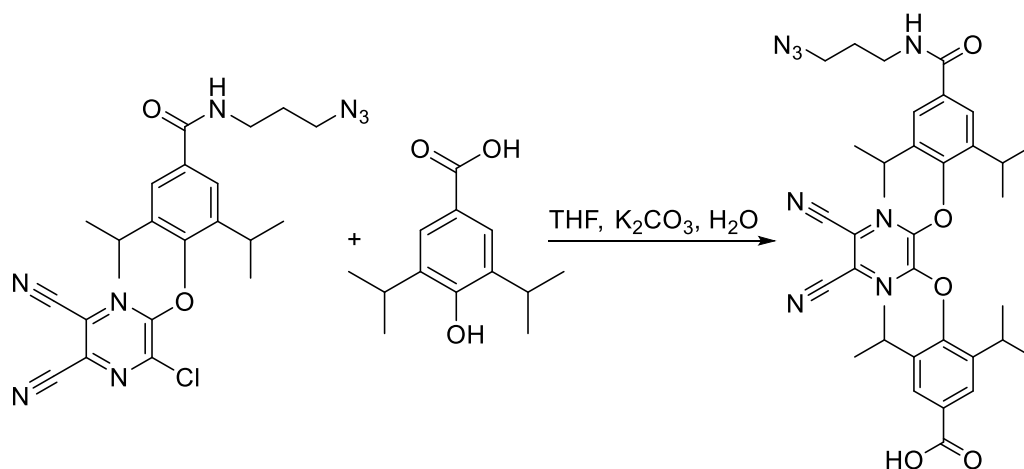


SPP-10	(MW=466.93 g/mol)	47,0 mg	0,1 mmol
SPP-14	(MW=333.47 g/mol)	37,0 mg	0,11 mmol
K ₂ CO ₃	(MW=138 g/mol)	10 mg	0,07 mmol

Sloučeniny SPP-10 a SPP-14 byly rozpuštěny v THF (cca 2 ml) za míchání a laboratorní teploty. K₂CO₃ byl rozpuštěn ve vodě (cca 1 ml) a pomalu přikapán během 20 minut k reakční směsi. Celá směs byla míchána přes noc. Na TLC (HEX:THF 1:1) byly patrné zbytky SPP-14 (R_f = 0,3) a výrazná skvrna produktu (R_f = 0,2). Naopak stopy SPP-10 (R_f = 0,8) na TLC zcela chyběly. Rozpouštědla z reakční směsi byla poté odpařena za vakua a pevný podíl přečištěn sloupcovou chromatografií, výtěžek čisté frakce byl 55 mg, což odpovídá 74 %.

¹H NMR (500 MHz, Ac-d₆) δ (ppm) 8,1 (t, 1H, NH), 7,96 (s, 2H, ArH), 7,40 (s, 2H, ArH), 3,66 (t, 4H, CH₂), 3,50 (m, 6H, CH₂), 3,10 (m, 4H, CH), 1,80-2,10 (m, 6H, CH₂), 1,50 (m, 1H, CH), 1,23 (d, 24H, CH₃). ¹³C NMR (125 MHz, Ac-d₆) δ (ppm) 169,59; 167,04; 151,95; 151,91; 149,207; 147,64; 141,40; 137,18; 135,25; 125,64; 125,59; 124,70; 124,39; 114,18; 68,02; 67,52; 60,49; 59,79; 49,89; 40,20; 37,71; 33,70; 30,26; 30,20; 30,11; 30,05; 29,95; 29,80; 29,74; 29,64; 29,49; 29,33; 28,50; 28,44; 26,12; 24,52; 24,15; 23,13; 20,78; 14,46. IČ (ATR) ν_{max} = 2096 (CONH), 2239 (CN), 2873, 2931, 2965 (CH₂CH₂CH₃), 3307 (OH) cm⁻¹.

6.3.8. SPP-17a

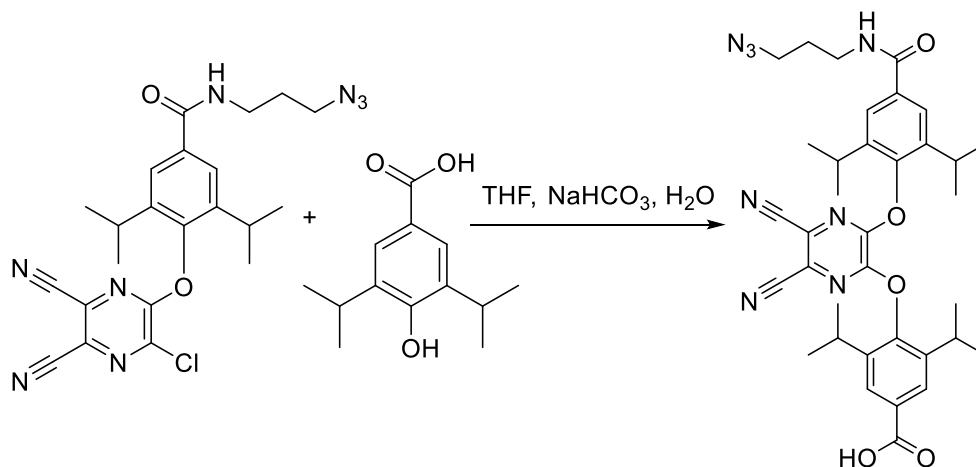


SPP-10	(MW=477 g/mol)	238 mg	0,5 mmol
SPP-01	(MW=222 g/mol)	122 mg	0,55 mmol
K ₂ CO ₃	(MW=138 g/mol)	76 mg	0,55 mmol

Sloučeniny SPP-10 a SPP-01 byly rozpuštěny v THF (cca 20 ml) a míchány za laboratorní teploty. Paralelně byl připraven roztok K₂CO₃ ve vodě (cca 1 ml) a během 30 minut byl pomalu přikapáván ke směsi sloučenin. Na TLC (HEX:THF:FA 30:20:1) se vytvořily dvě světlé skvrny pod výchozími látkami (R_f = 0,5 a 0,2), z nichž zamýšleným produktem byla skvrna s nižším retenčním faktorem. Rozpouštědla z reakční směsi byla odpařena za sníženého tlaku a zbytek byl přečištěn sloupcovou chromatografií s využitím uvedené mobilní fáze. Výtěžek činil 91 mg, což odpovídá 28 %.

¹H NMR (500 MHz, Ac-d₆) δ (ppm) 8,05 (t, 1H, NH), 7,94 (s, 4H, ArH), 3,55 (k, 8H, CH₂), 2,95 (m, 2H, CH), 1,21 (d, 24H, CH₃). ¹³C NMR (125 MHz, Ac-d₆) δ (ppm) 167,43; 162,37; 156,53; 152,23; 149,59; 141,50; 138,30; 134,80; 129,14; 126,11; 124,59; 121,64; 114,83; 112,75; 108,33; 107,13; 67,80; 67,54; 49,96; 38,01; 35,06; 30,78; 30,36; 30,21; 30,12; 30,05; 29,90; 29,80; 29,74; 29,59; 29,43; 28,21; 28,11; 26,22; 24,51; 24,44; 23,55; 22,18; 21,36. IČ (ATR) ν_{max} = 1638 (CONH), 1702 (COOH), 2098 (N₃), 2362 (CN), 2968 (CH₂CH₂CH₃) cm⁻¹.

6.3.9. SPP-17b



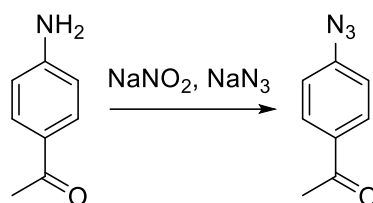
SPP-10	(MW=477 g/mol)	47 mg	0,1 mmol
SPP-01	(MW=222 g/mol)	24,5 mg	0,11 mmol
NaHCO ₃	(MW=84 g/mol)	19 mg	0,22 mmol

Sloučeniny SPP-10 a SPP-01 byly rozpuštěny v THF a za laboratorní teploty byl do směsi přisypán NaHCO₃. Následně bylo přidáno 0,2 ml vody a směs byla dobře promíchána. Po krátké době bylo možno na TLC (HEX:EAC:FA 25:25:1) sledovat zreagování SPP-10 (R_f = 0,8) a vznik dvou nových skvrn. Cílový produkt měl nižší retenční faktor (R_f = 0,2), po přečištění sloupcovou chromatografií byl výtěžek 30 mg, což odpovídá 46 %.

¹H NMR (500 MHz, Ac-d₆) δ (ppm) 8,05 (t, 1H, NH), 7,94 (s, 4H, ArH), 3,55 (k, 8H, CH₂), 2,95 (m, 2H, CH), 1,21 (d, 24H, CH₃).

6.4. Alternativní řada prekurzorů

6.4.1. AP-1

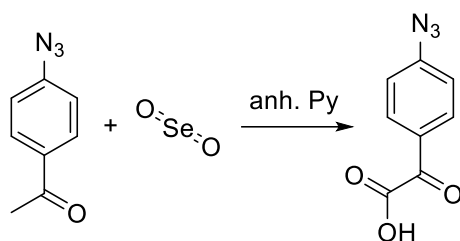


4-aminoacetofenon	(MW=135,16 g/mol)	6,75 g	0,05 mol
NaNO ₂	(MW=68,99 g/mol)	3,45 g	0,05 mol
NaN ₃	(MW=65, 01 g/mol)	2,35 g	0,05 mol

K roztoku 4-aminoacetofenonu ve 14 ml konc. HCl a 14 ml vody byl za teploty 0 °C přikapán chladný roztok dusitanu sodného ve 14 ml vody. Poté byl pomalu přikapán roztok azidu sodného v 7 ml vody. Vzniklá směs byla míchána 30 minut při 0 °C, a pak byla postupně samovolně ohřáta na laboratorní teplotu a míchána 6 hodin. Poté byla zředěna vodou a extrahována do EE. Organická fáze byla postupně vytřepána s vodou a roztokem NaCl. Následně byla vysušena bezvodým síranem sodným a přefiltrována. Ether byl odpařen na vakuové odparce a produkt byl přečištěn sloupcovou chromatografií za použití mobilní fáze HEX:EAC 4:1. Čistý výtěžek činil 5,1 g, což odpovídá 75 %.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm) 8.04 (d, 2H; Ar-H), 7.43 (d, 2H; Ar-H), 2.50 (s, 3H; CH₃).
¹³C NMR (125 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 197.1, 149.2, 135.9, 129.6, 128.9, 26.8. IČ (ATR) ν_{max} = 1651 (CO), 2090 (N₃) cm⁻¹.

6.4.2. AP-4

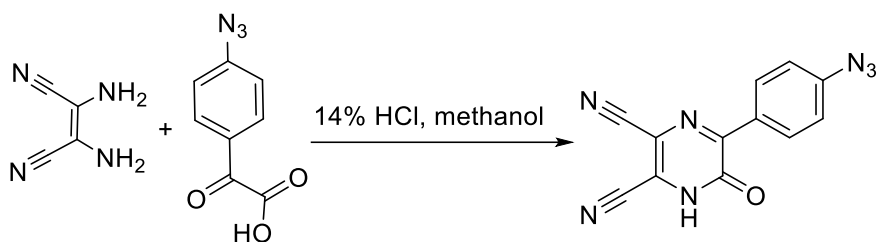


AP-1	(MW=161 g/mol)	1,61 g	10 mmol
SeO ₂	(MW=111 g/mol)	1,89 g	17 mmol

Sloučenina AP-1 a oxid seleničitý byly dispergovány a rozpuštěny ve 100 ml bezvodého pyridinu. Směs byla za míchání zahřívána na 110 °C po 1 hodinu, poté byla teplota snížena na 90 °C a ponechána tak přes noc. Po téměř kompletním vymizení výchozích látek na TLC (HEX:EAC 4:1) byl z reakční směsi odsát precipitovaný selen a promyt 50 ml DCM. Organická vrstva byla okyselena 1 M HCl, vodná fáze pak byla vytřepána s DCM, poté byla organická fáze vytřepána 3x s 1 M roztokem NaOH a nakonec byla vytřepána i s vodou. Tato vodná fáze byla okyselena na pH 1 a opět vytřepána 3x s DCM. Organická fáze byla poté vysušena bezvodým síranem sodným a rozpouštědlo bylo odpařeno. (45) Výsledná směs byla přečištěna sloupcovou chromatografií za použití uvedené mobilní fáze do vymytí skvrny výchozí látky, poté byl mobilní fází (HEX:EAC:AA 30:20:4) získán produkt. Výtěžek 1,5 g, což odpovídá 78 %.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm) 7,95 (d, 2H, ArH), 7,33 (d, 2H, ArH). ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm) 188,11; 166,63; 146,22; 131,71; 128,95; 119,96; 40,20; 40,04; 39,87; 39,70; 39,54; 39,37; 39,20.

6.4.3. AP-5

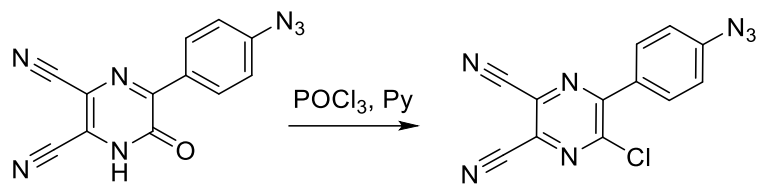


Diaminomaleonitril	(MW=191,15 g/mol)	108 mg	1 mmol
AP-4	(MW=108,1 g/mol)	191 mg	1 mmol

Diaminomaleonitril a sloučenina AP-4 byly rozpuštěny ve 2,5 ml 14% HCl a přidány 2 ml methanolu. Celá směs byla míchána 2 hodiny při laboratorní teplotě. (46) Na TLC (HEX:EAC:FA 40:20:1) bylo sledováno vymizení výchozích látek s R_f 0,6 a vznik signifikantního vedlejšího produktu s intenzivně žlutým zbarvením. Proto byla reakce ukončena a reakční směs byla ochlazená v lednici. Vzniklá sraženina byla odsáta a promyta vodou. Surový výtěžek činil 230 mg, což odpovídá 87 %. Produkt nebyl dále purifikován, ale převeden přímo na chlorovaný derivát AP-6 (viz dále).

^1H NMR (500 MHz, Ac-d_6) δ (ppm) 8,48 (d, 2H, ArH), 7,27 (d, 2H, ArH). ^{13}C NMR (125 MHz, Ac-d_6) δ (ppm) 157,32; 149,82; 144,53; 132,35; 130,85; 126,03; 122,14; 119,88; 114,87; 113,17; 30,26; 30,20; 30,10; 30,05; 29,95; 29,80; 29,64; 29,48; 29,33.

6.4.4. AP-6



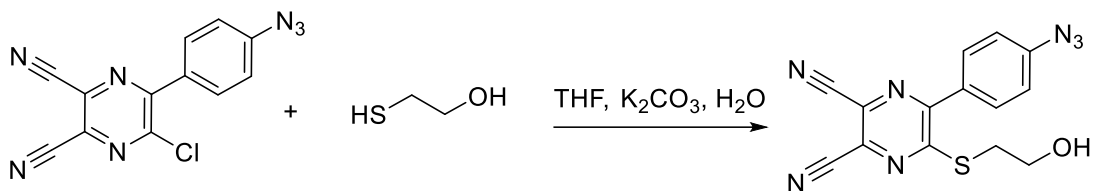
AP-5	(MW=263,22 g/mol)	191 mg	0,73 mmol
		5,73 g	21,76 mmol
POCl ₃	(MW=153,32g/mol, ρ=1,5 g/cm ³)	1,5 g ≈ 2,25 ml	9,8 mmol
		45 g ≈ 27 ml	294 mmol
pyridin	(MW=79,1 g/mol, ρ=0,982 g/cm ³)	111 mg ≈ 113 μl	1,4 mmol
		3,32 g ≈ 3,38 ml	42 mmol

Sloučenina AP-5 byla dispergována a rozpuštěna ve fosforylchloridu. Celá směs byla chlazená na 0 °C a během míchání byl pomalu přidán pyridin. Poté byla reakční směs zahřáta na 90 °C a míchána za těchto podmínek po 2 hodiny. Poté byly těkavé reagensy odpařeny za vakua a zbytek po odpaření byl extrahován do chloroformu, organická fáze byla promyta vodou a chloroform byl poté opět odpařen za vakua. (46) Na TLC (HEX:EAC 6:1) se s R_f = 0,5 objevil produkt, jehož surový výtěžek činil 104 mg. Sloučenina byla pro ověření struktury přečištěna sloupcovou chromatografií za použití uvedené mobilní fáze.

Při opakované syntéze z 5,73 g (30 mmol) byl produkt po extrakci do chloroformu a jeho odpaření překrytalizován z toluenu, byl získán v čistotě dostačující pro další reakce ve výtěžku 5,71 g, což odpovídá 93 %.

¹H NMR (500 MHz, Ac-d₆) δ (ppm) 8,05 (d, 2H, ArH), 7,36 (d, 2H, ArH). ¹³C NMR (125 MHz, Ac-d₆) δ (ppm) 156,63; 150,48; 144,70; 132,76; 131,98; 130,94; 130,47; 120,12; 113,99; 113,70; 30,26; 30,11; 29,95; 29,80; 29,60; 29,49; 29,34.

6.4.1. AP-7



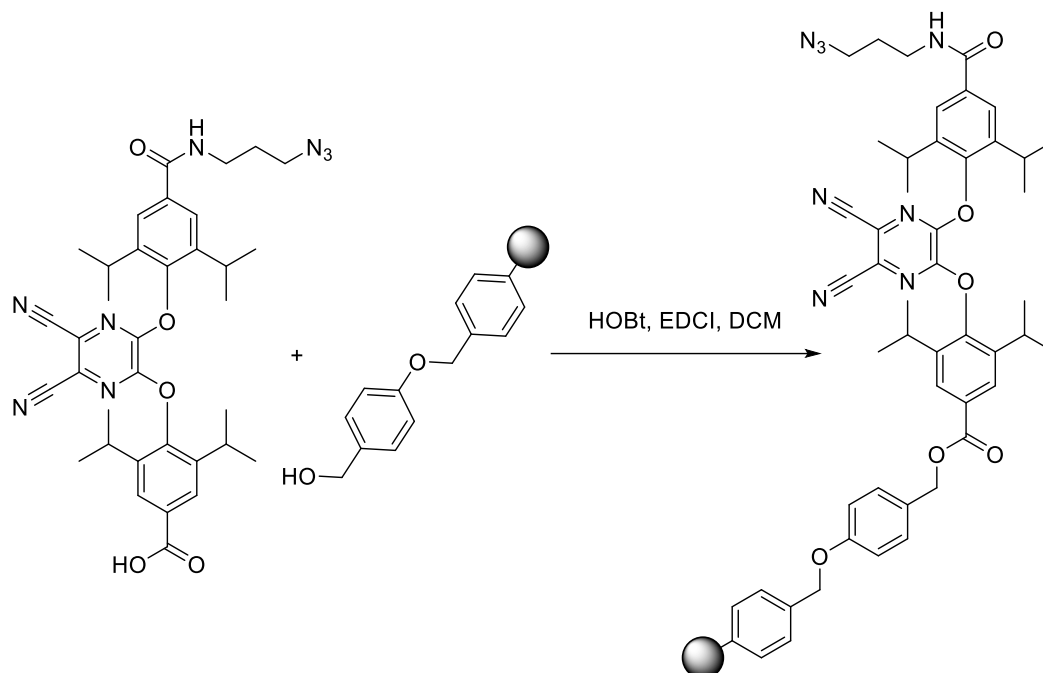
AP-6	(MW=281,66 g/mol)	845 mg	3 mmol
2-merkptoethanol	(MW=78 g/mol, ρ=1,115 g/cm ³)	257,4 mg ≈ 231 μl	3,3 mmol
K ₂ CO ₃	(MW=138 g/mol)	235 mg	1,7 mmol

Sloučenina AP-6 byla rozpuštěna ve 20 ml THF. Paralelně byl v 10 ml vody dispergován merkptoethanol a K₂CO₃, směs byla míchána do rozpuštění a následně během 20 minut přikapána k rozpuštěné AP-6. Vše bylo mícháno při laboratorní teplotě. Během 1 hodiny na TLC (HEX:EAC 2:1) zmizela výchozí látka (R_f = 0,8) a přibyl produkt (R_f = 0,25). Rozpouštědla byla odpařena za sníženého tlaku a výsledná směs byla přečištěna sloupcovou chromatografií za použití výše uvedené mobilní fáze. Výtěžek činil 527 mg, což odpovídá 54 %.

¹H NMR (500 MHz, Ac-d₆) δ (ppm) 7,95 (d, 2H, ArH), 7,32 (d, 2H, ArH), 4,36 (s, 1H, OH), 3,85 (t, 2H, CH₂), 3,47 (t, 2H, CH₂). ¹³C NMR (125 MHz, Ac-d₆) δ (ppm) 206,14; 205,98; 162,52; 155,58; 144,20; 131,99; 131,82; 130,91; 127,73; 120,15; 114,92; 114,66; 60,17; 35,05; 30,26; 30,10; 30,04; 29,95; 29,89; 29,80; 29,64; 29,48; 29,33.

6.5. Vazba na pevný nosič

6.5.1. SP SPP-17



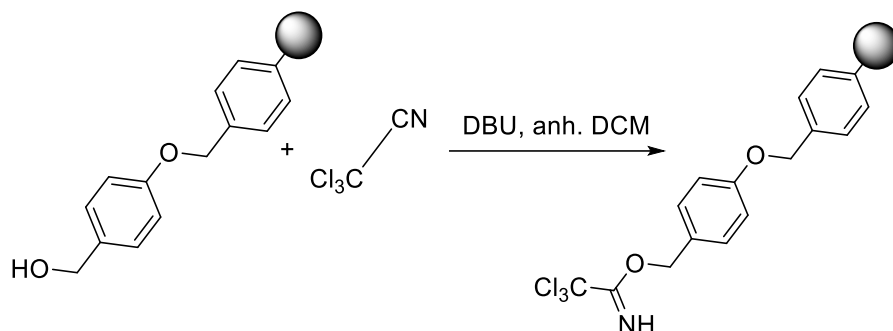
Wangova pryskyřice		250 mg	0,15 mmol
SPP-17	(MW=652,76 g/mol)	65 mg	0,1 mmol
HOBT	(MW=155.24 g/mol)	16 mg	0,1 mmol
EDCI báze	(MW=155 g/mol, $\rho=0,877$ g/cm ³)	31 mg \approx 35 μ l	0,2 mmol

EDCI báze byla rozpuštěna v DCM a poté byly všechny složky reakce včetně obou aktivátorů rozpuštěny a dispergovány v co nejmenším množství (2 ml) DMF. Celá směs byla míchána 24 hodin, poté byla pryskyřice odsáta a důkladně promyta 2 x 10 ml DMF, 3 x 10 ml DCM, 2 x 10 ml THF a ve 2 x 10 ml methanolu.

Po vysušení směsi nebylo možné výtěžek pro malé množství kvantifikovat, proto bylo přistoupeno přímo k pokusu o cyklotetramerizaci s 28 mg $Zn(CH_3COO)_2$ a 24 mg ZIP-87 v 1 ml pyridinu. Celá směs byla zahřáta na 90 °C po dobu 4 hodin. Poté byl nasazen na 1 hodinu reflux a následně byla vzniklá sraženina odsáta a propláchnuta DCM (2 x 20 ml), THF (2 x 20 ml) a methanolu (2 x 20 ml).

Pro ověření reakce byla část sloučeniny odblokována z pevné fáze mícháním ve směsi 10% TFA v DCM po 3 hodiny za laboratorní teploty. Na TLC (HEX:THF 1:1) se objevily pouze stopy symetrického makrocyklu.

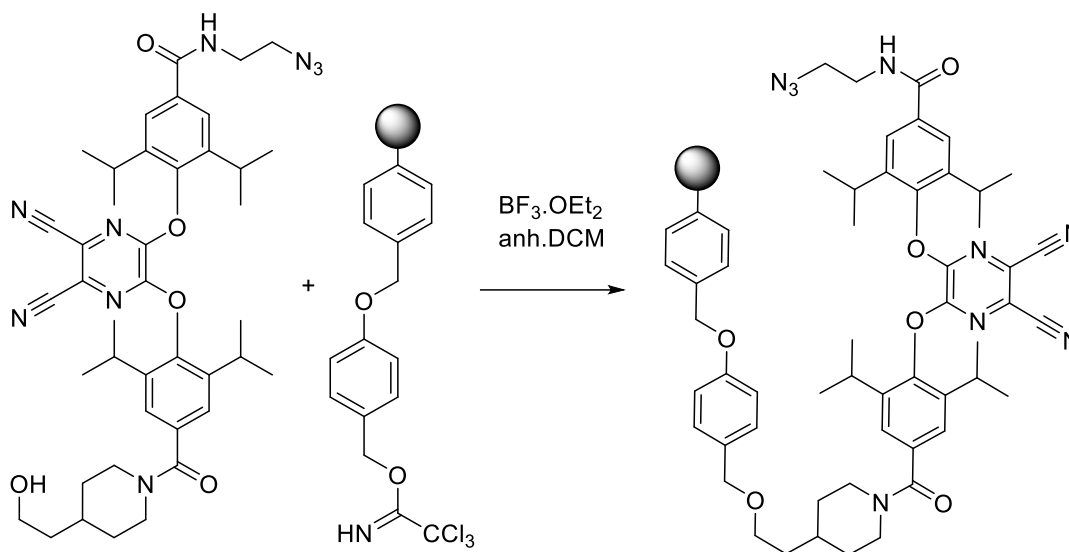
6.5.2. Trichloracetimidátovaná pryskyřice



Wangova pryskyřice	(loading 0,6 mmo/g)	1,2 g	0,72 mmol
Trichloroacetonitril	(MW=144.39 g/mol, ρ=1,44 g/cm ³)	3,119 g ≈ 2,16 ml	21,6 mmol
DBU	(MW=152.24 g/mol, ρ=1,02 g/cm ³)	0,32 g ≈ 0,314 ml	2,16 mmol

Wangova pryskyřice bobtnala 1 hodinu v 20 ml bezvodého DCM. (Baňka byla před i po přidání pryskyřice vyfoukána argonem pro odstranění vzdušné vlhkosti.) Poté k ní byl přidán trichloroacetonitril a celá směs byla zchlazena na 0 °C. Zhruba po 5 minutách bylo přidáno katalytické množství DBU. Směs byla i nadále chlazena dalších 45 minut. Během reakce bylo možné sledovat barevný přechod roztoku od bezbarvé ke světle hnědé. Po ukončení reakce byla pryskyřice promyta 3 x 20 ml DCM, 2 x 20 ml DMSO a 3 x 20 ml THF. Aktivovaná pryskyřice byla přímo použita do další reakce. (47)

6.5.1. SP SPP-16

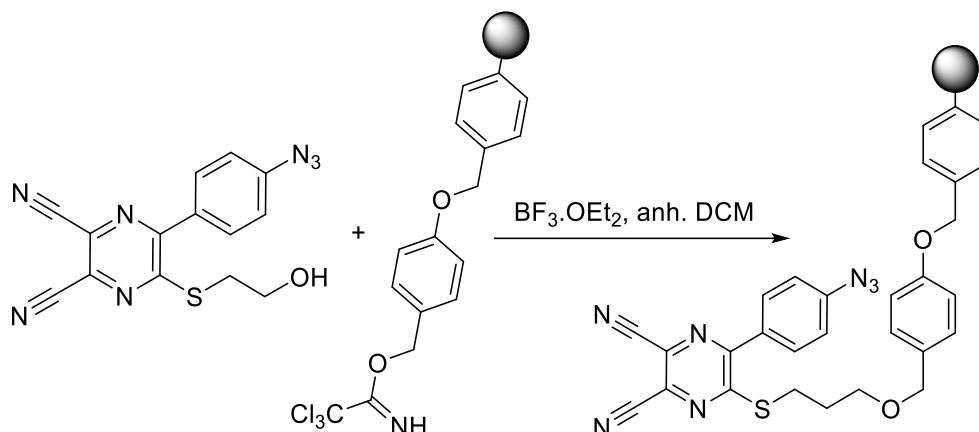


Trichloroacetimidátovaná pryskyřice		735 mg	0,441 mmol
SPP-16	(MW=764 g/mol)	237 mg	0,31 mmol
$\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$	(MW=141,92 g/mol; $\rho=1,125 \text{ g/cm}^3$)	56,25 mg \approx 50 μl	0,4 mmol

Aktivovaná pryskyřice byla před zahájením reakce vyfoukána argonem a dispergována ve 3 ml bezvodého DCM po dobu 40 minut za laboratorní teploty. Do směsi byl během 5 minut převeden souběžně připravený roztok SPP-16 ve 2 ml bezvodého DCM. Poté byl přidán $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ a směs byla míchána 72 hodin za laboratorní teploty. Pro ukončení reakce bylo přidáno 2,5 ml methanolu a 1,5 ml bezvodého DCM a ještě 3 hodiny mícháno, potom byla pevná fáze odsáta a promyta 5 x 10 ml DCM, 3 x 10 ml DMF, 3 x 10 ml THF, 3 x 20 ml AC, 3 x 10 ml methanolu a nakonec 3 x 10 ml H_2O . (47) Hmotnost pevné fáze činila 789 mg (teoreticky maximálně 735 + 237 = 972 mg), přírůstek hmotnosti tedy činil 54 mg (23 % teoreticky možného).

Pro ověření navázání SPP-16 bylo odebráno 65 mg pevné fáze a odblokováno mícháním ve 20 ml směsi 10% TFA v DCM po dobu 3 hodin za laboratorní teploty. Na TLC (HEX:THF 1:1) se neobjevily žádné stopy SPP-16.

6.5.2. SP AP-7



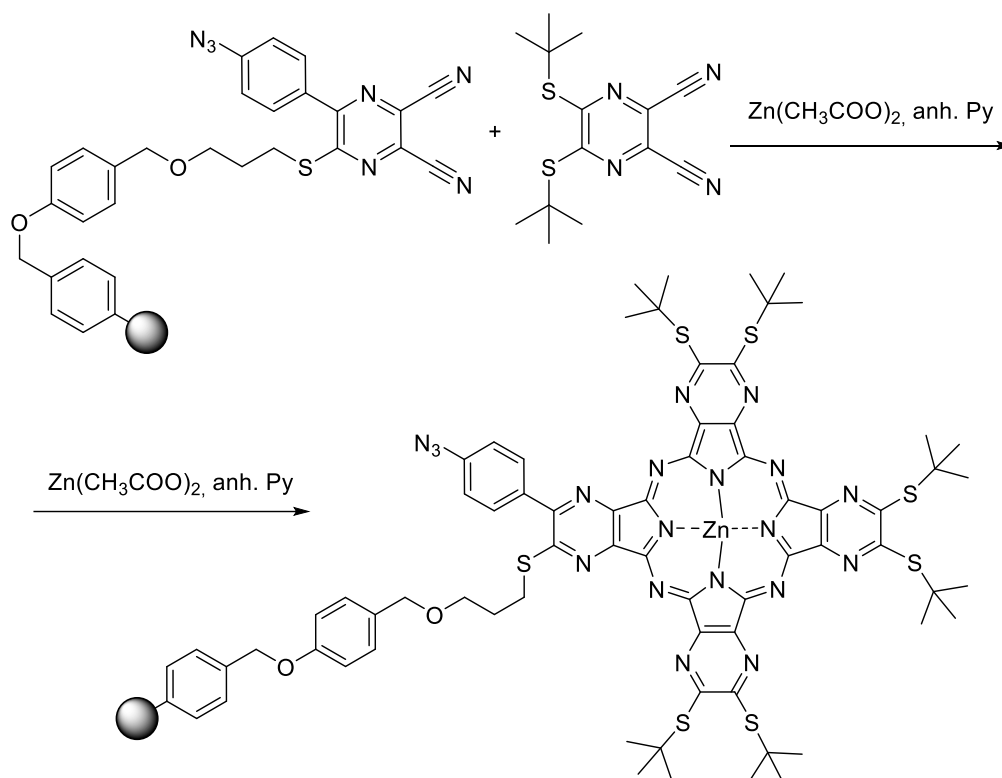
Trichloroacetimidátovaná pryskyřice

	(loading teoreticky max. 0,6 mmol/g)	750 mg	0,45 mmol
AP-7	(MW=323,33 g/mol)	145 mg	0,45 mmol
BF ₃ .OEt ₂	(MW=141,92 g/mol; ρ=1,125 g/cm ³)	56 mg ≈ 50 μl	0,4 mmol

Aktivovaná pryskyřice byla dispergována v co nejmenším množství bezvodého DCM (10 ml) a po 40 minut míchána. Sloučenina AP-07 byla rozpuštěna ve 2 ml bezvodého DCM, pro nízkou rozpustnost byl přidán 1 ml bezv. DMF. Po rozpuštění byl roztok přikapán postupně během 5 minut k pryskyřici v DCM. Poté bylo přidáno 50 μl BF₃.OEt₂ a mícháno přes noc. Pro ukončení reakce byly přidány 3 ml bezvodého methanolu a 2 ml bezvodého DCM, a ještě mícháno po 3 hodiny, poté byla pevná fáze odsáta a promyta DCM (3 x 20 ml), THF (3 x 20 ml) a znovu DCM (4 x 20 ml). (47)

Navázání SP AP-7 bylo ověřeno odebráním 65 mg SP AP-7 a jeho odblokováním ve 20 ml směsi 10% TFA v DCM po 3 hodiny za laboratorní teploty. Odpařením rozpouštědel ze směsi po odblokování bylo získáno 7 mg pevného produktu, což odpovídá výtěžku 56 %. Na TLC (HEX:EAC 2:1) produktu se objevila pouze skvrna AP-7. Loading tedy činil 7 mg/65 mg, 352 μmol/g.

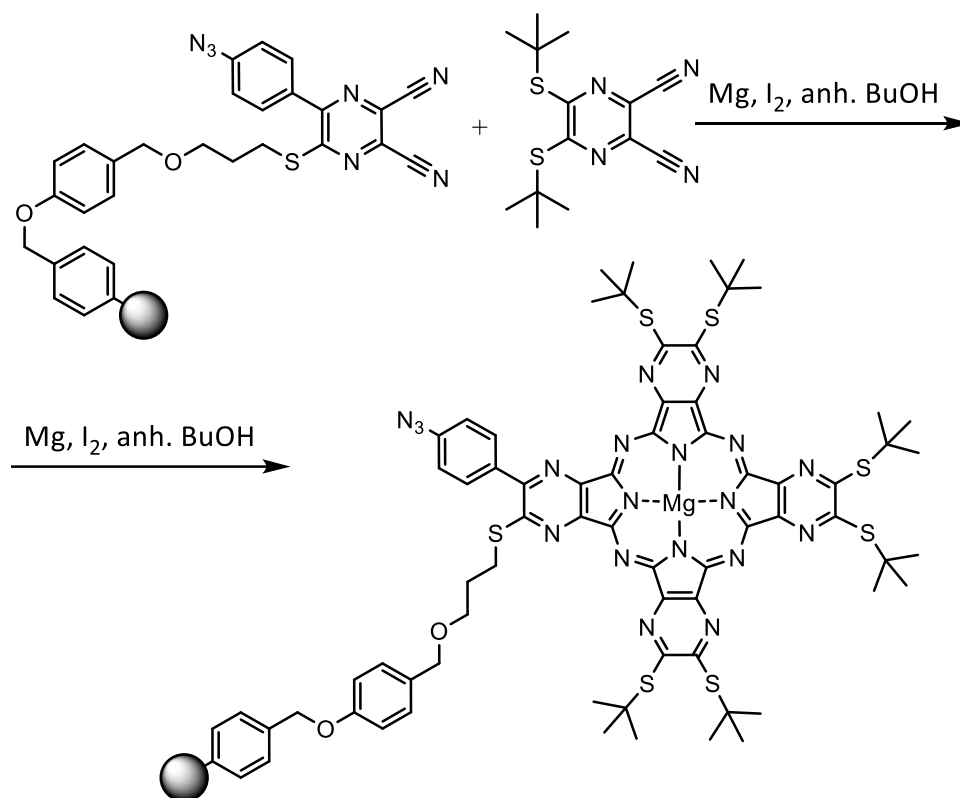
6.5.2.1 SP AP-7+ZIP 21 A



ZIP-21	(MW=306.45 g/mol)	30 mg	0,1 mmol
Zn(CH ₃ COO) ₂	(MW=183.47 g/mol)	55 mg	0,3 mmol
SP-AP7		65 mg	0,023 mmol

Všechny složky byly dispergovány v 1 ml pyridinu a byly zahřívány na 90 °C po 4 hodiny. Poté byla směs dána na 1 hodinu pod reflux. Při reakci bylo možné sledovat přechod zbarvení reakční směsi i pevné fáze z béžové na tmavě zelenou. Pevná fáze byla nakonec odfiltrována a propláchnuta DCM (3 x 20 ml), THF (3 x 20 ml) a methanolem (3 x 20 ml). Pro kontrolu bylo provedeno odblokování části pevné fáze mícháním ve směsi 10% TFA v DCM po 3 hodiny při laboratorní teplotě. Na TLC (T:THF 20:1) byly patrné jen stopy pravděpodobně cyklotetramerizované asymetrické frakce, většina produktu uvolněná do roztoku byla symetrická.

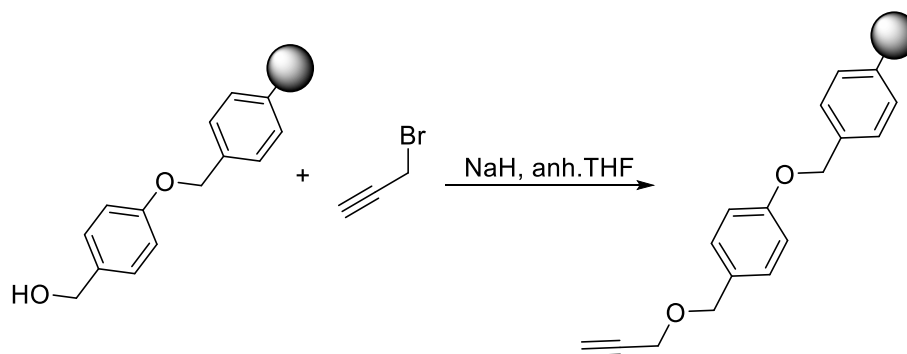
6.5.2.2 SP AP-7+ZIP 21 B



Mg	(MW=24,303 g/mol)	142 mg	5,9 mmol
ZIP-21	(MW=306,45 g/mol)	129 mg	0,422 mmol
SP-AP7		600 mg	0,211 mmol

SP-AP7 bylo dispergováno a mícháno v 1 ml bezvodého butanolu při laboratorní teplotě přes noc. Směs 7 ml bezvodého butanolu, Mg a krystalku I₂ byla zahřívána 4 hodiny pod refluxem na 115 °C. Poté byl do směsi s SP-AP7 přidán ZIP-21 a obě směsi byly smíchány a nechány i nadále pod refluxem přes noc. Potom byla pevná fáze promyta v DCM (3 x 20 ml), THF (3 x 20 ml), DMF (3 x 20 ml), methanolu (3 x 20 ml) a pyridinem (3 x 20 ml). Pevná fáze po promytí byla hnědá, ne zelená. Pro ověření výsledku reakce se 600 mg SP dispergovalo v 20 ml 10% TFA v DCM a míchalo se 3 hodiny při laboratorní teplotě. V roztoku po odblokování nebyl patrný žádný asymetrický produkt.

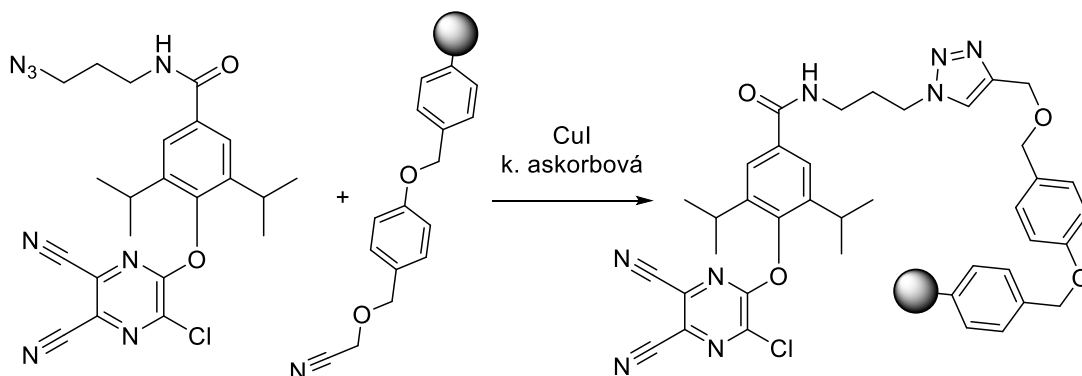
6.5.3. Propargylovaná pryskyřice



Wangova pryskyřice		2 g	1,2 mmol
NaH	(MW=46,98 g/mol)	144 mg	6 mmol
Propargylbromid	(MW=118,96 g/mol)	714 mg	6 mmol

2 g pryskyřice byly dispergovány v bezvodém DMF. Směs byla ochlazená na 0 °C a postupně byl přidán NaH (240 mg 60% NaH v minerálním oleji, 0,85 g/ml). Reakční směs se míchala 2 hodiny při 0 °C. Poté byl přidán propargylbromid (892 mg/646 μl 80% propargylbromidu v toluenu) a směs byla míchána při laboratorní teplotě přes noc. (48; 49) Po odsátí pevné fáze byla promyta v 3 x 20 ml toluenu, 3 x 20 ml THF a 3 x 20 ml hexanu. Hmotnost modifikované pevné fáze byla 2,125 g (teoreticky maximálně 2,143 g), výtěžek tedy činil 88 %.

6.5.4. SP SPP-10 click



Propargylovaná pryskyřice		166 mg	0,1 mmol
SPP-10	(MW=466,93 g/mol)	93 mg	0,2 mmol
CuI	(MW=190,45 g/mol)	1,9 mg	0,01 mmol
Kyselina askorbová	(MW=176,12 g/mol)	18 mg	0,1 mmol

Před zahájením reakce byla baňka i pryskyřice vyfoukána argonem. Do ní byly následně přidány všechny ostatní složky a dispergovány v THF s DIPEA v poměru 2:1 v přibližném množství 1 ml. Před průběhem samotné reakce byla směs ještě jednou probublána argonem, poté byla směs přes noc míchána za laboratorní teploty. (48; 49) Poté pevná fáze odfiltrována, důkladně promyta postupně v 3 x 10 ml AC, 3 x 10 ml MeOH a 3 x 10 ml H₂O. Hmotnost pevné fáze 193 mg (teoreticky max. 166 + 46,7 = 212,7 mg), výtěžek činil 27 mg, tedy 58 %.

7. DISKUZE

Syntéza AzaPc se obecně skládá ze dvou částí, cyklotetramerizace vhodných prekurzorů a jejich samotné syntézy. To byly také stěžejní body této diplomové práce. Naším cílem bylo ověřit možnost přípravy asymetrických TPyzPz s periferními substituenty, nesoucími azidovou a primární alkoholickou skupinu, metodou syntézy na pevné fázi. Zároveň jsme chtěli zamezit agregaci sloučenin v polárních i nepolárních rozpouštědlech. To lze zavedením prostorově výrazných periferních substituentů s polárními skupinami do výsledného TPyzPz. Vzhledem k tomu, že cílové molekuly by měly být použitelné jako fluorofory, jsme jako klíčový substituent zvolili 4-hydroxy-3,5-isopropyl benzoovou kyselinu (SPP-01), resp. její funkční deriváty (vazba periferních substituentů na makrocyklus AzaPc přes kyslík podporuje emisi absorbované energie fotonu formou fluorescence na úkor produkce singletového kyslíku).

7.1. Syntéza substituentů

7.1.1. SPP-01, SPP-07, SPP-05, SPP-08

V první fázi jsme se snažili alkylovat kyselinu 4-hydroxybenzoovou isopropylalkoholem, ovšem v počátečních pokusech byla výsledná směs i po snaze o vysrážení velmi silně znečištěna a díky několikanásobnému přečišťování sloupcovou chromatografií se čistý výtěžek pohyboval ve velmi nízkých hodnotách (22 %). Proto jsme zkusili připravit produkt jinou metodou, methoxykarbonylací propofolu, čímž jsme docílili methylesteru původně připravované kyseliny (SPP-07). Tu jsme získali následnou bazickou hydrolyzou s čistým výtěžkem 84 %. Nicméně jsme pokračovali v optimalizaci izolace a krystalizace produktu původní reakce, ve které se ukázalo důležitým krokem vytřepání methanolického roztoku látky s hexanem, do kterého přešly jinak těžko oddělitelné vedlejší produkty reakce. Poté už nebyl problém celý produkt vykrytalizovat v kyselém prostředí a výtěžek s vysokou čistotou znásobit (71 %). I když byl výtěžek této reakce o něco nižší než v případě methoxykarbonylace, zvolili jsme ji jako primární způsob přípravy prekurzoru z důvodu potřeby přípravy velkého množství výchozí látky pro následující reakce. Krok krystalizace totiž odboural zdlouhavé přečišťování sloupcovou chromatografií.

V dalším kroku jsme se snažili pomocí nukleofilní substituce nahradit oba atomy chloru obsažené v 5,6-dichlor-2,3-dikyanpyrazinu právě připravenou kyselinou v pyridinu (SPP-05), v tomto prostředí ovšem reakce vedla ke vzniku silně tmavě zbarvené směsi produktů, jež od sebe nešly izolovat. Další pokusy jsme provedli za přítomnosti roztoku NaOH o různé molaritě. Avšak silná báze přednostně napadala kyanoskupiny za tvorby vedlejšího produktu. Jako vhodné prostředí se pro tuto reakci nakonec ukázala slabá báze K_2CO_3 , ovšem na základě NMR analýzy

jsme zjistili, že vznikl výhradně monosubstituovaný produkt a ve velmi malém výtěžku (15 %). Proto jsme zkusili na 5,6-dichlor-2,3-dikyanpyrazin navázat dříve syntetizovaný 4-methylester kyseliny 3,5-diisopropylbenzoové. V přítomnosti uhličitanu draselného reakce probíhala do druhého stupně (látka SPP-08), ovšem následná hydrolýza esteru na kyselinu probíhala pouze v přítomnosti silné báze KOH, která opět tvořila vedlejší produkt hydrolýzou kyanoskupin. Rozhodli jsme se tedy upravit náš původní plán syntézy, a místo abychom navazovali další substituenty až na karboxylovou funkci kyseliny 4-hydroxy-3,5-diisopropylbenzoové, již vázané na pyrazinu, jsme přistoupili nejprve k přípravě celého periferního substituentu amidací uvedené kyseliny a následně k jeho substituci na 5,6-dichlor-2,3-dikyanpyrazinové jádro. Tím jsme chtěli využít faktu, že v ekvimolárních množstvích reaktantů vzhledem ke sterickému bránění nukleofilní substituce probíhá téměř výhradně do prvního stupně a odpadají tak případné ztráty ve formě nežádoucích symetrických disubstituovaných derivátů.

7.1.2. SPP-09, SPP-11, SPP-14

Začali jsme přípravou substituentů nesoucích primární alkoholickou skupinu (SPP-11, SPP-14). Provedli jsme amidaci kyseliny 4-hydroxy-3,5-diisopropylbenzoové různými aminy s alkoholickou skupinou. Pro katalýzu jsme zvolili EDCI bázi, která aktivuje karboxylovou skupinu, a pro aktivaci aminové skupiny jsme použili nukleofilní bázi DMAP. Tato katalýza se ukázala jako nedostatečná, proto jsme přidali ještě nenukleofilní bázi DIPEA, která podpořila větší aktivaci aminové skupiny. V této kombinaci reakce dosahovaly již uspokojivých výtěžků kolem 50 %.

Při syntéze substituentu nesoucích azidovou skupinu (SPP-09) jsme se pokusili využít methylesteru kyseliny 4-hydroxy-3,5-diisopropylbenzoové, jež by za podpory TBD, tedy silné guanidinové báze, podstoupil aminolýzu s různými aminoazidy a vytvořil tak přímo kýžený amid. Přestože použití TBD pro usnadnění přímé aminolýzy je běžné, naše reakce probíhala velmi neochotně za opravdu nízkého výtěžku a tato metoda musela být předčasně ukončena. Pravděpodobně by bylo potřeba většího přebytku aminu tak, aby se přímo v něm výchozí látka zcela rozpustila, čehož se nám vzhledem k limitovanému množství azidoaminů nepodařilo dosáhnout. Nakonec jsme tedy i azidové substituenty syntetizovali amidací kyseliny pomocí DMAP, DIPEA, EDCI. Ta však vycházela s malým výtěžkem (20 %). V rámci zlepšení výtěžnosti reakce jsme provedli i amidaci katalyzovanou EDCI a HOBt, kdy HOBt vytváří ze vzniklé *O*-acylmočoviny více reaktivní ester kyseliny 4-hydroxy-3,5-diisopropylbenzoové a podporuje tak proces amidace. Tímto dosáhla reakce více než dvojnásobného výtěžku (50 %).

7.1.3. SPP-10, SPP-12, SPP-20, SPP-15, SPP-16, SPP-17

Při nukleofilní substituci 5,6-dichlor-2,3-dikyanpyrazinu 4-hydroxy-3,5-diisopropylbenzamidů, nesoucími azid, jsme znovu využili bazického prostředí K_2CO_3 , tentokrát již za uspokojivějšího výtěžku 55 %. Znovu se navíc potvrdilo, že v ekvimolárních poměrech reakce probíhá pouze do požadovaného prvního stupně. K připravenému monosubstituovanému pyrazinovému derivátu jsme přidali substituent s primární alkoholickou skupinou. Vše probíhalo za stejných podmínek jako při předchozí reakci s vysokým výtěžkem (75 %). Ovšem pokud jsme jako druhý substituent zkusili zavést volnou kyselinu 4-hydroxy-3,5-diisopropylbenzoovou, výtěžek opět klesl na 28 %, z tohoto důvodu jsme nakonec provedli substituci i v prostředí hydrogenuhličitanu sodného, se kterým jsme dosáhli o něco vyšších výtěžků a vyšší čistoty produktu.

7.1.4. Řada AP

Tato série produktů vznikla z důvodu neúspěchů při vázání sloučenin z řady SPP na pevný nosič (viz dále). Cílem bylo zjistit, jestli důvodem, proč jsme po cyklotetramerizaci na pevné fázi nezískali asymetrický AzaPc, byla nestabilita kyslíkového můstku, jímž byly substituenty připojeny k pyrazinu. Chtěli jsme tedy připravit sloučeniny, které by měly substituenty vázány vazbou uhlík-uhlík, která je chemicky velmi stabilní. Tomu jsme přizpůsobili přípravu a použili k syntéze kondenzaci vicinálního diketonu, resp. α -ketokarboxylové kyseliny a DAMN.

Vycházeli jsme z 4-aminoacetofenonu, jež jsme nejdříve převedli na azid (AP-1). Poté jsme jej oxidovali pomocí oxidu seleničitého na karboxylovou kyselinu (AP-4). Pak proběhla kondenzace vicinálních kyslíkových substituentů s diaminomaleonitrilem za vzniku pyrazinového jádra (AP-5). Ketoskupinu jsme zaměnili za chlorid pomocí fosforylchloridu (AP-6) a nakonec jsme jádro opět nukleofilně substituovali, ovšem tentokrát za použití thiolu nesoucího zároveň primární alkoholickou skupinu (AP-7). Síra je sice, co se fluorescenčních vlastností týče, o něco méně výhodný heteroatom než kyslík, nicméně její vazba ve struktuře je stálejší. Takto připravený prekurzor, jenž fakticky vyhovoval všem našim požadavkům, jsme dále vázali na příslušně aktivovanou pevnou fázi.

7.2. Vazba na pevný nosič a cyklotetramerizace

Před samotným uchycením připraveného prekurzoru na pevnou fázi ji bylo nutné aktivovat navázáním vhodné reaktivní skupiny. Bez aktivace navázání na modifikovanou pryskyřici neprobíhalo, což jsme vyzkoušeli s prekurzorem SPP-17. Protože jsme chtěli prekurzor na pevnou fázi navázat prostřednictvím etherové vazby, zvolili jsme aktivaci hydroxylové skupiny

Wangovy pryskyřice pomocí trichloracetionitrilu, který v bezvodém prostředí za přítomnosti DBU vytvoří trichloracetimidátovou funkční skupinou aktivovanou Wangovou pryskyřici.

Na tu byl následně vázán připravený prekurzor přes primární alkoholickou skupinu. Vše probíhalo opět v bezvodém prostředí a za účasti komplexu fluoridu boritého s diethyletherem, který působí v reakční směsi jako silná Lewisova kyselina. Pro ověření úspěchu reakce byla odebrána část výtěžku a zpětně odblokována mícháním s kyselinou trifluoroctovou. Tímto způsobem bylo zjištěno, zda vázání na pevnou fázi touto metodou proběhlo, či neproběhlo úspěšně. Touto metodou jsme se pokoušeli navázat na pevnou fázi prekurzory AP-7 a SPP-16.

V případě pokusu o navázání SPP-16 na trichloracetimidátovou pryskyřici jsme po experimentálním odblokování nezískali z pevné fáze žádný prekurzor, pravděpodobně se tedy navázání nepodařilo.

V případě AP-7 jsme po zkušebním odblokování navázaného prekurzoru z pevné fáze získali v roztoku výchozí AP-7 (identita ověřena TLC), loading 352 $\mu\text{mol/g}$, což by bylo pro další práci dostatečné. Nicméně po experimentální cyklotetramerizaci v bezvodém pyridinu za použití $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ jsme odblokováním z pevné fáze získali jen stopy látky, jejíž R_f na TLC by odpovídalo předpokládanému nesymetrickému produktu, drtivou většinou barviva po odblokování byl symetrický AzaPc (porovnáno na TLC s dříve připravenou látkou). Není tedy zřejmé, jestli vazba monomeru na pevné fázi vydržela podmínky cyklotetramerizace. Dalším experimentu, pokus o cyklotetramerizaci s butanolátem hořečnatým v bezvodém butanolu, jsme nezískali po odblokování z pevné fáze žádný produkt.

Dále jsme vyzkoušeli esterovou vazbu prekurzoru SPP-17, nesoucího volnou karboxylovou skupinu, přímo na nemodifikovanou primárně alkoholickou skupinu Wangovy pryskyřice. Vzhledem k malému výtěžku modifikované pevné fáze jsme provedli přímo cyklotetramerizační reakci s 28 mg $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ a 24 mg ZIP-87 v 1 ml bezvodého pyridinu. Po odsátí a promytí pevné fáze z této reakce jsme provedli odštěpení produktu, bohužel jsme získali jen stopy symetrického AzaPc, nesymetrický produkt nebyl na TLC detekován.

Vzhledem k předchozím neúspěchům jsme přistoupili k pokusu o vázání prekurzoru na pevnou fázi „click“ reakcí typu Huisgenovy katalyzované cykloadice s využitím azidoskupiny na jednom ze substituentů. Tím bychom sice v případě úspěšné syntézy přišli o azidoskupinu na nesymetrickém AzaPc, potřebnou k vazbě na oligonukleotidy, nicméně bychom ověřili možnost provedení syntézy AzaPc na pevné fázi. Pryskyřice byla pro tento účel modifikována navázáním propargylalkoholu za vzniku etherické vazby pro pozdější odblokování kyselinou trifluorvodíkovou. Na propynylovou skupinu byl poté vázán prekurzor prostřednictvím

azidoskupiny za tvorby triazolového spojovacího můstku. Tato reakce byla vyzkoušena s prekurzorem SPP-10 s výtěžkem (hmotnostním přírůstkem pevné fáze) 58 % z teoreticky možného množství. Z časových důvodů se už v rámci diplomové práce bohužel nestihlo provést s touto modifikovanou pevnou fází cyklotetramerizaci.

8. ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce bylo ověření možnosti využití metody syntézy na pevné fázi pro přípravu asymetrického TPyzPz typu AB₃, resp. příprava prekurzoru A, jenž by nesl dvě funkční skupiny pro vazbu na další struktury, měl by prostorově výrazné substituenty pro zamezení agregace a umožňoval by následně přípravu TPyzPz rozpustných ve vodném prostředí, zakotvení tohoto prekurzoru na pevné fázi a následnou cyklotetramerizaci.

V rámci DP se podařilo optimalizovat syntézu klíčové výchozí látky, kyseliny 4-hydroxy-3,5-diisopropylbenzoové, a výrazně jsme zvýšili výtěžnost a čistotu produktu díky izolaci látky pomocí krystalizace. Podařilo se vybrat vhodné katalyzátory (EDCI, HOBt) a postupy přípravy amidových periferních substituentů. Vybranými metodami byly připraveny tyto amidy:

N-(3-azidopropyl)-4-hydroxy-3,5-diisopropylbenzamid (SPP-09)

N-(2-(2-(2-(2-azidoethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl)-4-hydroxy-3,5-diisopropylbenzamid (SPP-11)

(4-hydroxy-3,5-diisopropylfenyl)(4-(2-hydroxyethyl)piperidin-1-yl)metanon (SPP-14)

Optimalizovali jsme prostředí, ve kterém dochází k substituci 5,6-dichlor-2,3-dikyanpyrazinu (K₂CO₃, resp. NaHCO₃ ve směsi THF/voda). Připraveno bylo 8 derivátů 2,3-dikyanpyrazinu:

4-((3-chloro-5,6-dikyanpyrazin-2-yl)oxy)-3,5-diisopropylbenzoová kyselina (SPP-05)

Dimethyl-4,4'-((5,6-dikyanpyrazin-2,3-diyl)bis(oxy))bis(3,5-diisopropylbenzoát) (SPP-08)

N-(3-azidopropyl)-4-((3-chloro-5,6-dikyanpyrazin-2-yl)oxy)-3,5-diisopropylbenzamid (SPP-10)

N-(2-(2-(2-(2-azidoethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl)-4-((3-chloro-5,6-dikyanpyrazin-2-yl)oxy)-3,5-diisopropylbenzamid (SPP-12)

N-(2-(2-(2-(2-azidoethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl)-4-((5,6-dikyan-3-(2-(2-hydroxyethoxy)ethoxy)pyrazin-2-yl)oxy)-3,5-diisopropylbenzamid (SPP-15)

N-(2-azidoethyl)-4-((5,6-dikyan-3-(4-(4-(2-hydroxyethyl)piperidine-1-carbonyl)-2,6-diisopropylfenoxy)pyrazin-2-yl)oxy)-3,5-diisopropylbenzamid (SPP-16)

4-((3-(4-((3-azidopropyl)karbamoyl)-2,6-diisopropylfenoxy)-5,6-dikyanpyrazin-2-yl)oxy)-3,5-diisopropylbenzoová kyselina (SPP-17)

5-chloro-6-(2-(2-hydroxyethoxy)ethoxy)pyrazin-2,3-dikarbonitril (SPP-20)

Vazbu na pevnou fázi jsme prováděli třemi způsoby:

- 1) Prostřednictvím etherové vazby reakcí primární alkoholické skupiny substituentů s trichloracetamidátovou skupinou aktivované pevné fáze. Tato vazba se jevila úspěšná v případě prekurzoru SP-7, nicméně následná cyklotetramerizace poskytla požadovaný produkt jen ve stopovém množství.

- 2) Přímo esterifikací primární alkoholické skupiny pevné fáze karboxylovou funkcí prekurzoru. Následná cyklotetramerizace neposkytla žádný asymetrický TPyzPz.
- 3) Přes triazolový můstek reakcí azidové skupiny prekurzoru na propargylskupinu předběžně etherovou vazbou připojenou k alkoholické skupině pevné fáze. Vazba prekurzoru na pevnou fázi Huisgenovou cykloadicí se zdá být úspěšnější, z časových důvodů se bohužel nepodařilo ověřit její využitelnost cyklotetramerizací.

9. POUŽITÁ LITERATURA

1. **Kadish K.M., Smith K.M., Guillard R.** *Handbook of Porphyrin Science*. Singapore : World Scientific, 2010. 978-981-4280-16-7.
2. **Zimcik P., Novakova V., Miletin M., Kopecky K.** Azaphthalocyanines Containing Pyrazine Rings with Focus on the Alkylheteroatom, Aryl and Heteroaryl Substitution and Properties Important in Photodynamic Therapy. *Makroheterocycles*. 1, 2008, Sv. 1, 1, stránky 21-29.
3. **Zimcik, Petr.** *Azaftalocyaniny – od syntézy přes fotochemické a fotofyzikální vlastnosti k aplikacím*. místo neznámé : Chem. listy, 2012.
4. **Mørkved E.H., Ossletten H., Kjøsen H.** Preparation of Octa(alkoxy) Azaphthalocyanines. *Acta Chem. Scand.* 1999, Sv. 53, stránky 1117-1121.
5. **Zimcik P., Miletin M., Kostka M., Schwarz J., Musil Z., Kopecky K.** Synthesis and comparison of photodynamic activity of alkylheteroatom substituted azaphthalocyanines. *J. Photochem. Photobiol. A-Chem.* 2004, Sv. 163, stránky 21-28.
6. **Kostka M., Zimcik P., Miletin M., Klemra P., Kopecky K., Musil Z.** Comparison of aggregation properties and photodynamic activity of phthalocyanines and azaphthalocyanines. *J. Photochem. Photobiol. A-Chem.* 2006, Sv. 178, stránky 16-25.
7. **Kopecky K., Zimcik P., Novakova V., Miletin M., Musil Z., Stribrna J.** The synthesis and characterization of metal-free, unsymmetrical azaphthalocyanines with hydroxy groups and their complex formation with pyridine. *Dyes Pigment.* 2008, Sv. 78, 3.
8. **Yang H.X., Sargent, J.R., Hay A.S.** Preparation and properties of novel soluble poly(arylether)s bearing covalently bound tetrapyrazinoporphyrazine units. *J. Polym. Sci. Pol. Chem.* 1995, Sv. 33, 6, stránky 989-997.
9. **Zimcik P., Miletin M., Radilova H., Novakova V., Kopecky K., Svec J., Rudolf E.** Synthesis, Properties and In Vitro Photodynamic Activity of Water-soluble Azaphthalocyanines and Azanaphthalocyanines. *Photochem. Photobiol.* 2010, Sv. 86, 1, str. 168.
10. **Novakova V., Zimcik P., Miletin M., Kopecky K., Ivincova J.** A phthalocyanine-mestranol conjugate for photodynamic therapy prepared via click chemistry. *Tetrahedron Lett.* 2010, Sv. 51, 7, stránky 1016-1018.
11. **Musil Z., Zimcik P., Miletin M., Kopecky K., Petrik P., Lenco J.** Influence of electronwithdrawing and electron-donating substituents on photophysical properties of azaphthalocyanines. *J. Photochem. Photobiol. A.* 2007, Sv. 186, stránky 316-322.

12. **Petrik P., Zimcik P., Kopecky K., Musil Z., Miletin M., Loukotova V.** Protonation and deprotonation of nitrogens in tetrapyrazinoporphyrazine macrocycle. *J. Porphyrins Phtalocyanines*. 2007, Sv. 11, stránky 487-495.
13. **Kudrevich S.V., Galpern M.G., van Lier J.E.** Synthesis of octacarboxytetra (2,3-pyrazino)porphyrazine: novel water soluble photosensitizers for photodynamic therapy. *Synthesis*. 1994, Sv. 8, stránky 779-781.
14. **Kudrevich S.V., van Lier J.E.** Azaanalogs of phthalocyanine: Syntheses and properties. *Coord. Chem. Rev.* 1996, Sv. 156, stránky 163-182.
15. **Musil Z., Zimcik P., Miletin M., Kopecky K., Lenco J.** Synthesis, separation and UV/vis spectroscopy of pyrazinoquinoxalinoporphyrazine macrocycles. *Eur. J. Org. Chem.* 2007, Sv. 27, stránky 4535-4542.
16. **W., Freyer.** Okta-(4-tert-butylphenyl)-tetrapyrazinoporphyrazin und davon abgeleitete metallkomplexe. *J. Prakt. Chem.* 1994, Sv. 336, stránky 693-694.
17. **Zimcik P., Novakova V., Kopecky K., Miletin M., Kobak R.** Magnesium Azaphthalocyanines: An Emerging Family of Excellent. *American Chemical Society*. 1, 2012, Sv. 1, 51, stránky 4215-4223.
18. **Kopecky K., Novakova V., Miletin M., Kucera R., Zimcik P.** Synthesis of new azaphthalocyanine dark quencher and evaluation of its quenching efficiency with different fluophores. *Tetrahedron*. 1, 2011, Sv. 67, 1, stránky 5956-5963.
19. **Miletin, Miroslav.** *Biologicky aktivní látky na bázi dusíkatých heterocyklů*. 2013. Habilitační práce.
20. **Bruseghini I., Fabbrizzi L., Licchelli M., Taglietti A.** Coordinative control of photoinduced electron transfer: bulky carboxylates as molecular curtains. *Chem. Commun.* 2002, Sv. 13, p., stránky 1348-1349.
21. **Daraio M.E., Völker A., Aramendía P.F., San Roman E.** Reaction of zinc phthalocyanine excited states with amines in cationic micelles. *Langmuir*. 1996, Sv. 12, stránky 2932-2938.
22. **Druzhinin S.I., Dubbaka S.R., Knochel P., Kovalenko S.A., Mayer P., Senyushkina T., Zachariasse K.A.** Ultrafast Intramolecular Charge Transfer with Strongly Twisted Aminobenzonitriles: 4-(Di-tert-butylamino)benzonitrile and 3-(Di-tert-butylamino)benzon. *J. Phys. Chem. A*. 2008, Sv. 112, 13, stránky 2749-2761.

23. **Novakova V., Miletin M., Kopecky K., Zimcik P.** Red-Emitting Dyes with Photophysical and Photochemical Properties Controlled by pH. *Chem. Eur. J.* 2011, Sv. 17, no., 50, p., stránky 14273-14282.
24. **Novakova V., Mørkved E.H., Miletin M., Zimcik P.** Influence of protonation of peripheral substituents on photophysical and photochemical properties of tetrapyrazinoporphyrazines. *J. Porphyrins Phthalocyanines*. 2010, 14, stránky 582-591.
25. **Zimcik P., Miletin M., Musil Z., Kopecky K., Slajsova D.** The synthesis and characterization of novel unsymmetrical azaphthalocyanines containing one carboxylic group. *Dyes Pigment*. 2008, Sv. 77, 2, stránky 281-287.
26. **Clegg, R.M.** Fluorescence resonance energy-transfer and nucleic acids. *Meth. Enzymol.* 1992, Sv. 211, stránky 353-388.
27. **Lakowicz, J.R.** *Principles of fluorescence spectroscopy*. New York : Springer, 2006. 978-0-387-31278-1.
28. **Novakova, Veronika.** *Příprava a studium vlastností azaanalogů ftalocyaninů*. 2011. Disertační práce.
29. **Makhseed S., Ibrahim F., Bezzu C.G., McKeown N.B.** The Synthesis of Metal-Free Octaazaphthalocyanine Derivatives Containing Bulky Phenoxy substituents to prevent self-association. *Tetrahedron Lett.* 2007, Sv. 48, 41, stránky 7358-7361.
30. **Zimcik P., Miletin M., Musil Z., Kopecky K., Kubza L., Brault D.** Cationic azaphthalocyanines bearing aliphatic tertiary amino substituents-Synthesis, singlet oxygen production and spectroscopic studies. *J. Photochem. Photobiol. A - Chem.* 2006, Sv. 183, stránky 59-69.
31. **Beharry, Andrew A.** *Next-Generation Photodynamic Therapy: New Probes for Cancer Imaging and Treatment*. místo neznámé : ACS Publications, 2017.
32. **Hong E.J., Choi D.G., Shim M.S.** Targeted and effective photodynamic therapy for cancer using functionalized nanomaterials. *Acta Pharm. Sinica B.* 2016, Sv. 6, 4, stránky 297-307.
33. **Celli J.P., Spring B.Q., Rizvi I., Evans C.L., Samkoe K.S., Verma S., Pogue B.W., Hasan T.** Imaging and Photodynamic Therapy: Mechanisms, Monitoring and Optimization. *Chem. Rev.* 2010, 110, stránky 2795-2838.
34. **Musil Z., Zimcik P., Miletin M., Kopecky K., Link M., Petrik P., Schwarz J.** Synthesis and singlet oxygen production of azaphthalocyanines bearing functional derivatives of carboxylic acid. *J. Porphyrins Phthalocyanines*. 2006, Sv. 10, 2, stránky 122-131.

35. **Merck KGaA.** Merck (Sigma-Aldrich). *Molecular Beacons*. [Online] 2018. <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biology/molecular-beacons.html>.
36. **Prima Scientific.** Prima Scientific. *Dual-Labeled Probes*. [Online] 2016. <https://www.prima-sci.com/16826804/dual-labeled-probes>.
37. **Jewett J.C., Sletten E.M., Bertozzi C.R.** Rapid Cu-Free Click Chemistry with Readily Synthesized Biarylazacyclooctynones. *J. Am. Chem. Soc.* 2010, Sv. 132, 11, stránky 3688-3690.
38. **Jain K.P., Edaki D.U., Minhas H.S., Minhas G.S.** *Process for preparing extra pure 2,6-diisopropylphenol. EP 2 516 369 B1* 31. 10. 2012.
39. **Leuwer M., O'Neil P., Berry N., Pidathala Ch.** *Pharmacologically active compounds. WO2015/097475A1* University of Liverpool, 2015.
40. **Pramanik Ch., Kotharkar S., Patil P., et al.** Commercial Manufacturing of Propofol: Simplifying the Isolation Process and Control on Related Substances. *Org. Process Res. Dev.* 2014, Sv. 18, 152–156.
41. **Hausweiler A., Seydel R., Stroh R.** *Process for the production of 3, 5-disubstituted-4-hydroxy benzoic acids and their esters. DE1082273 (B)* 25. 05. 1960.
42. **Sabot C., Kumar K.A., Meunier S., Mioskowski C.** A convenient aminolysis of esters catalyzed by 1,5,7-triazabicyclo[4.4.0]dec-5-ene (TBD) under solvent free conditions. *Tetrahedron Lett.* 2007, Sv. 48, 22, stránky 3863-3866.
43. **de Bruynea S., Boosb T.L., Wyffelsa L., Goemanc J.L., Riceb K.C., de Vosa F.** Synthesis, radiosynthesis and in vivo evaluation of [I]-4-(2-(bis(4-fluorophenyl)methoxy)ethyl)-1-(4-iodobenzyl)piperidine as a selective tracer for imaging the dopamine transporter. *J. Labelled Comp. Radiopharm.* 28. May 2009, Sv. 52, 8, stránky 304–311.
44. **Montalbetti Ch.A.G.N., Falque V.** Amide bond formation and peptide coupling. *Tetrahedron.* 2005, Sv. 61, stránky 10827–10852.
45. **Wadhwa K., Yang C., West P.R., Deming K.C., Chemburkar S.R., Reddy R.E.** Synthesis of Arylglyoxylic Acids and Their Collision-Induced Dissociation. *Synthetic Communications.* 2008, Sv. 38, 24, stránky 4434-4444.
46. **Nakamura A., Ataka T., Segawa H., Takeuchi Y., Takematsu T.** Structure-activity Relationships of Herbicidal 5-Ethylamino- and 5-Propylamino-2, 3-Dicyanopyrazines. *Agric. Biol Chem.* 1983, Sv. 47, 7, stránky 1561-1567.

47. **Erdem S.S., Nesterova I.V., Soper S.A., Hammer R.P.** Solid-Phase Synthesis of Asymmetrically Substituted "AB3-Type" Phthalocyanines. *J. Org. Chem.* 2008, Sv. 73, stránky 5003–5007.

48. **Fan X., Li N., Shen T., Cui X.M., Lv H., Zhu H.B., Guan Y.H.** A mild CuI-catalyzed Glaser-type homo-coupling reaction using α,α -dibromo- β -dicarbonyl compounds as oxidants. *Tetrahedron.* 2014, Sv. 70, 2, stránky 256 – 261.

49. **Suman M., Ramalinga T., Srikanth R. a Kishor D., Addlagatta Ch., Kalivendi A., Raju S.V., China B.** Synthesis and structure–activity relationships of pyridinyl-1H-1,2,3-triazolyldihydroisoxazoles as potent inhibitors of tubulin polymerization. *European Journal of Medicinal Chemistry.* 2015, Sv. 90, stránky 603 - 619.