

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉM
KATEDRA FARMACEUTICKÉ CHEMIE A FARMACEUTICKÉ ANALÝZY



Syntéza a hodnotenie zhášačov fluorescencie
zo skupiny azaftalocyanínov

Diplomová práca

Michal Kántor



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

Konzultant: Mgr. Jiří Demuth

Hradec Králové 2020

„Prehlasujem, že táto práca je mojím pôvodným autorským dielom. Všetka literatúra a ďalšie zdroje, z ktorých som pri spracovaní čerpal, sú uvedené v zozname použitej literatúry a v práci sú správne citované. Práca nebola použitá k získaniu iného alebo rovnakého titulu.“

V Hradci Králové dňa.....

.....
Michal Kántor

V úvode by som veľmi rád poďakoval môjmu školiteľovi prof. Petrovi Zimčíkovi za odborné rady pri vypracovávaní tejto diplomovej práce. Ďalej patrí obrovská vďaka Mgr. Jiřímu Demuthovi, ktorý mi naozaj veľkou mierou pomáhal v laboratóriu pri syntézach. Rád by som sa ešte poďakoval doc. Radimovi Kučerovi, ktorého odborné znalosti mi napomohli pri čistení látok a celej AzaPc group za super atmosféru a pracovné podmienky v laboratóriu.

Za finančnú podporu by som chcel poďakovať:

Grantová agentura Univerzity Karlovy (GAUK: 1168217)
Specifický vysokoškolský výzkum (SVV 260 547)

Abstrakt

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra: Katedra farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy

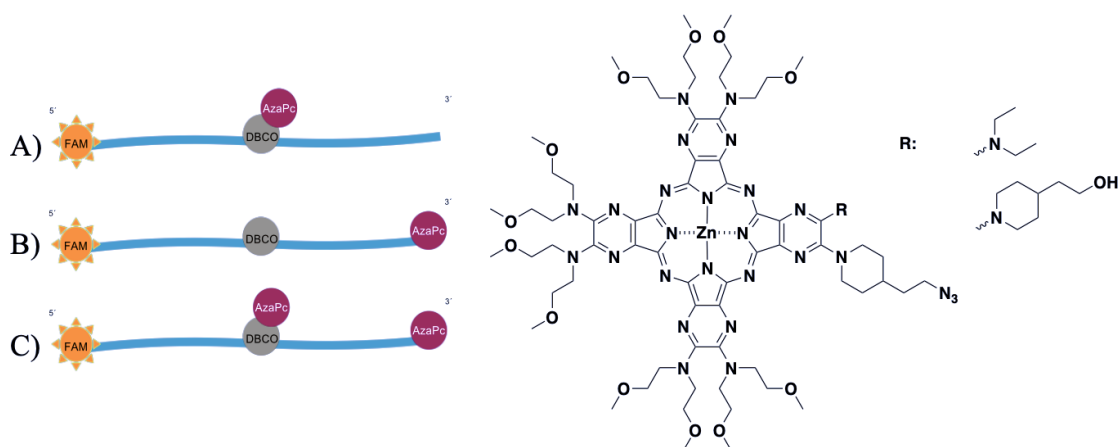
Kandidát: Michal Kántor

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

Konzultant: Mgr. Jiří Demuth

Názov práce: Syntéza a hodnotenie zhášačov fluorescence zo skupiny azaftalocyanínov

Nesymetrické dialkylamino substituované azaftalocyaníny (AzaPcs) majú unikátne fotofyzikálne vlastnosti – absorpciu svetla medzi 300 a 700nm, skoro nulovú vlastnú fluorescenciu a schopnosť zhášať fluorescenciu ďalších zlúčenín. Tieto vlastnosti robia z AzaPcs vhodných kandidátov na univerzálne „dark quenchers“, ktoré môžu byť využité v real time PCR. V tejto práci som sa zamerlal na hodnotenie rozdielov v zhášaní sond značených v rozdielnych pozíciách oligodeoxynukleotidového (ODN) reťazca. Boli pripravené dva zhášače z rôznymi substituentmi vhodnými k väzbe na rozdielne miesta ODN (viď Obr.). Nasledujúcu syntézu zhášačov, boli pripravené tri rôzne sondy – jedna so zhášačom v strede ODN (Obr. A), druhá so zhášačom na konci ODN (Obr. B), tretia so zhášačom v strede a na konci ODN (Obr. C). Všetky pripravené sondy boli čistené na systéme HPLC a následne bola zameraná a porovnaná efektívnosť zhášania týchto sond.



Abstract

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department: Department of Pharmaceutical Chemistry and Pharmaceutical Analysis

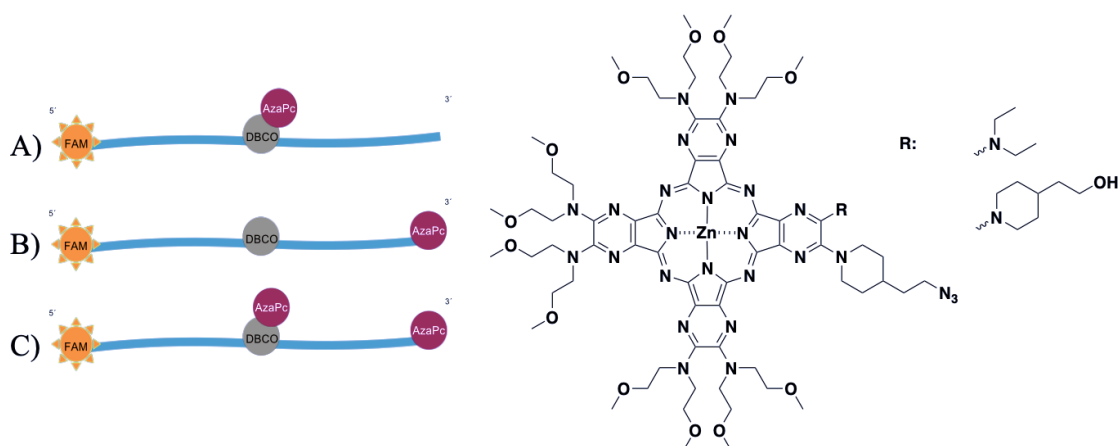
Candidate: Michal Kántor

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

Consultant: Mgr. Jiří Demuth

Title of thesis: Synthesis and study of azaphthalocyanine quenchers of fluorescence

Unsymmetrical dialkylamino substituted azaphthalocyanines (AzaPcs) have unique photophysical properties – light absorption between 300 and 700 nm, almost no self-fluorescence and ability to quench fluorescence of other compounds. This makes AzaPcs suitable candidates for universal dark quenchers which can be used in real time PCR. In this work, we tried to evaluate differences in quenching between probes labeled in different positions of oligodeoxynucleotide (ODN) chain. Two quenchers bearing different functional groups suitable for different connection to ODN were synthesized (see Fig.). Following the synthesis of the quencher, three different probes were prepared– the first with the quencher in the middle of ODN chain (Fig. A), the second with the quencher attached at the end of ODN chain (Fig. B), and the third with the quencher in the middle and at the end of ODN chain (Fig. C). All prepared ODN probes were purified on HPLC system. Subsequently, the quenching efficiency of these ODN probes was compared.



Obsah

1. Zoznam skratiek	11
2. Cieľ práce	12
3. Teoretická časť	13
3.1. Vlastnosti AzaPcs	13
3.1.1 Fotofyzikálne vlastnosti	14
3.2. Syntéza AzaPcs	15
3.3. Využitie Pcs a AzaPcs	17
3.3.1 Priemysel	17
3.3.2 Fotodynamická terapia	18
3.3.3 Senzory	19
3.3.4. Zhášače fluorescencie	20
3.4. Fluorescenčné sondy	23
3.4.1 Triple-labeled sondy	23
3.4.2 Typy oligodeoxynukleotidových sond	24
3.4.3 Princípy zhášania	28
4. Experimentálna časť	30
4.1 Syntéza 5-chlór-6-[4-(2-hydroxyetyl)piperidín-1-yl]pyrazín-2,3-dikarbonitrilu (3)	30
4.2 Syntéza 2-[1-(3-chlór-5,6-dikyanopyrazín-2-yl)piperidín-4-yl]etyl acetátu (4) ...	31
4.3 Syntéza 2-(1-{5,6-dikyano-3-[4-(2-hydroxyetyl)piperidín-1-yl]pyrazín-2-yl}piperidín-4-yl)etyl acetátu (5)	32
4.4 Syntéza 2-(1-{3-[4-(2-azidoetyl)piperidín-1-yl]-5,6-dikyanopyrazín-2-yl}piperidín-4-yl)etyl acetátu (6)	32
4.5 Syntéza 2-[4-(2-azidoetyl)piperidín-1-yl]-3-[4-(2-hydroxyetyl)-piperidín-1-yl]-9,10,16,17,23,24-hexakis[bis(2-metoxyetyl)amino]-1,4,8,11,15,18,22,25-oktaazaftalocyanínu (8)	33

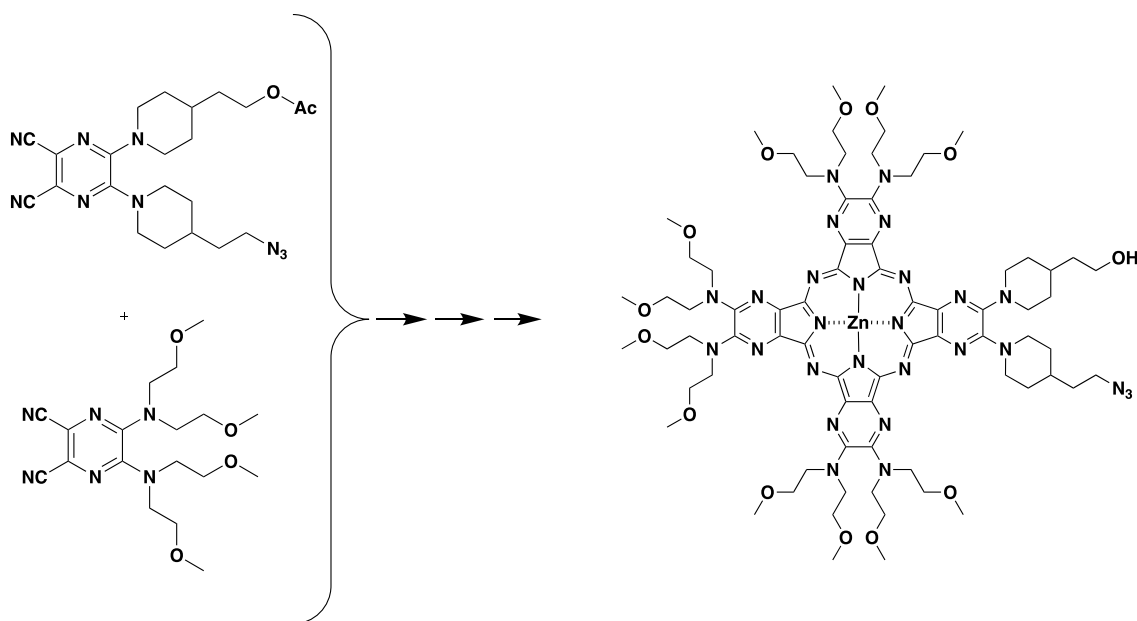
4.6 Syntéza 2-[4-(2-azidoetyl)piperidín-1-yl]-3-[4-(2-dimetoxytrityloxyetyl)-piperidín-1-yl]-9,10,16,17,23,24-hexakis[bis(2-metoxyetyl)amino]-1,4,8,11,15,18,22,25-oktaazaftalocyanínu (9)	34
4.7 Syntéza zinočnatého 2-[4-(2-azidoetyl)piperidín-1-yl]-3-[4-(2-dimetoxytrityloxyetyl)-piperidín-1-yl]-9,10,16,17,23,24-hexakis[bis(2-metoxyetyl)amino]-1,4,8,11,15,18,22,25-oktaazaftalocyanínu (10)	35
4.8 Syntéza 2-[4-(2-azidoetyl)piperidín-1-yl]-3-[4-(2-hydroxyetyl)-piperidín-1-yl]-9,10,16,17,23,24-hexakis[bis(2-metoxyetyl)amino]-1,4,8,11,15,18,22,25-oktaazaftalocyanínu zinočnatého (11)	36
4.9 Modifikácia pevnej fázy pomocou AzaPcs a syntéza ODN	37
4.10 Značenie ODN sond AzaPcs.....	39
4.11 Čistenie sond v systéme HPLC.....	41
4.12 Hodnotenie sond	43
5. Diskusia a výsledky	44
5.1 Syntéza AzaPc	44
5.2 Syntéza ODN značených AzaPc a HPLC čistenie.....	47
5.3 Stanovenie účinnosti zhášania	50
6. Záver	53
7. Použitá literatúra	54

1. Zoznam skratiek

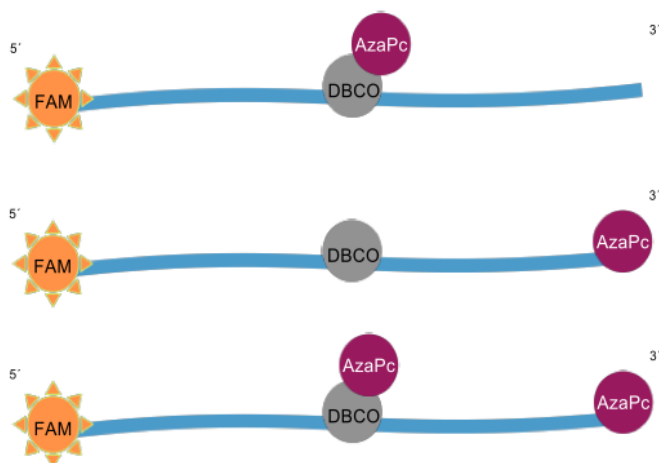
AcCl.....	Acetylchlorid
AzaPc.....	Azaftalocyanín (z angl. Azaphthalocyanine)
BBQ.....	Black Berry [®] Quencher 650
BHQ.....	Black Hole Quencher [®] 650
BuOH.....	Butanol
CPG.....	Pevná fáza (z angl. Controlled pore glass)
DBCO.....	Dibenzoazacyklooktín
DCM.....	Dichlórmetán
DMF.....	Dimetylformamid
DMTrCl.....	4,4'-Dimetoxytrityl chlorid
FAM.....	6-Karboxyfluoresceín
FRET.....	Försterov rezonančný prenos energie (z angl. Förster resonance energy transfer)
IBFQ.....	Iowa Black FQ quencher
ICT.....	Intramolekulárny prenos náboja (z angl. Intramolecular charge transfer)
MeOH.....	Metanol
NaAcO.....	Octan sodný
ODN.....	Oligodeoxynukleotid
Pc.....	Ftalocyanín (z angl. Phthalocyanine)
PCR.....	Polymerázová reťazová reakcia (z angl. Polymerase chain reaction...)
qPCR.....	Kvantitatívna polymerázová reťazová reakcia (z angl. Quantitative polymerase chain reaction)
ROS.....	Reaktívne formy kyslíku (z angl. Reactive oxygen species)
TEA.....	Trietylamin
THF.....	Tetrahydrofurán
TLC.....	Tenkovrstvá chromatografia (z angl. Thin layer chromatography)
Zn(AcO) ₂	Octan zinočnatý

2. Cieľ práce

Cieľom mojej práce bolo pripraviť dialkylamino substituovaný azaftalocyanín (AzaPc) s hydroxylovou skupinou určenou pre syntézu oligodeoxynukleotidového (ODN) reťazca a s azidovou skupinou určenou pre väzbu na pevnú fázu (CPG) (viď Obr.1). S použitím tohto AzaPc boli pripravené trojito a dvojito značené sondy (Obr. 2). Následne u takto pripravených sond bola zmeraná efektivita zhášania a porovnaná s ostatnými sondami za účelom zistenia či sonda značená trojito je výhodnejšia. Rovnaké merania boli prevedené aj so sondami značenými s Black Berry[®] Quencher 650 (BBQ), pre porovnanie rozdielov s komerčnými zhášačmi.



Obr. 1 Schéma syntézy dialkylamino substituovaného AzaPc s hydroxylovou skupinou.

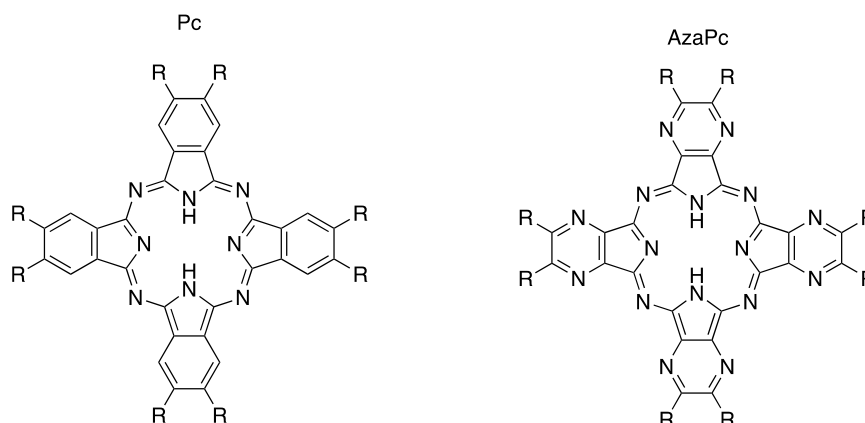


Obr. 2 Pripravené AzaPc sondy, FAM – fluoresceín, DBCO – dibenzoazacykloktín.

3. Teoretická časť

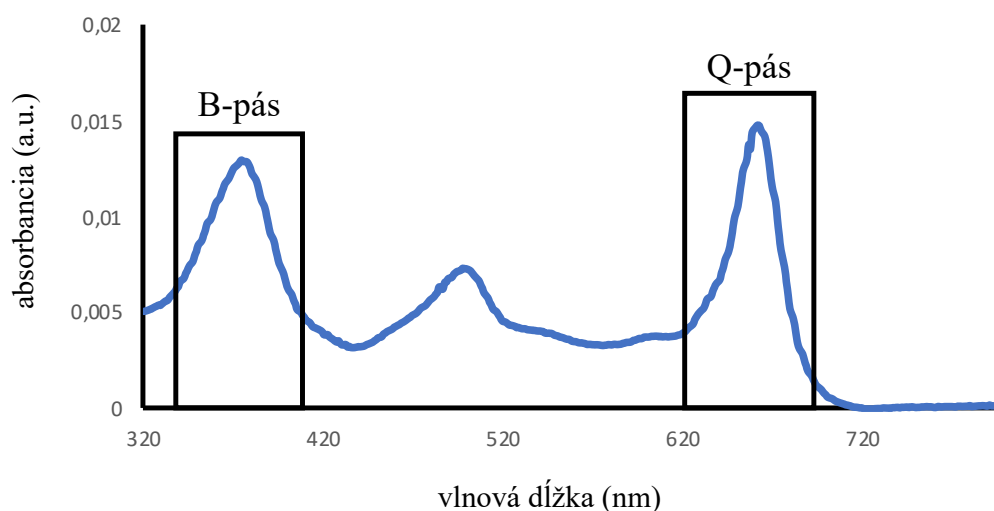
3.1. Vlastnosti AzaPcs

AzaPcs je súhrnné označenie pre dusíkaté analógy syntetických farbív ftalocyanínov (Pcs) (Obr. 3).



Obr. 3 Schéma obcej štruktúry Pc a AzaPc.

AzaPcs sú látky odvodené od Pcs izosternou zámennou methinových skupín benzénových jadier Pcs za atómy dusíku. AzaPcs sú podobne ako Pcs planárne makrocyclické molekuly s rozsiahlym systémom konjugovaných väzieb, ktorý im dodáva modré, zelené či fialové zafarbenie závislé na ich absorpčnom spektre. Absorpčné spektrum má dva charakteristické absorpčné pásy – vysokoenergetický B-pás v oblasti 350-370 nm a nízkoenergetický Q-pás v oblasti 620-680 nm (Obr. 4).



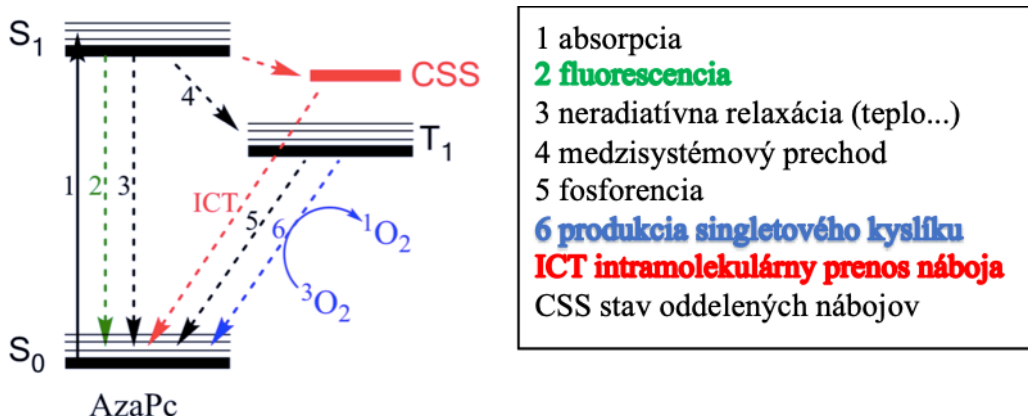
Obr. 4 Znáznornenie AzaPc spektra s vyznačenými charakteristickými absorpčnými pásmi.

Z hlavného absorpčného pásu (Q-pás) sa dá vyčítať rada vlastností, stavov a supramolekulárnych interakcií ako acidobázické vlastnosti, informácie o vzniku tzv. protón-transfer komplexu prípadne zoskupovaní do agregátov a napríklad aj typ týchto agregátov. Polohu Q-pásu ovplyvňuje typ makrocyklu, periférna substitúcia (poloha, typ substituentu), centrálny kation kovu (jeho veľkosť, koordinácia, oxidačný stav) a použité rozpúšťadlo. Kovové komplexy AzaPcs majú jeden ostrý Q-pás, pri bezkovových komplexoch AzaPcs a u nesymetricky substituovaných AzaPcs dochádza k rozštiepeniu Q-pásu kvôli strate symetrie molekuly. Ďalej tieto molekuly kvôli planárnej štruktúre makrocyclického jadra majú tendenciu tvoriť diméry a vyššie agregáty pomocou π - π interakcií. Väčšinou je agregácia nežiadúca a vedie k strate fotofyzikálnych vlastností. Agregácia sa prejavuje na absorpčných pásoch poklesom intenzity Q-pásu a vznikom nových pásov posunutých ku kratším (H-diméry) alebo dlhším (J-diméry) vlnovým dĺžkam. Vplyv periférneho substituentu na polohu Q-pásu určuje atóm substituentu viazaný priamo na makrocyklus a čiastočnú rolu hrá aj zapojenie substituentu do konjugácie väzieb makrocyklu. Z experimentálnych výsledkov vyplýva, že Q-pás sa posúva bathochromne v poradí substituentov: alkyloxy < aryloxy < alkyl ~ H ~ alkylsulfanyl < arylsulfanyl < alkylamino.¹

3.1.1 Fotofyzikálne vlastnosti

Po absorpcii energie svetelného žiarenia sa AzaPcs dostávajú do excitovaného stavu, z ktorého môžu prejsť opäť do základného stavu rôznymi mechanizmami, ktoré sú znázornené v modifikovanom Jablonského diagrame (Obr. 5). Po absorpcii svetelnej energie sa AzaPc dostáva zo svojho základného stavu S_0 do excitovaného stavu S_1 . Najčastejším spôsobom návratu do základného stavu je emisia fotónu (fluorescencia) alebo neradiatívna relaxácia (teplo...). Ďalšie možné cesty relaxácie sú spájané z inverziou spinu (medzisystémový prechod), ktorý vedie k prvému tripletovému stavu T_1 . Emisia fotónu z T_1 sa nazýva fosforescencia a má dlhšiu životnosť a nižšiu energiu v porovnaní s fluorescenciou. Energia tripletového stavu T_1 môže byť prenesená aj na molekulu v základnom tripletovom stave akou je napr. molekula kyslíku (3O_2). Tento proces vedie ku vzniku vysoko reaktívneho singletového kyslíku (1O_2). Tieto procesy sa dajú kvantifikovať pomocou kvantového výťažku fluorescencie (Φ_F), poprípade kvantového výťažku produkcie singletového kyslíku (Φ_Δ). Je to podiel emitovaných fotónov (popr. vzniknutých molekúl 1O_2) k počtu absorbovaných fotónov.

Alkylamino deriváty AzaPcs sú schopné relaxovať pomocou stavu oddelených nábojov (CSS) s následným rýchlym prechodom do základného stavu. Celý tento proces sa nazýva intramolekulárny prenos náboja (ICT), ktorý svojou rýchlosťou (rádovo v ps) výrazne prevažuje nad ostatnými dejmi.^{1,2}

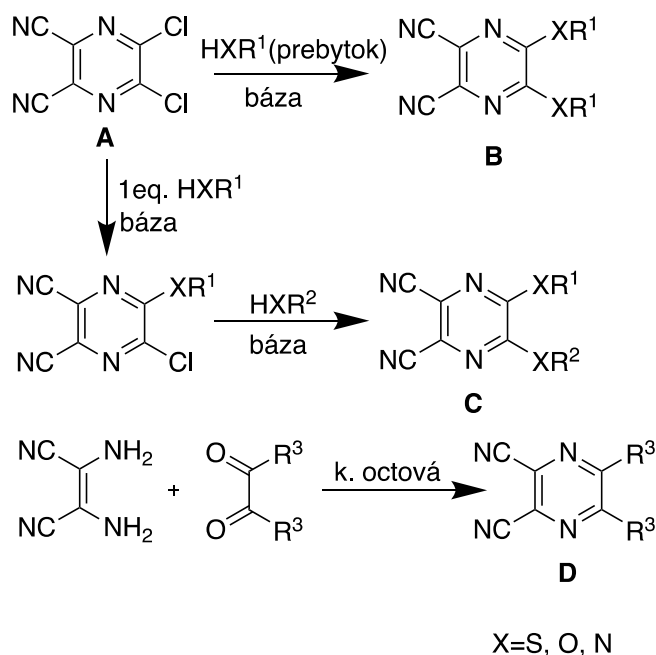


Obr. 5 Jablonského diagram.

Ako už bolo spomenuté k ICT dochádza u alkylamino substituovaných AzaPcs, kde dusík slúži ako donor elektrónového páru a elektróndeficientné makrocyklické jadro ako akceptor. Medzi faktory ovplyvňujúce účinnosť ICT patrí počet donorových dusíkov na periférii, vplyv linkeru medzi donormom a akceptorom, typ makrocyklického jadra, vplyv substituentov makrocyklu na jeho vlastnosti akceptoru. Účinnosť ICT sa určuje pomocou súčtu $\Phi_{\Delta} + \Phi_F$, ktorý sa vplyvom ICT ako kompetitívneho deju znižuje. Z experimentálnych výsledkov vyplýva, že AzaPcs s jedným dusíkovým donormom majú hodnotu kvantových výťažkov Φ_{Δ} a Φ_F vplyvom ICT veľmi nízku. Zavedením ďalších dusíkových donorov je táto hodnota prakticky nulová. AzaPcs s viac ako štyrmi dusíkovými donormi majú ICT natoľko silné, že sa nedá vonkajšími vplyvmi ovplyvniť. Takéto deriváty majú hodnotu Φ_{Δ} a Φ_F rovnú takmer nule a využívajú sa ako zhášače fluorescencie.¹

3.2. Syntéza AzaPcs

Príprava AzaPcs je vždy niekoľko kroková. Najskôr je potrebné pripraviť vhodný prekurzor – najčastejšie 5,6-disubstituovaný pyrazín-2,3-dikarbonitril (Obr. 6), v ktorom substituenty v polohách 5 a 6 neskôr tvoria periférne substituenty makrocyklu a nitrilové skupiny saúčastnia tvorby centrálného pyrrolového jadra a azometínových mostíkov medzi jednotlivými štvrtinami makrocyklu.

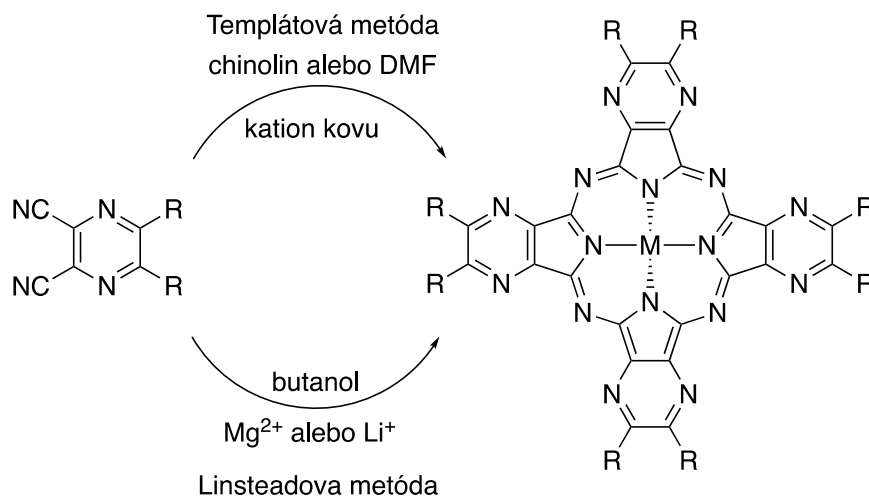


Obr.6 Možnosti syntézy 5,6-disubstituovaného pyrazín-2,3-dikarbonitrilu.

Obecne sa dá pri syntéze týchto prekursorov vychádzať z dvoch typov reakcií. Ak majú byť požadované periférne substituenty viazané cez heteroatóm, využíva sa nukleofilná substitúcia 5,6-dichlópyrazín-2,3-dikarbonitrilu (**A**) v prebytku nukleofilného činidla za vzniku látky s rovnakými substituentmi v polohách 5 a 6 (**B**). V prípade reakcie s jedným ekvivalentom nukleofilného činidla, často aj za chladenia získavame monosubstituované deriváty. Následnou reakciou s ďalším nukleofilom získame precursor s dvoma rôznymi periférnymi substituentmi (**C**). Ak sú alkyly alebo aryly viazané priamo na skelet C-C väzbou (**D**), vzniká pyrazínové jadro kondenzáciou diaminomaleonitrilu s príslušným diketónom alebo α -ketokyselinou v kyslom prostredí. Substituovaný diketón sa získava napr. benzoínovou kondenzáciou s následnou oxidáciou alebo reakciou oxalylchloridu s Grignardovými činidlami.³

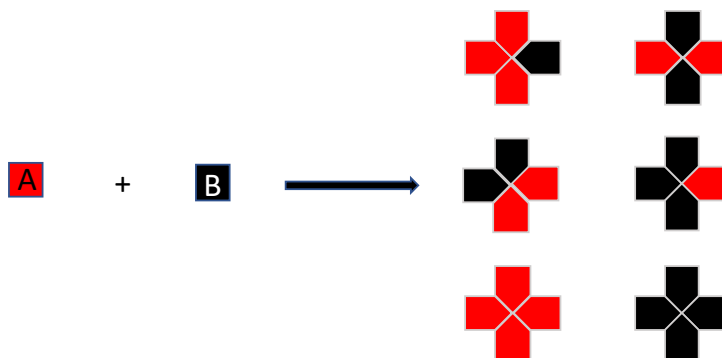
Vzniku vlastného makrocyklu sa dá docieľiť cyklotetramerizáciou a to dvoma spôsobmi. V prvom prípade sa využíva tzv. templátového efektu kationu kovu (Obr. 7), ktorý následne už ostáva centrálné chelatovaný. Presný mechanizmus tohto spôsobu nie je známy, ale predpokladá sa, že dôjde k zoskupeniu prekursorov okolo kationu kovu, teda k ich priblíženiu na krátku vzdialenosť a následným zahriatím na vysokú teplotu k vytvoreniu AzaPc jadra. Druhá metóda podľa Linsteadá využíva ataku alifatického alkoholátu na elektrondeficitný uhlík nitrilovej skupiny (Obr. 7). Najskôr dôjde k vytvoreniu alkylkarboximidátu, ktorý ďalej atakuje ďalšie kyanoskupiny, až dokým nedôjde k cyklotetramerizácii. AzaPc jadro je v tomto prípade stavané postupne.

Metóda podľa Linstead má obecnú vyššiu výťažnosť, ale je nepoužiteľná pre alkyloxy a aryloxy deriváty u ktorých by boli elektrondeficitné uhlíkové atómy v polohách 5 a 6 napádané alkoholátom a zamenené za alkoxy skupinu alkoholátu. V prípade, že do reakcie vstupuje len jeden prekursor vzniká symetrický produkt.^{1, 3}



Obr. 7 Možnosti cyclotramerizácie.

Pri štúdiu vplyvu štruktúry na fotofyzikálne alebo fotochemické vlastnosti, prípadne pre určité praktické aplikácie je nutné pripraviť nesymetrický AzaPc. V tomto prípade do cyclotramerizačnej reakcie vstupujú dva prekursori A a B, tým pádom vzniká štatistickou kondenzáciou 6 rôznych kongenerov (Obr. 8) a požadovaný kongener musí byť separovaný chromatograficky.³



Obr. 8 Štatistická kondenzácia.

3.3 Využitie Pcs a AzaPcs

3.3.1 Priemysel

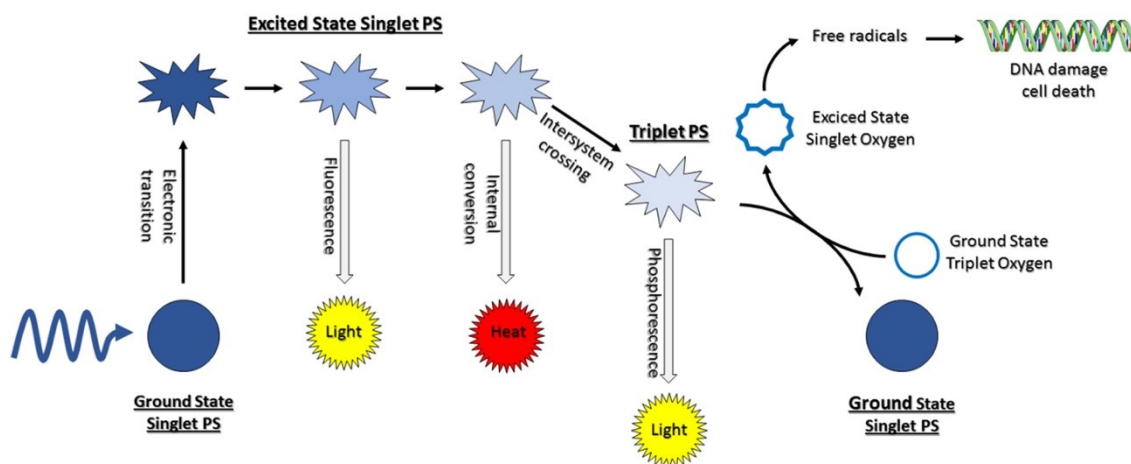
Pcs boli prvý krát pripravené v roku 1928 v spoločnosti Scottish Dyes Ltd., keď pri príprave ftalimidu z anhydridu kyseliny ftalovej došlo k prasknutiu skla reakčnej banky a k expozícií jej smaltovaného povrchu do reakcie – výsledkom bol vznik modro-

zeleného materiálu. V nadväznosti na tieto udalosti boli pripravené deriváty s ďalšími kovmi a kombináciou elementárnej analýzy, ebulioskopie a oxidatívnej degradácie bola určená štruktúra Pcs, ktorá bola neskôr potvrdená röntgenovou difrakciou. Potenciál Pcs ako farbív bol jednoznačný a preto v roku 1935 vstúpil na trh med'natý Pc pod názvom Monastral Blue. Ďalšie modifikácie upravovali farbu Pcs a zlepšovali ich rozpustnosť vo vode.⁴

V súčasnosti sa používajú ako farbivá v náteroch, plastoch, textile, toneroch, na farbenie papiera, kože, vlny. Mimo farbiarskeho priemyslu našli uplatnenie v optických, elektronických a fotoelektronických zariadeniach, akými sú CD-čká, tekuté kryštály (LCD displeje), fotokonduktory v laserových tlačiarňach, či vo fotovoltaických článkoch.⁵

3.3.2 Fotodynamická terapia

Fotodynamická terapia (PDT) je moderná neinvazívna terapia aplikovateľná ako aj v protinádorovej liečbe tak aj pri neonkologických ochoreniach – v oblastiach dermatológie, gynekológie a urológie. Je založená na aplikácii (systémovej alebo lokálnej) fotosenzitívnej látky – fotosenzitizéru, ktorý je následne akumulovaný v cieľovom tkanive. Fotosenzitizér absorbuje svetlo o určitej vlnovej dĺžke, čo spúšťa procesy vedúce k deštrukcii cieľového tkaniva. Samotný mechanizmus PDT vyžaduje tri komponenty: fotosenzitizér, svetlo s vhodnou vlnovou dĺžkou a kyslík prítomný v bunke (Obr. 9).



Obr. 9 Schematické znázornenie mechanizmu PDT, fotosenzitizér PS je po vstupe do bunky ožiarený svetlom o vhodnej vlnovej dĺžke a prechádza cez excitovaný stav S_1 do excitovaného stavu T_1 . Prevzaté zo zdroja.⁶

Sú dva mechanizmy fotodynamickej reakcie, ale obe sú úzko závislé na prítomnosti molekuly kyslíku v bunke. Prvý krok je v oboch mechanizmoch podobný.

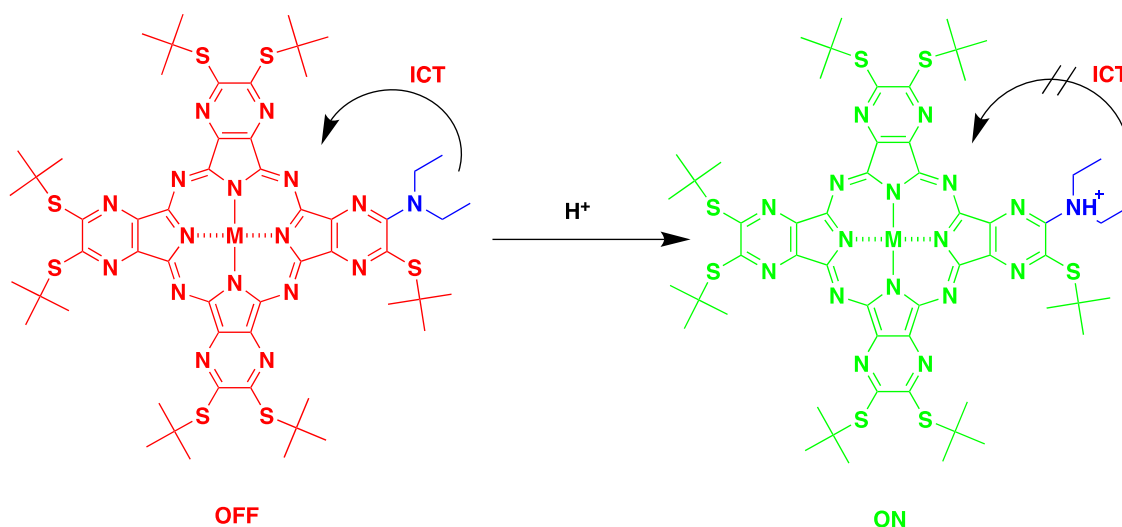
Po vstupe do bunky je fotosenzitizér ožiarený svetlom s vlnovou dĺžkou, ktorá sa zhoduje s absorpčným spektrom fotosenzitizéru, ktorý kvôli absorpcii fotónu prechádza zo základného stavu S_0 do excitovaného stavu S_1 (Obr. 5). Časť energie je vyžiarená vo forme fluorescencie a zvyšná energia dostáva fotosenzitizér do excitovaného tripletového stavu T_1 – do svojej terapeutickkej formy. Prvý mechanizmus PDT je založený na T_1 stave, v ktorom fotosenzitizér prenáša energiu na biomolekuly vo svojom okolí. Toto vedie ku vzniku reaktívnych foriem kyslíku (ROS) – najskôr vzniká superoxidový aniónový radikál, ktorý ďalej spúšťa kaskádu a vznik ďalších ROS. Následne nahromadený oxidatívny stres vedie k deštrukcii bunky. V druhom mechanizme PDT je energia tripletového stavu T_1 prenesená priamo na molekulu kyslíku 3O_2 v základnom tripletovom stave. Týmto procesom vzniká singletový kyslík 1O_2 – molekula so silnými oxidačnými vlastnosťami. Čo sa týka selektivity PDT tak akumulácia fotosenzitizéru je signifikantne vyššia v rakovinových bunkách. Dôvodom môže byť tendencia fotosenzitizéru sa viazať na LDL častice, ktoré cholesterolom potrebným pre tvorbu membrán zásobujú rýchlo deliace sa bunky akými sú bunky nádorové. Ako fotosenzitizéry je výhodné použiť Pcs/AzaPcs, ktoré majú vyšší kvantový výťažok singletového kyslíku a lepší prienik do hlbších tkanív vďaka absorpčnému maximu v rozmedzí vlnových dĺžok 650-800 nm. Hlavnou nevýhodou je zlá rozpustnosť vo vode, ktorá znemožňuje ich intravenózne podanie.⁶ Ďalšou nevýhodou je vysoká miera agregácie z dôvodu rozsiahleho planárneho makrocyclického systému. Riešením týchto problémov môže byť zavedenie nosičových systémov, napr. inkorporovanie Pcs/AzaPcs do lipidovej dvojvrstvy alebo zavedenie kvartérnej amóniovej soli na perifériu.

3.3.3 Senzory

Proces ICT, ktorý už bol popisovaný vyššie, sa dá výhodne využiť pri návrhu fluorescenčných senzorov. Aby ICT mohlo prebiehať musí byť k dispozícii voľný elektrónový pár dusíku ako donoru na periférii makrocyccku. Po zablokovaní ICT sa objavia fotofyzikálne a fotochemické vlastnosti porovnateľné s hodnotami Φ_Δ a Φ_F analógu AzaPc bez donoru elektrónového páru.³ Na tomto princípe boli zatiaľ publikované senzory pre dva typy analytov:

a) *pH* senzitivne fluorescenčné senzory:

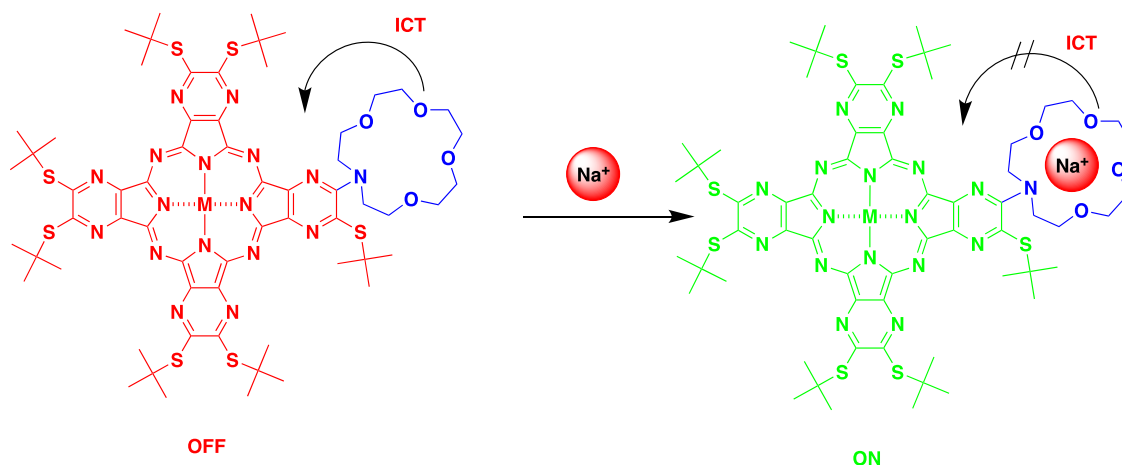
Prepínanie medzi OFF/ON stavom *pH* senzitivneho fluorescenčného senzoru je založené na princípe blokovania ICT väzbou vodíku na dusíkový atóm (donor elektrónového páru) na periférii makrocyklu v kyslom prostredí (Obr. 10).⁷



Obr. 10 Schematicky znázornený princíp *pH* senzitivnych fluorescenčných senzorov, prepínanie medzi ON/OFF stavom záleží na dostupnosti voľného elektrónového páru v rozpoznávacej časti (znázornená modro).

b) *Fluorescenčné senzory citlivé ku katiónom kovov*

V tomto prípade dochádza k blokovaniu ICT koordinátnou väzbou katiónu kovu na rozpoznávaciu časť senzoru (Obr. 11).⁸

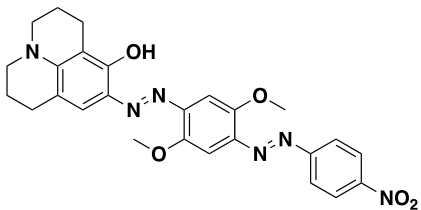
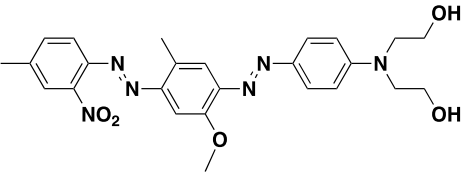
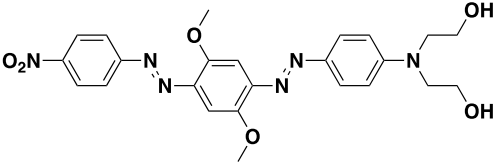
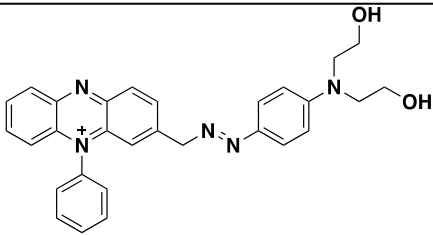
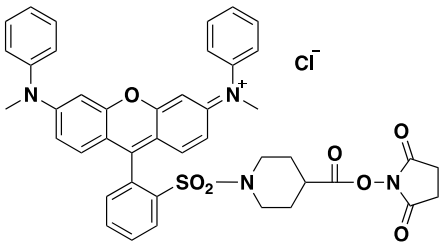


Obr. 11 Schematicky znázornený princíp fluorescenčných senzorov citlivých ku katiónom kovov. OFF/ON stav je závislý na prítomnosti voľného elektrónového páru v rozpoznávacej časti (znázornená modro) pre ICT.

3.3.4. Zhášače fluorescencie

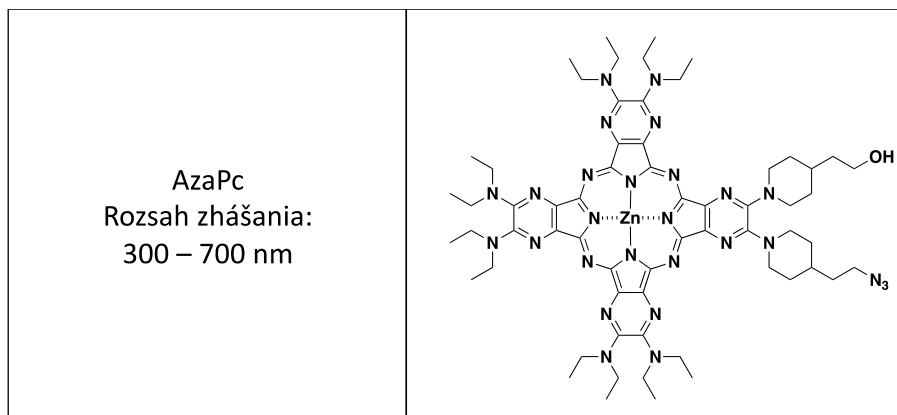
Zhášanie fluorescencie fluorescenčnej sondy je základným princípom využívaným v biochémií, analytickej chémii, biológii a v genetike. Využitie je pri

monitorovaní enzymatického štiepenia peptidov a oligonukleotidových sond, pri polymerázovej reťazovej reakcii (PCR), pri detekcii špecifických cieľov a na pozorovanie zmien vo vnútrobunečnom prostredí. Typická sonda sa skladá z dvoch farbív – fluorofóru a zhášača. V oblasti zhášačov majú veľmi výhodné vlastnosti tzv. „dark quenchers“, ktoré nemajú vlastnú fluorescenciu, ktorou by mohli rušiť signál pri meraniach. Zhášače tejto skupiny, ktoré boli pripravené a zavedené do praxe napr. Black Hole Quencher® (BHQ), QSY™ a Black Berry® Quencher 650 (BBQ) (Obr. 12) majú úzke absorpčné pásy preto sú schopné zhášať len určitý počet fluorofórov.⁹

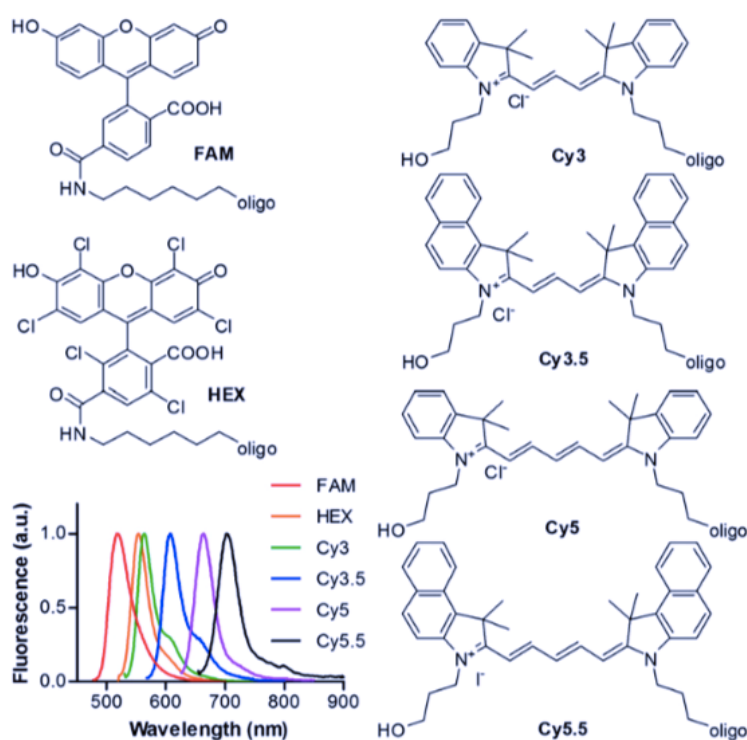
<p>BBQ-650 Rozsah zhášania: 550 – 750 nm</p>	
<p>BHQ-1 Rozsah zhášania: 480 – 580 nm</p>	
<p>BHQ-2 Rozsah zhášania: 540 – 670 nm</p>	
<p>BHQ-3 Rozsah zhášania: 670 – 730 nm</p>	
<p>QSY-7 Rozsah zhášania: 500 – 600 nm</p>	

Obr. 12 Vybrané komerčne dostupné zhášače a rozsah ich zhášania. Prevzaté a upravené zo zdrojov.^{10, 11, 12, 13, 14}

Žiadúce vlastnosti akými sú vysoká efektívnosť zhasávania a pokrytie širokého absorpčného spektra boli nájdené u vhodne substituovaných AzaPcs (Obr. 13), ktoré sú schopné zhasať väčšinu komerčne dostupných fluorofórov (Obr. 14) pre hybridizačné testy.¹⁵



Obr. 13 Vybraný dialkylamino substituovaný AzaPc a jeho rozsah zhasávania. Prevzaté a upravené zo zdroja.⁹



Obr. 14 Vybrané fluorofóry a ich emisné spektrá, fluoresceín (FAM), hexachloro-fluoresceín (HEX) a cyanínové farbivá (Cy3, Cy3.5, Cy5, Cy5.5). Prevzaté zo zdroja.¹⁶

Vhodný AzaPc zhasač musí mať periférne substituenty viazané k makrocyklu cez dusík s voľným elektrónovým párom, aby bol umožnený ICT. AzaPc musí obsahovať tiež hydroxylovú skupinu, aby bola možná štandardná fosforamiditová syntéza ODN a ďalšiu skupinu vhodnú na naviazanie na pevnú fázu. Vhodnou skupinou

je azidová skupina, ktorá umožňuje priebeh med'ou katalyzovanej azid/alkýn 1,3-dipolárnej cykloadície (tzv. „click“ chémia).¹⁶

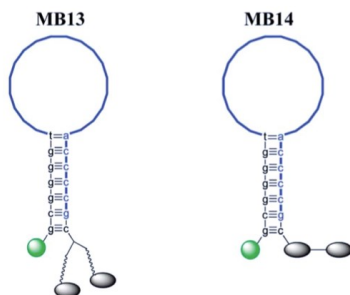
3.4 Fluorescenčné sondy

Detekcia nukleových kyselín a proteínov je základom pre štúdium ich funkcií a pre molekulárnu diagnostiku. Tieto molekuly a štruktúry sú zodpovedné za väčšinu biologických funkcií ako je uchovávanie a transfer genetickej informácie, regulácia biochemických procesov, katalýza reakcií či transport malých molekúl.¹⁷ Na zistenie, či stanovenie týchto štruktúr v komplexnom systéme je potrebná vysoká miera špecifity a senzitivity. Na ich dosiahnutie je potrebná predovšetkým sonda, ktorá rozozná cieľ a prenášač signálu. Pre biomolekuly ako proteíny alebo nukleové kyseliny je rozoznanie cieľa zabezpečené afinitou ligandu. Ako ligandy môžu slúžiť nukleové kyseliny (DNA alebo RNA), ktorých afinita je zabezpečená pomocou komplementarity reťazca k cieľu, kde už len jedna nezhoda medzi bázami reťazcov počas komplementárneho párovania báz je pre hybridizáciu energeticky nevýhodná.¹⁸ Protilátky sú používané na rozoznávanie proteínov. Ich väzba na antigén je sprostredkovaná vodíkovými mostíkmi, van der Waalsovými interakciami, hydrofóbnymi interakciami a priestorovými interakciami vo väzobnom mieste protilátky.¹⁹ Ďalším ligandom využívaným na rozpoznanie proteínov sú aptaméry. Aptamér je jednoreťazové vlákno DNA alebo RNA s vysokou afinitou k cieľu. Výhodou aptamérov je tepelná stabilita, dlhšia životnosť a ich ľahká modifikácia.¹⁸ Aptaméry s dostatočnou špecifitou a selektivitou sa nachádzajú v energeticky výhodnejšej sekundárnej štruktúre, čo sa však mení po naviazaní na svoj cieľ. Táto konformačná zmena je využívaná napr. pre sondy typu molecular beacons.²⁰ Ako prenášač signálu sa používajú predovšetkým fluorescenčné farbivá, ktoré sa rôzne kombinujú so zhášačmi (viď kapitola 3.4.2). Identifikácia cieľa väčšinou vedie k zväčšeniu vzdialenosti medzi flurofórom a zhášačom a k objaveniu sa fluorescenčného signálu.

3.4.1 Triple-labeled sondy

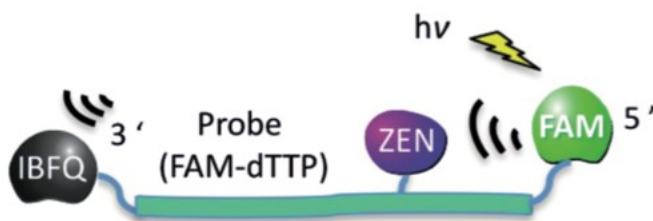
Okrem mono- a double-labeled sond boli už pripravené aj sondy značené trojito. Môže ísť o sondu s dvoma fluorofórmami a jedným zhášačom alebo opačne o sondu s jedným fluorofórom a dvoma zhášačmi.²¹ Znázornené modifikácie s dvoma BHQ-1 ako zhášačmi a s FAM ako fluorofórom (Obr. 15) zvýšili T_m o 4-5°C, výrazne znížili

fluorescenčný šum, a zvýšili pomer signál/šum fluorescence pri kvantitatívnej PCR (qPCR).²²



Obr. 15 Triple-labeled sondy typu molecular beacons (MBs), FAM znázornený zelenou farbou, BHQ-1 znázornený čiernou farbou. Prevzaté zo zdroja.²²

Ďalšia triple-labeled sonda bola pripravená za použitia FAM a zhášača Iowa Black® Dark Quencher (IBFQ) na 5'-konci a ZENTM ako interného zhášača (Obr. 16). Takéto usporiadanie bolo zvolené za účelom maximalizácie FRET zhášania. Okrem toho blízke usporiadanie (vzdialenosť 9 báz) FAM a ZENTM zvyšuje účinnosť FRET mechanizmu. Sondy tohto typu boli použité na kvantifikáciu deoxyribonukleotid trifosfátov (dNTPs) bunky a výsledky boli porovnané s validovaným LC-MS/MS prístupom s výslednou presnosťou 100±15% pre všetky dNTPs.²³



Obr. 16 Schéma pripravenej sondy. Prevzaté zo zdroja.²³

3.4.2 Typy oligodeoxynukleotidových sond

ODN sondy, ktoré vo svojom princípe využívajú zhášanie fluorescence možno rozdeliť na dva typy:

1. obsahujúce fluorofór a zhášač na samostatných nukleotidových reťazcoch – mono-labeled probes
2. obsahujúce fluorofór aj zhášač na rovnakom nukleotidovom reťazci – double-labeled probes

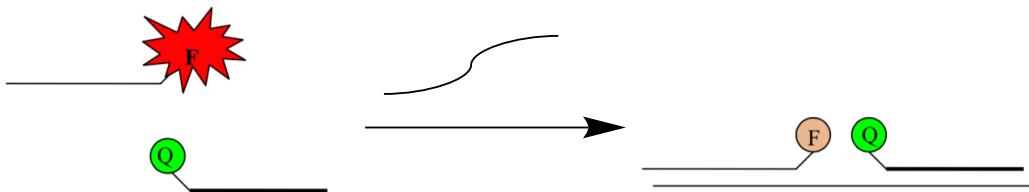
Podľa usporiadania experimentu môžeme rozdeliť sondy do skupín:

1. „adjacent probes“
2. „competitive hybridization probes“
3. „dual-labeled probes“

4. „molecular beacons“
5. „scorpion primers“
6. „light-up probes“

Ad 1) „adjacent probes“

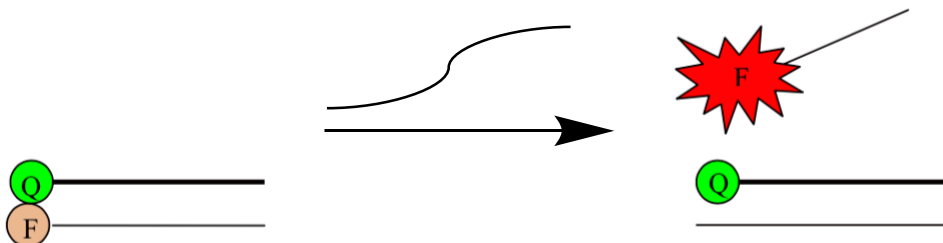
Najstaršia metóda využívajúca dve komplementárne reťazce, z ktorých jeden nesie fluorofór a druhý zhášač. Sekvencie reťazcov sú navrhnuté tak, aby po hybridizácii bola vzdialenosť medzi reťazcami minimálna a dochádzalo tak k najefektívnejšiemu prenosu energie – teda čo k najefektívnejšiemu zhášaniu (Obr. 17).



Obr. 17 Naľavo zhášač *Q* a fluorofór *F* sú voľne v roztoku nedochádza k zhášaniu. Po naviazaní na komplementárny reťazec dôjde k ich priblíženiu a k zhášaniu fluorescence. Prevzaté a upravené zo zdroja.²⁴

Ad 2) „competitive hybridization probes“

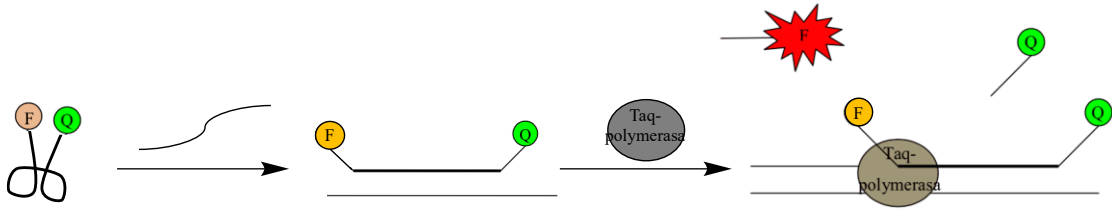
Tento typ využíva dva k sebe komplementárne nukleotidové reťazce nesúce zvlášť fluorofór a zhášač. Tieto vlákna sú hybridizované, prenos energie medzi fluorofórom a zhášačom je maximálny a výsledná fluorescence nie je detekovateľná. Po pridaní sekvencie, ktorá je komplementárna k použitej sonde a po zahriatí a následnom ochladení je sonda dehybridizovaná a jedno jej vlákno sa hybridizuje s pridanou komplementárnou sekvenciou a druhé ostane voľne v roztoku, zhášanie je prerušené a sme schopný detegovať fluorescenciu ktorá bola predtým zhášaná (Obr. 18).²⁴



Obr. 18 Naľavo reťazce zhášaču *Q* a fluorofóru *F* sú navzájom hybridizované, fluorescence je zhášaná. Po pridaní komplementárneho reťazca, zahriatí a ochladení je fluorofór *F* uvoľnený do roztoku a už nieje zhášaný Prevzaté a upravené zo zdroja.²⁴

Ad 3) „dual-labeled probes“

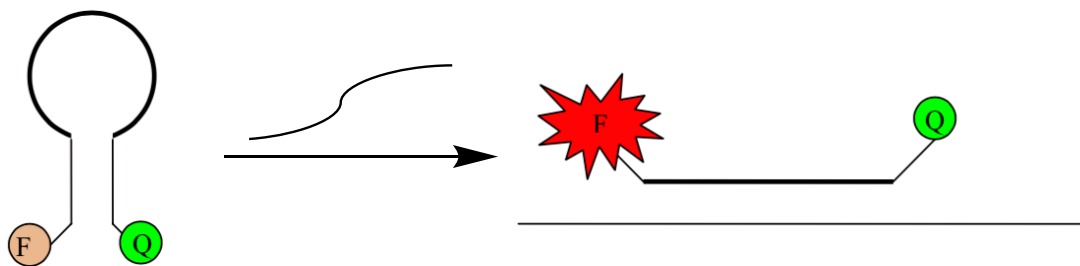
Tento typ sondy – taktiež nazývanej „TaqMan[®] sondy“ – je štandardne zostavený z ODN reťazca o dĺžke približne 30 báz s fluorofórom na 5'-konci a so zhášačom na 3'-konci. Konformácia náhodného kľbka zabezpečí zhášanie fluorofóru (statické zhášanie) a po hybridizácii na svoj cieľ (dynamické zhášanie) môžeme detegovať fluorescenciu, ktorá však dosiahne svojich maximálnych hodnôt po PCR po odštiepení sondy exonukleázovou aktivitou Taq-polymerázy (Obr.19).



Obr. 19 Zhášač Q a fluorofór F sú v konformácii náhodného kľbka – fluorescencia je minimálna. Po hybridizácii dochádza k nárastu fluorescencie a po pridaní Taq-polymerázy k odštiepeniu fluorofóru F a k nárastu fluorescencie na maximálnu hodnotu. Prevzaté a upravené zo zdroja.²⁴

Ad 4) „molecular beacons“

Druh sondy, ktorý obsahuje na svojom nukleotidovom reťazci zhášač aj fluorofór. Sonda obsahuje skupinu 15-35 báz komplementárnych k cieľovej sekvencii (slučka) a stopku, ktorá je tvorená 5-8 komplementárnymi bázami, ktoré udržujú zhášač a fluorofór (statické zhášanie) pri sebe a dávajú sonde tvar vlásenky. Väzba slučky k cieľovej sekvencii je pevnejšia ako väzba báz tvoriacich stopku, preto po hybridizácii detegujeme fluorescenciu (Obr. 20).^{24, 25}

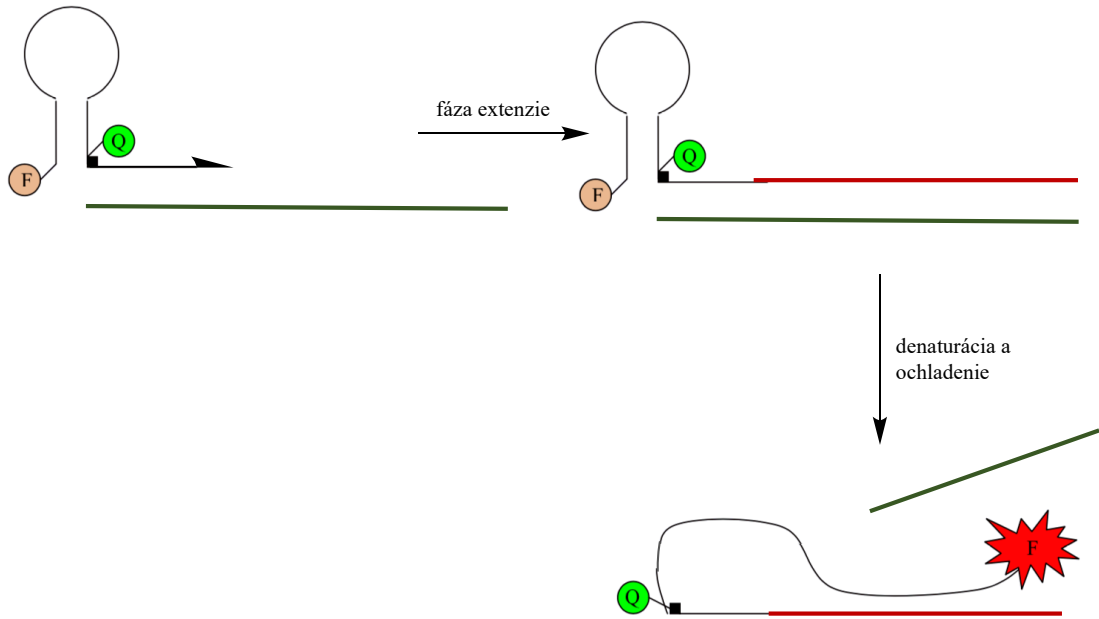


Obr. 20 Vo vlásenke sú zhášač Q a fluorofór F v tesnej blízkosti a fluorescencia je zhášaná. Po hybridizácii sa vlásenka roztvorí a fluorescencia narastá. Prevzaté a upravené zo zdroja.²⁴

Ad 5) „scorpion primers“

Sondy štruktúrneho typu podobného „molecular beacons“ avšak odpadá potreba pridávať primer do reakčnej zmesi pri PCR. Primer je už naviazaný neštiepiteľnou väzbou na 3'-koniec sondy. Po pridaní do reakcie sa celá sonda stáva súčasťou produktu PCR. Pri ochladení reakčnej zmesi sa sonda ohýba a hybridizuje sa na komplementárnu

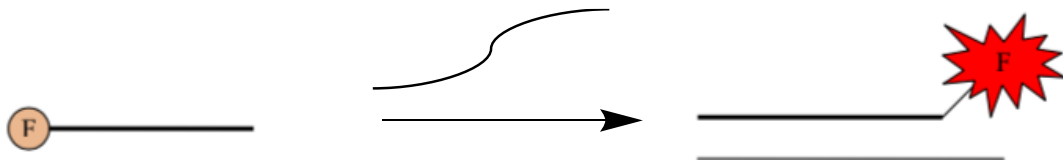
sekvenciu novo vzniknutého DNA reťazca. Tým dôjde k ohybu celej sondy a k oddialeniu fluorofóru od zhášača a k nárastu fluorescence (Obr. 21).



Obr. 21 Po denaturácii DNA, primer inkorporovaný v sonde nasadá na reťazec DNA. Nasleduje syntéza nového DNA reťazca, ktorého súčasťou je aj sonda. Po ďalšej denaturácii a následnom ochladení sa celá sonda ohýba, viaže sa na vlastný novo vzniknutý reťazec a fluorescencia narastá. Prevzaté a upravené zo zdroja.²⁴

Ad 6) „light-up probes“

Reťazec tejto sondy je tvorený analógom DNA – peptidovou nukleovou kyselinou (PNA) o dĺžke 8-12 báz a fluorofórom. Dĺžka PNA reťazca je dostatočujúca kvôli vyššej väzobnej afinite PNA, ktorá je ešte zvýšená interakciou fluorofóru a DNA. Ako fluorofóry sa využívajú asymetrické cyaníny alebo thiazolová oranž. Samotná sonda v roztoku nefluoreskuje, k fluorescencii dôjde až po vytvorení duplexu alebo triplexu s komplementárnym reťazcom DNA. Po naviazaní je obmedzené voľné otáčanie väzby v aromatickom systéme thiazolovej oranže čím sa stráca schopnosť nežiarivého prenosu energie a sonda sa rozžiari (Obr. 22).²⁴



Obr. 22 Schématické znázornenie light-up sondy. Prevzaté a upravené zo zdroja.²⁴

3.4.3 Princípy zhášania

Energia môže byť medzi dvoma látkami, ktoré sú konjugované s biomolekulami prenášaná nežiarivými procesmi a to buď statickým alebo dynamickým zhášaním. Pri nekonjugovaných fluorofóroch (napr. fluoresceín, cyaníny) sa uplatňuje aj ich agregácia, ktorá spôsobuje vytvorenie „základného energetického stavu“. Dochádza k nej vo vodných roztokoch kvôli elektrostatickým, sterickým a hydrofóbnym silám. Statické zhášanie nastáva pri vytvorení komplexu (heterodiméru) v „základnom energetickom stave“. Tento komplex je zložený z donoru (fluorofóru) a zhášača a má iné vlastnosti ako jeho jednotlivé zložky. Komplex je stabilizovaný elektrostatickými silami a sterickými vlastnosťami fluorofóru. Jednotlivé energetické stavy elektrónových hladín komplexu sa sčítajú a výsledné vlastnosti potom závisia od orientácie dipólových momentov.

Pri dynamickom zhášaní alebo aj „Försterovom rezonančnom prenose energie“ (FRET) sa uplatňujú dva mechanizmy prenosu energie. Prvým mechanizmom je Försterov alebo Coulombov mechanizmus prenosu energie. Je založený na interakcii dipól-dipól medzi tranzitornými dipólmi donoru a akceptoru. Tento prenos energie je závislý na vzdialenosti donoru a akceptoru a s narastajúcou vzdialenosťou (R) sa znižuje v pomere $1/R^6$. Limitná vzdialenosť je špecifická pre každý donor-akceptorový pár a pohybuje sa v rozmedzí 2-10 nm. Vzdialenosť pri ktorej je efektivita prenosu rovná 50% (50% excitovaných donorov je deaktivovaných pomocou FRET) sa nazýva Försterov polomer (R_0), ktorý je možno vypočítať podľa rovnice 1.

$$R_0 = (8,8 \times 10^{23} \times \kappa^2 \times n^4 \times QY_d \times J(\lambda))^{\frac{1}{6}} \quad (1)$$

κ^2 – faktor dipólového momentu

QY_d – fluorescenčný kvantový výťažok donoru bez prítomnosti akceptoru

n – refrakčný index prostredia

$J(\lambda)$ – integrál spektrálneho prekryvu (vypočítaný podľa rovnice 2)

$$J(\lambda) = \int \varepsilon_A(\lambda) \times F_D(\lambda) \times (\lambda^4) d\lambda \quad (2)$$

ε_A – extinkčný koeficient akceptoru

F_D – intenzita emitovanej fluorescencie donoru ako frakcie celkovej integrovanej intenzity

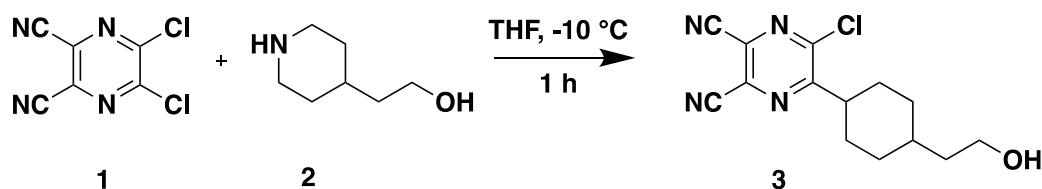
Limitujúcim prvkom je aj relatívna orientácia tranzitného dipólového momentu a nutnosť prekryvu absorpčného spektra akceptoru s emisným spektrom donoru.

Druhým mechanizmom FRET je Dextrov alebo kolízny mechanizmus. Je to jav vyskytujúci sa na krátku vzdialenosť a je závislý na priestorovom prekrytí molekulových orbitalov donoru a akceptoru. Efektivita Dextrovho prenosu sa dá vyjadriť vzťahom e^{-R} , kde R je vzdialenosť medzi akceptorom a donorom.^{9, 24}

4. Experimentálna časť

Rozpúšťadlá a východzie látky pre syntézy boli zakúpené u firiem Penta, Lach-Ner a Merck. Priebeh reakcií a čistota výsledných produktov boli sledované tenkovrstvou chromatografiou (TLC) na doskách Merck Kieselgel 60 F254, detekcia UV lampou prebiehala pri 254 nm alebo 366 nm. V stĺpcovej chromatografii bola ako stacionárna fáza Merck Kieselgel 60 (0,040 – 0,063 mm). Použité mobilné fázy sú uvedené pri jednotlivých reakciách. ^1H NMR a ^{13}C NMR spektrá boli merané na Katedre organické a bioorganické chemie na prístroji Varian VNMR S500. Hmotnostné spektrá s vysokým rozlíšením (HRMS) boli merané na UHPLC systéme Acquity UPLC I-class (Waters, Millford, USA) v zapojení s hmotnostným spektrometrom s vysokým rozlíšením Synapt G2Si (Waters, Manchester, UK) pracujúcim na princípe detektoru Q-TOF. Prístroj bol kalibrovaný s použitím leucín-enkefalínového štandardu a mravenčanu sodného (50-1200 m/z) alebo jodidu sodného (50-5000 m/z) ako externej kalibrácie. UV/Vis spektrá boli merané na prístroji Shimadzu UV-2600 spectrophotometer. Fluorescencia bola meraná na prístroji FS5 Spectrofluorometer (Edinburg Instruments). Teploty tavenia boli merané prístrojom Electrothermal IA9200. Hmotnostné spektrá ODN sond boli merané na MALDI-TOF Bruker Autoflex II mass spectrometer v matrici zloženej z kyseliny 3-hydroxypikolínovej a citrátu amónneho v 50% acetonitrilu. HPLC bolo prevedené na kvapalinovom chromatografe LC-20 A Prominence (Schimadzu, Kyoto, Japonko) s odplyňovačom typu DGU-20-A3, dvomi vysokotlakovými čerpadlami typu LC-20AD, autosamplérom typu SIL-20AC, riadiacou jednotkou typu CBM-20AC, detektorom typu SPD-M20A, kolónovým priestorom typu CTO-20AC a softwarom LC Solution Version 1.22 SP1.

4.1 Syntéza 5-chlór-6-[4-(2-hydroxyetyl)piperidín-1-yl]pyrazín-2,3-dikarbonitrilu (**3**)

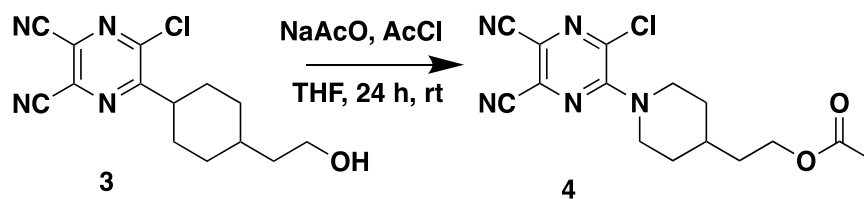


5,6-Dichlórpyrazín-2,3-dikarbonitril (2,02 g, 10,15 mmol) (**1**) bol rozpustený v THF (25 ml) v 100 ml banke. Za chladenia v sústave ľad/NaCl bol do reakcie prikvapávaný 2-(piperidín-4-yl)etan-1-ol (2,596 g, 20,12 mmol) (**2**) rozpustený v THF

(20 ml). Reakcia bola miešaná za stáleho chladenia po dobu 1 hodiny a potom ďalších 24 hodín, pričom bol jej priebeh sledovaný na TLC (mobilná fáza chloroform:acetón 8:1). Výsledná suspenzia bola sfiltrovaná, odparená a čistená pomocou stĺpcovej chromatografie v sústave chloroform:acetón v pomere 8:1. Výťažok činil 2,8 g (95 %) žltého oleja.

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3 , 25 °C, TMS): δ = 4,59–4,47 (m, 2 H), 3,74 (t, J = 6,4 Hz, 2H), 3,10 (td, J = 13,0 a 2,1 Hz, 2 H), 1,98–1,80 (m, 3 H), 1,57 (q, J = 6,5 Hz, 1 H), 1,42 (d, J = 3,0 Hz, 1 H), 1,40–1,30 ppm (m, 2 H). ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3 , 25 °C, TMS): δ = 152,6, 137,7, 129,4, 118,7, 113,1, 112,8, 59,9, 48,8, 38,7, 32,1, 32,0 ppm. IR (ATR): ν = 3365 (OH), 2928, 2856 (CH), 2228 cm^{-1} (CN). MS (ESI): m/z 292 [$\text{M} + \text{H}$] $^+$.

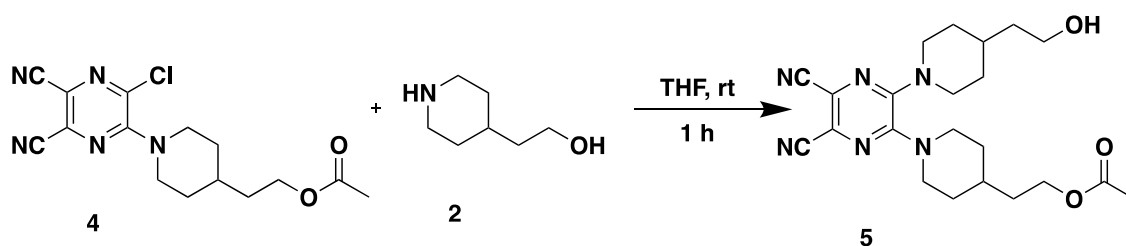
4.2 Syntéza 2-[1-(3-chlór-5,6-dikyanopyrazín-2-yl)piperidín-4-yl]etyl acetátu (4)



K látke **3** (3,87 g, 13,30 mmol) rozpustenej v THF (100 ml) bol pridaný octan sodný (NaAcO) (2,18 g, 26,58 mmol) a acetylchlorid (AcCl) (4,74 ml, 66,43 mmol). Reakcia prebiehala 24 hodín pri laboratórnej teplote, potom bola vytrepaná medzi H_2O a etylacetát. Odobrané etylacetátové frakcie boli vysušené bezvodým Na_2SO_4 a prefiltrované cez skladaný filter. Čistota produktu bola skontrolovaná TLC (mobilná fáza chloroform:acetón 40:1). Po odparení výťažok činil 4,35 g (98 %) žltého oleja.

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3 , 25 °C, TMS): δ = 4,57–4,49 (m, 2H), 4,14 (t, J = 6,5Hz, 2H), 3,09 (dt, J = 13,0 a 2,2 Hz, 2 H), 2,06 (s, 3 H), 1,96–1,88 (m, 2 H), 1,82–1,72 (m, 1 H), 1,64 (q, J = 6,6 Hz, 2 H), 1,41–1,30 ppm (m, 2 H); ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3 , 25 °C, TMS): δ = 171,0, 152,6, 137,8, 129,4, 118,9, 113,0, 112,8, 61,8, 48,6, 34,8, 32,6, 31,9, 21,0 ppm; IR (ATR): ν = 2951, 2872 (CH), 2226 (CN), 1721 cm^{-1} (CO); MS (ESI): m/z 334 [$\text{M} + \text{H}$] $^+$.

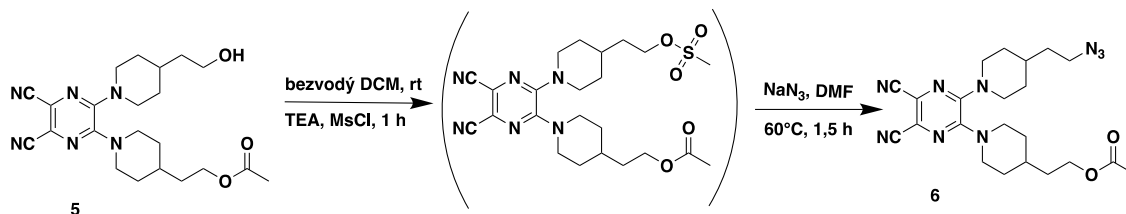
4.3 Syntéza 2-(1-{5,6-dikyano-3-[4-(2-hydroxyetyl)piperidín-1-yl]pyrazín-2-yl}piperidín-4-yl)etyl acetátu (5)



Látka **4** (3,57 g, 10,70 mmol) bola rozpustená v THF (60 ml) a do banky bol prikvapkaný 2-(piperidín-4-yl)etan-1-ol (3,45 g, 26,74 mmol) (**2**) rozpustený v THF (20 ml). Reakcia prebiehala 1 hodinu za laboratórnej teploty, priebeh reakcie bol skontrolovaný TLC (mobilná fáza chloroform:acetón 10:1) a rozpúšťadlo bolo odparené. Čistenie prebiehalo stĺpcovou chromatografiou v sústave chloroform:acetón v pomere 10:1. Výsledný výťažok činil 4,15 g (91 %) žltého viskózneho oleja.

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3 , 25°C , TMS): δ = 4,19 (s, 4 H), 4,12 (t, J = 6,4 Hz, 2 H), 3,72 (t, J = 6,4 Hz, 2 H), 2,80–2,70 (m, 4 H), 2,05 (s, 3 H), 1,84 (d, J = 13,7 Hz, 4 H), 1,79–1,70 (m, 1 H), 1,69–1,52 (m, 6 H), 1,30–1,18 ppm (m, 4 H); ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3 , 25°C , TMS): δ = 171,1, 146,7, 146,7, 120,8, 120,6, 114,8, 61,9, 60,0, 46,5, 38,9, 34,8, 32,8, 32,4, 31,8, 31,6, 29,6, 21,0 ppm; IR (ATR): ν = 3435 (OH), 2927, 2849 (CH_2), 2226 (CN), 1735 cm^{-1} (C=O); MS (ESI): m/z : 427 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

4.4 Syntéza 2-(1-{3-[4-(2-azidoetyl)piperidín-1-yl]-5,6-dikyanopyrazín-2-yl}piperidín-4-yl)etyl acetátu (6)



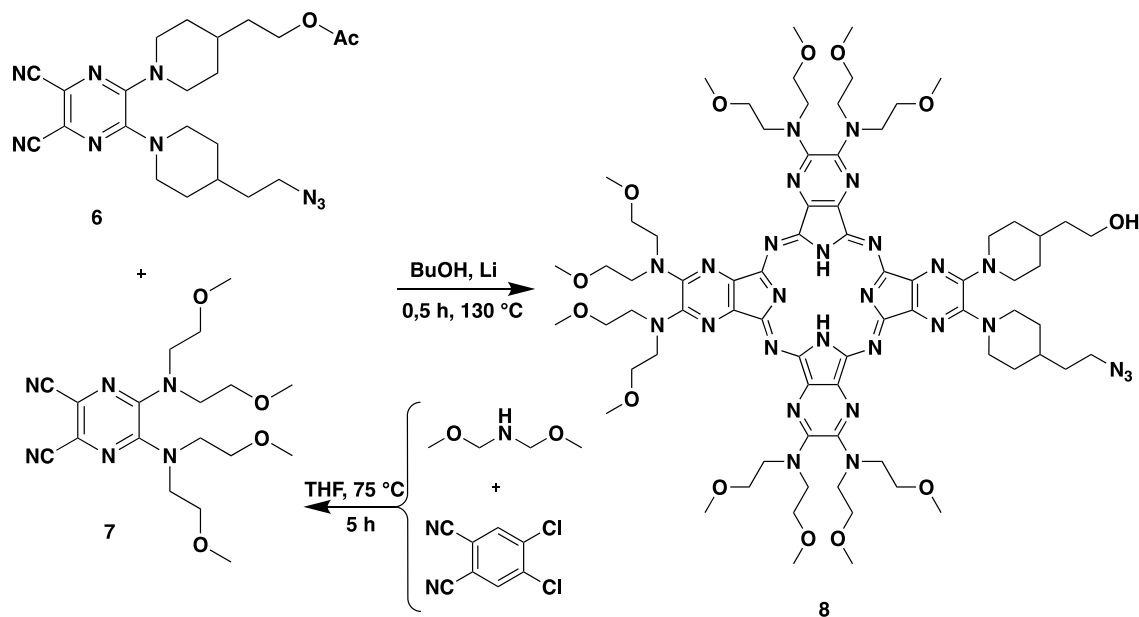
Látka **5** (4,15 g, 9,73 mmol) sa rozpustila v bezvodom dichlórmetáne (DCM) (~100ml). Potom sa pridal trietylamin (TEA) (2,94 ml, 21,08 mmol) a metánsulfonylchlorid (MsCl) (0,903 ml, 11,67 mmol). Reakcia bola miešaná 1 hodinu pri laboratórnej teplote a priebeh bol monitorovaný TLC (mobilná fáza chloroform:acetón 20:1). Po

ukončení bol medziprodukt vytrepáný DCM/voda s prídavkom soľanky, vysušený bezvodým Na₂SO₄ a odparený s prídavkom toluénu.

Medziprodukt bol rozpustený v dimetylformamide (DMF) (25 ml) a bol pridaný azid sodný (3,164 g, 48,67 mmol). Reakcia bola miešaná 1,5 hodiny pri teplote 60 °C. Následne bolo rozpúšťadlo odparené a produkt bol vytrepáný medzi chloroform a vodu. Čistenie prebiehalo stĺpcovou chromatografiou s chloroformom ako mobilnou fázou. Výťažok činil 3,8 g (87 %) žltého viskózneho oleja.

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, 25 °C, TMS): δ = 4,20 (s, 4 H), 4,13 (t, *J* = 6,4 Hz, 2 H), 3,36 (t, *J* = 6,8 Hz, 2 H), 2,81–2,71 (m, 4 H), 2,06 (s, 3 H), 1,88–1,81 (m, 4 H), 1,72–1,54 (m, 6 H), 1,30–1,18 ppm (m, 4 H); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃, 25 °C, TMS): δ = 171,1, 146,7, 146,7, 120,8, 120,7, 114,7, 61,9, 48,7, 46,4, 34,9, 34,8, 33,2, 32,8, 31,6, 31,4, 21,0 ppm ; IR (ATR): ν = 2930, 2850 (CH₂), 2227 (CN), 2095 (N₃), 1736 cm⁻¹ (C=O); MS (ESI): *m/z*: 452 [M+H]⁺.

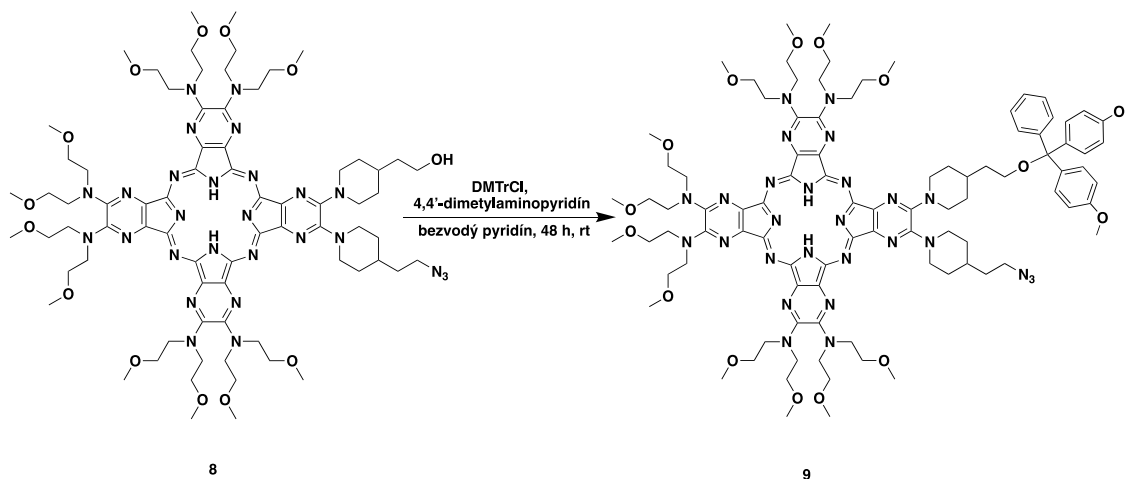
4.5 Syntéza 2-[4-(2-azidoetyl)piperidín-1-yl]-3-[4-(2-hydroxyetyl)-piperidín-1-yl]-9,10,16,17,23,24-hexakis[bis(2-metoxetyl)amino]-1,4,8,11,15,18,22,25-oktaazaftalocyanínu (**8**)



Látky **6** (1 g, 2,22 mmol) a **7** (2.61 g, 6,66 mmol) boli rozpustené v čerstvo nadestilovanom butanole (BuOH) (50 ml) a po zahriatí na 130 °C bolo pridané kovové lítium (0,46 g, 66,6 mmol). Reakcia prebiehala pri tej istej teplote 0,5 hodiny a po

ukončení bol odparený BuOH a následne bola zmes rozpustená v DCM, vytrepaná medzi DCM a 1 % HCl (odstránenie prebytočného lítia). Odobraté DCM frakcie boli s prídavkom toluénu odparené. Zmes AzaPcs sa čistila stĺpcovou chromatografiou v sústave DCM:MeOH v pomere 15:1. Žiadaný produkt bol izolovaný ako druhá intenzívne fialová frakcia. Nepodarilo sa ho však oddeliť od ostatných kongenerov a preto bola do ďalšej reakcie použitá ich zmes.

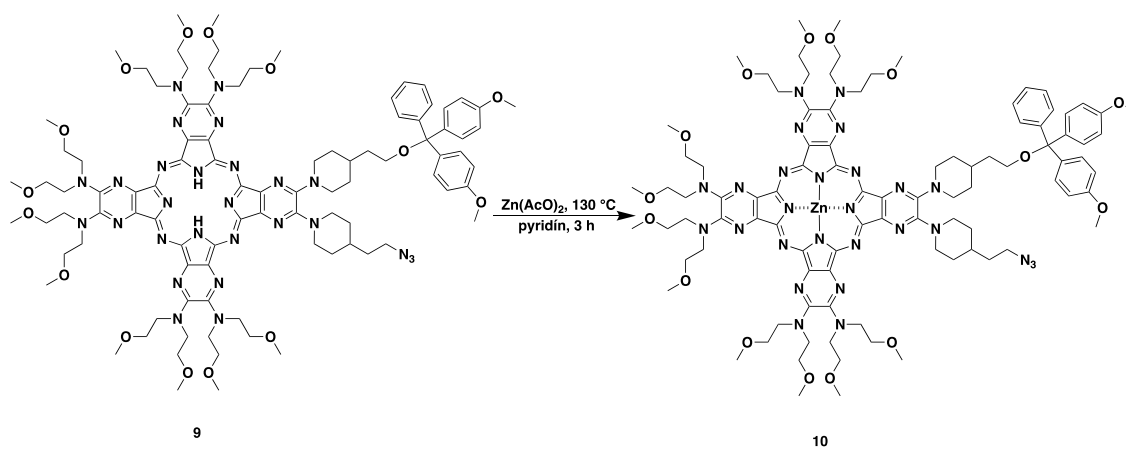
4.6 Syntéza 2-[4-(2-azidoetyl)piperidín-1-yl]-3-[4-(2-dimetoxytrityloxyetyl)-piperidín-1-yl]-9,10,16,17,23,24-hexakis[bis(2-metoxyetyl)amino]-1,4,8,11,15,18,22,25-oktaazaftalocyanínu (9)



K zmesi látok **8** (1,67 g, ~1 mmol) z predchádzajúcej reakcie sa pridal dimetoxytrityl chlorid (DMTrCl) (4,31 g, 12,72 mmol) a katalytické množstvo (pár kryštálikov) 4,4'-dimetylamino pyridínu. Reakčná banka bola uzavretá septom, evakuovaná, naplnená argónom a potom bol pridaný bezvodý pyridín (15 ml). Reakcia bola miešaná pri laboratórnej teplote 48 hodín. Po odparení, prebiehalo čistenie stĺpcovou chromatografiou v sústavách DCM:MeOH v pomere 19:1, kde bola izolovaná štvrtá intenzívne fialová frakcia. Ďalšie dočistenie prebiehalo v mobilnej fáze DCM:acetón:MeOH v pomere 40:1:1. Nakoniec bol produkt rozpustený v minimálnom množstve DCM a nakvapkaný do hexánu (100 ml) a uskladnený pri -18 °C cez noc. Precipitát bol odfiltrovaný, vysušený a výtazok činil 321 mg (7,6 %) fialových kryštálov.

T.t. > 300 °C. ^1H NMR (500 MHz, Pyridín- d_5) δ 7,87 – 7,81 (m, 2 H), 7,73 – 7,66 (m, 4 H), 7,54 – 7,49 (m, 2 H), 7,40 – 7,35 (m, 1 H), 7,15 – 7,08 (m, 4 H), 4,81 – 4,70 (m, 4 H), 4,45 – 4,39 (m, 16 H), 4,39 – 4,34 (m, 8 H), 3,77 (s, 6 H), 3,77 – 3,72 (m, 16 H), 3,72 – 3,66 (m, 8 H), 3,47 – 3,41 (m, 2 H), 3,35 (t, $J = 7.1$ Hz, 2 H), 3,24 (s, 18 H), 3,23 (s, 6 H), 3,22 (s, 6 H), 3,21 (s, 6 H), 3,11 – 3,03 (m, 4 H), 1,98 – 1,78 (m, 8 H), 1,59 – 1,43 (m, 6 H), -1,49 (s, 2 H) ppm. ^{13}C NMR (126 MHz, Pyridín- d_5) δ 158,9, 150,9, 150,8, 150,6, 149,5, 137,1, 135,3, 135,1, 130,5, 128,6, 128,1, 127,0, 123,3, 123,1, 113,5, 71,0, 70,9, 70,9, 61,3, 58,3, 58,3, 55,1, 49,0, 48,9, 48,8, 48,8, 47,8, 47,5, 36,9, 35,2, 33,7, 33,5, 32,6, 32,1 ppm (niektoré aromatické signály sú zlúčené). HRMS (ESI) (m/z): počítané pre $[\text{M}+\text{H}]^+$ ($\text{C}_{95}\text{H}_{132}\text{N}_{27}\text{O}_{15}$) vyžaduje 1891,0391, namerané 1891,0325.

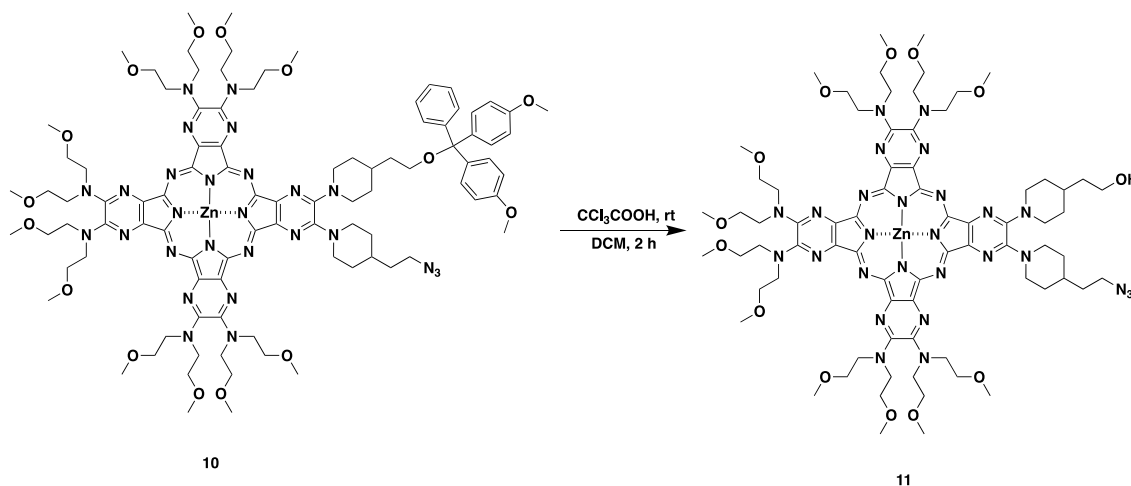
4.7 Syntéza zinočnatého 2-[4-(2-azidoetyl)piperidín-1-yl]-3-[4-(2-dimetoxytrityloxyetyl)-piperidín-1-yl]-9,10,16,17,23,24-hexakis[bis(2-metoxyetyl)amino]-1,4,8,11,15,18,22,25-oktaazaftalocyanínu (10)



Látka **9** (290 mg, 0,15 mmol) bola rozpustená v pyridíne (5 ml) a bol pridaný octan zinočnatý ($\text{Zn}(\text{AcO})_2$) (169 mg, 0,96 mmol). Reakčná zmes bola miešaná a pod spätným chladičom pri 130 °C po dobu 3 hodín. Následne bol pyridín odparený. Čistenie prebiehalo stĺpcovou chromatografiou v sústave DCM:MeOH. 22:1. Nakoniec bol produkt rozpustený v minimálnom množstve DCM a nakvapkaný do hexánu (100 ml) a uskladnený pri -18°C cez noc. Precipitát bol odfiltrovaný, vysušený a výtťažok činil 150 mg (50%) tmavomodrých kryštálov.

T.t. > 300 °C. ^1H NMR (500 MHz, Pyridín- d_5) δ 7,86 – 7,81 (m, 2 H), 7,71 – 7,67 (m, 4 H), 7,52 (t, $J = 7,8$ Hz, 2 H), 7,40 – 7,35 (m, 1 H), 7,14 – 7,09 (m, 4 H), 4,81 – 4,70 (m, 4 H), 4,45 – 4,40 (m, 16 H), 4,40 – 4,35 (m, 8 H), 3,78 (s, 6 H), 3,77 – 3,73 (m, 16 H), 3,72 – 3,67 (m, 8 H), 3,44 (t, $J = 6,4$ Hz, 2 H), 3,37 – 3,32 (m, 2 H), 3,23 (d, $J = 1,3$ Hz, 24 H), 3,21 (s, 6 H), 3,20 (s, 6 H), 3,14 – 3,03 (m, 4 H), 1,97 – 1,78 (m, 8 H), 1,59 – 1,42 (m, 6 H) ppm. ^{13}C NMR (126 MHz, Pyridín- d_5) δ 159,1, 151,5, 149,6, 142,8, 137,3, 135,5, 135,3, 130,7, 128,8, 128,3, 123,5, 123,3, 113,7, 71,2, 71,2, 71,1, 58,5, 58,4, 55,3, 49,2, 49,2, 49,1, 49,0, 48,0, 47,7, 35,4, 32,8, 32,3 ppm (niektoré aromatické signály sú zlúčené). HRMS (ESI) (m/z): počítané pre $[\text{M}+\text{H}]^+$ ($\text{C}_{95}\text{H}_{130}\text{N}_{27}\text{O}_{15}\text{Zn}^+$) vyžaduje 1952,9526, namerané 1952,9515.

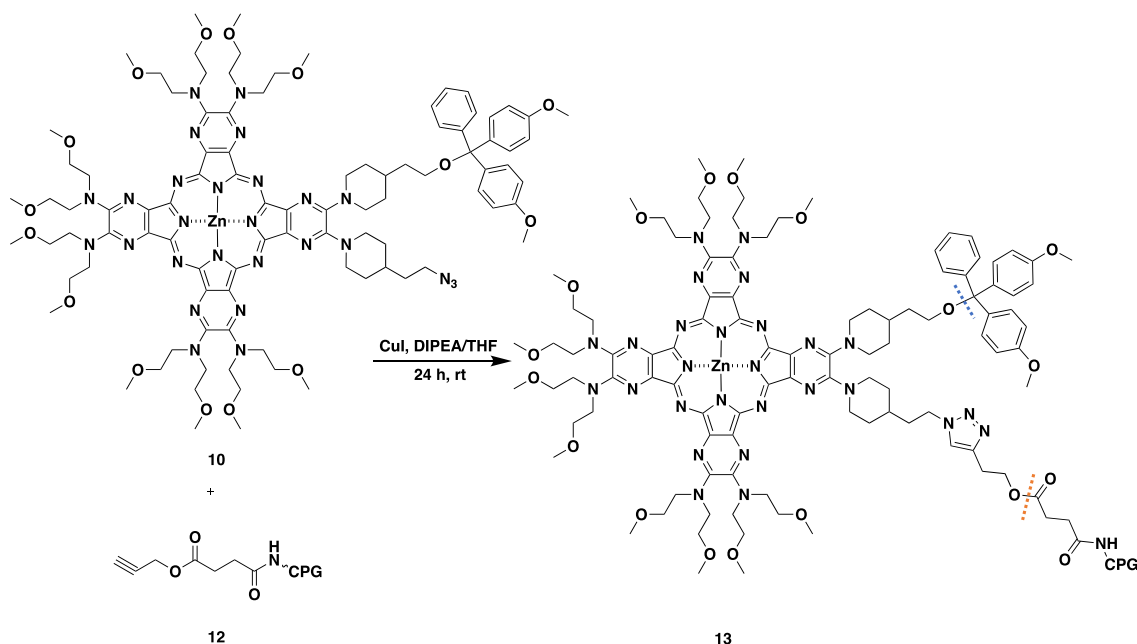
4.8 Syntéza 2-[4-(2-azidoetyl)piperidín-1-yl]-3-[4-(2-hydroxyetyl)-piperidín-1-yl]-9,10,16,17,23,24-hexakis[bis(2-metoxetyl)amino]-1,4,8,11,15,18,22,25-oktaazaftalocyanínu zinočnatého (**11**)



K látke **10** (50 mg, 0,026 mmol) rozpustenej v DCM (5 ml) bola pridaná trichlóractoová kyselina (8,4 mg, 0,051 mmol). Reakcia prebiehala po dobu 2 hodín za laboratórnej teploty. Potom bol pridaný DCM (30 ml) a zvyšok trichlóractoovej kyseliny bol neutralizovaný vytrepaním s 5% NaHCO_3 (3×20 ml). Organická vrstva DCM bola vysušená bezvodým Na_2SO_4 a odparená dosucha. Čistenie prebiehalo stĺpcovou chromatografiou v sústave DCM:MeOH v pomere 15:1. Výťažok činil 37 mg (88%) tmavomodrých kryštálov.

T.t. > 300 °C. ^1H NMR (500 MHz, Pyridín- d_5) δ 4,78 (t, $J = 9,4$ Hz, 4 H), 4,44 – 4,38 (m, 16 H), 4,38 – 4,33 (m, 8 H), 4,04 (t, $J = 6,5$ Hz, 2 H), 3,77 – 3,71 (m, 16 H), 3,71 – 3,65 (m, 8 H), 3,34 (t, $J = 7,1$ Hz, 2 H), 3,23 (s, 24 H), 3,20 (s, 6 H), 3,20 (s, 6 H), 3,16 – 3,02 (m, 4 H), 2,09 – 2,03 (m, 2 H), 1,99 (br, 1 H), 1,91 – 1,80 (m, 4 H), 1,73 – 1,41 (m, 8 H) ppm. ^{13}C NMR (126 MHz, Pyridín- d_5) δ 151,53, 151,44, 151,30, 150,91, 149,66, 143,22, 143,10, 142,88, 142,84, 135,51, 135,31, 123,50, 123,30, 71,22, 71,13, 59,72, 58,47, 49,20, 49,12, 49,02, 48,07, 47,76, 40,47, 35,41, 33,94, 33,47, 33,00, 32,33 ppm (niektoré aromatické signály sú zlúčené). UV/Vis (THF): λ_{max} (log ϵ) = 654 (5,4), 596 (4,6), 505 (4,6), 373 nm (5,2). HRMS (ESI) (m/z): počítané pre $[\text{M}+\text{H}]^+$ ($\text{C}_{74}\text{H}_{112}\text{N}_{27}\text{O}_{13}\text{Zn}^+$) vyžaduje 1650,8219, namerané 1650,8181.

4.9 Modifikácia pevnej fázy pomocou AzaPcs a syntéza ODN



Obr. 23 Zavádzanie látky **10** na pevnú fázu. Prerušovaná modrá čiara značí miesto odštiepenia DMTr a začiatok pre syntézu ODN, oranžová prerušovaná čiara značí miesto odštiepenia sa z pevnej fáze.

Do sklenenej vialky bola navážená látka **10** (24 mg, 0,012 mmol), CuI (34,4 mg, 0,181 mmol), alkýn-CPG (**12**) (120 mg) a zmes THF/diisopropyletylamín v pomere 2:1 (1 ml). Vialka bola trepaná 24 hodín za laboratórnej teploty. Následne bolo rozpúšťadlo odstránené dekantáciou a CPG sa opakovane premývalo THF, acetonitrilom, DCM a dietyléterom (4 × 1ml z každého). CPG bolo vysušené pod vákuom nad P_2O_5 . Loading AzaPc na pevnú fázu bol určený absorbnou spektroskopiou a monitorovaním pásu, ktorý odpovedá 4,4'-dimethoxytritylu (498 nm) uvoľnenému

z pevnej fáze. Približne 2-3 mg pevnej fáze sa presne navážilo do skúmavky, potom bol pridaný roztok kyseliny chloristej (10 ml, 70% HClO₄/metanol v pomere 52:46), skúmavka bola uzavretá a trepaná 0,5 hodiny. Vzorka roztoku bola potom zriedená a prenesená do 1 cm kyvety, kde bola zmeraná absorbanca pri 498 nm. Loading bol vypočítaný podľa vzorca:

$$\text{loading } (\mu\text{mol/g}) = \frac{A_{498\text{nm}} \times \text{zriedenie} \times 143}{\text{hmotnosť pevnej fázy v mg}}$$

Výsledný loading bol 55 $\mu\text{mol/g}$.

Takto modifikovaná pevná fáza **13** slúžila ako východzí materiál (Obr. 23) pre syntézu ODN sondy F_D_Q značenej na 3'-konci (Obr. 24). Celá syntéza ODN sond prebiehala v externej firme GENERI BIOTECH (Hradec Králové, Česká republika) na DNA/RNA syntetizátore (Perkin-Elmer, Applied Biosystems 394).

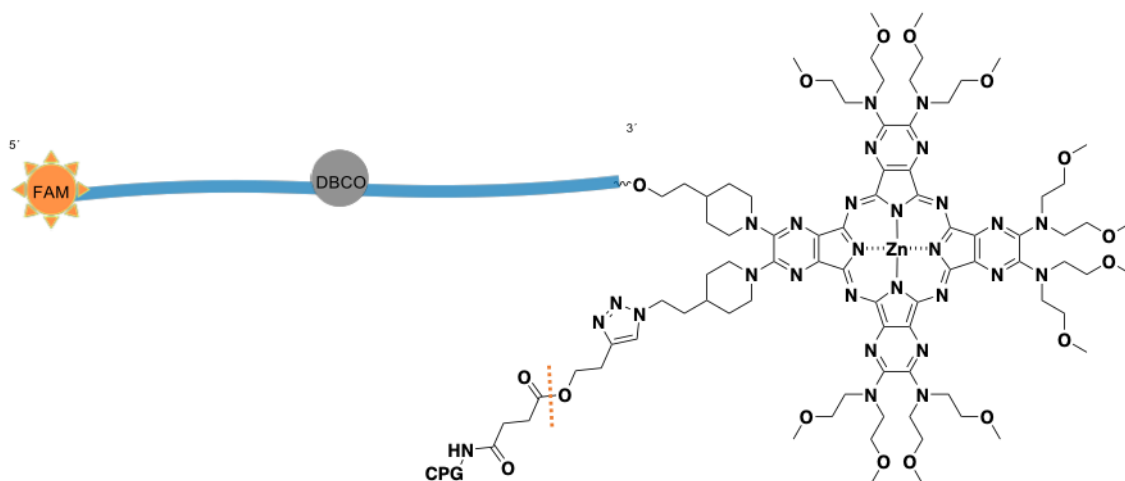
Sekvencia ODN reťazca pripravených sond je nasledujúca:

5'-FAM-TCTTTTGGAAAAGTTATA[DBCOdT]CTACTTACAGAAAAGTAAAT-(AzaPc **11**)-3'.

Firmou GENERI BIOTECH (Hradec Králové, Česká republika) bol dodaný aj antisense ODN o sekvencií (tučne je znázornená časť komplementárna k pripraveným sondám):

5'-TCTATGTCTCATTACTTTTCTGTAAGTAGATATAACTTTTCAAAAAGACAGTCAATTC-3'

Nasyntetizovaná bola aj sonda bez látky **11** na 3'-konci s označením F_D_X.



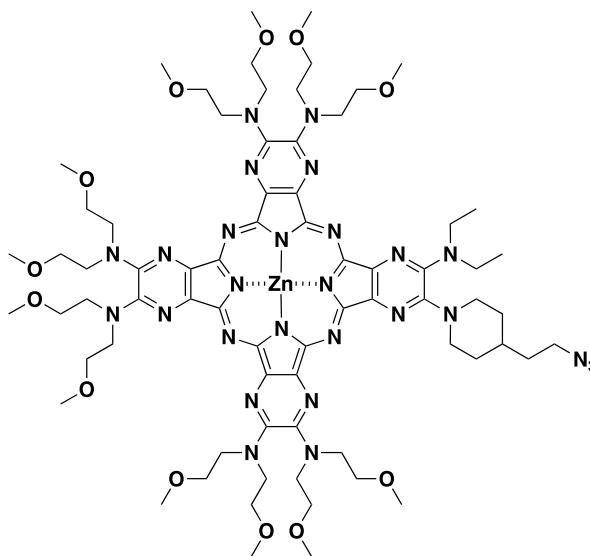
Obr. 24 Schematicky znázornená sonda F_D_Q, žltá čiara značí miesto odštiepenia z pevnej fáze, dibenzoazacyklooktín (DBCO).

Po syntéze ODN reťazca boli sondy F_D_X a F_D_Q (detailný popis sond vid' nižšie Obr. 26) odštiepené z pevnej fáze pridaním 32% amoniaku (1 ml) a trepaním po

dobu 24 hodín pri laboratórnej teplote. Následným prečistením gélovou chromatografiou na predplnenej kolónke CentriPure N10 (empBIOTECH, Nemecko) sa odstránili nízkomolekulárne nečistoty. Kolónka sa nechala vykvapkať a následne bola nanesená sonda v 32% amoniaku (1 ml), ktorý bol vykvapkaný. Pridala sa voda (0,5 ml), ktorá sa nechala vykvapkať a s ďalším prídavkom vody (1 ml) sa už odoberal eluent. Následne podľa absorbancie zmeranej pri 260 nm, bola určená koncentrácia, vypočítané látkové množstvo sondy v roztoku a rozpúšťadlo odparené.

4.10 Značenie ODN sond AzaPcs

Sondy s označením F_Q_Q a F_Q_X boli pripravené pridaním látky **14** (15 mg, 0,009 mmol) (Obr. 25) v THF (300 μ l) k ODN reťazci ešte stále naviazanému na CPG (20 mg) (buď F_D_Q alebo F_D_X) a trepaním po dobu 24 hodín pri laboratórnej teplote.

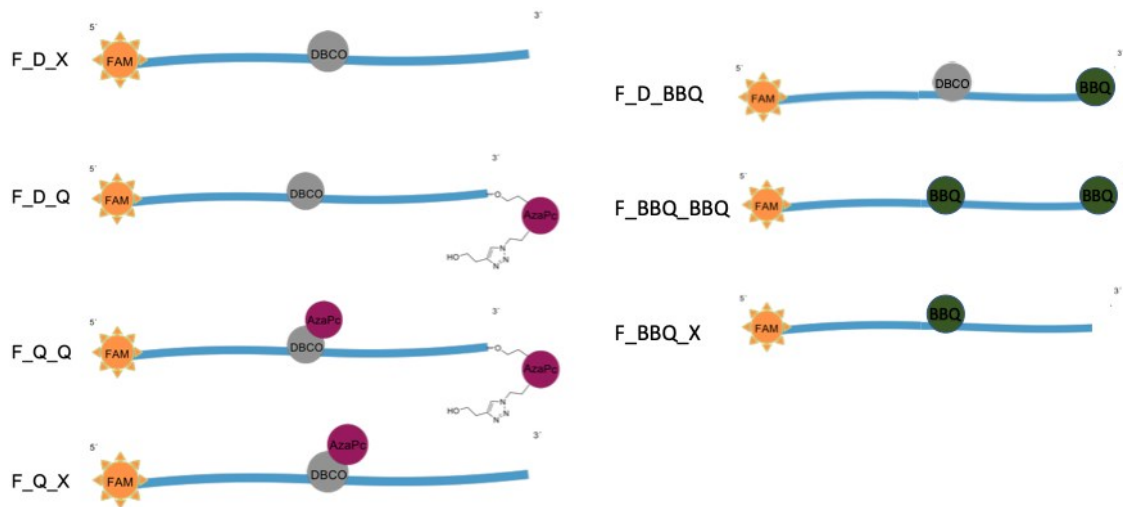


14

Obr. 25 Vzorec látky 14.

Látka **14** je synteticky dostupnejšia a bola už v laboratóriu v minulosti pripravená.²⁶ Obsahuje na periférii jednu azidovú skupinu, ktorá bola využitá pre väzbu na DBCO. (viď kapitola 5.2). Po zmienených 24 hodinách bola pevná fáza prepláchnutá THF (4 \times 1 ml). Sondy boli odštiepené z pevnej fázy pridaním 32% amoniaku (1 ml) a trepaním po dobu 24 hodín pri laboratórnej teplote. Prečistením gélovou chromatografiou na predplnenej kolónke CentriPure N10 (empBIOTECH, Nemecko) sa

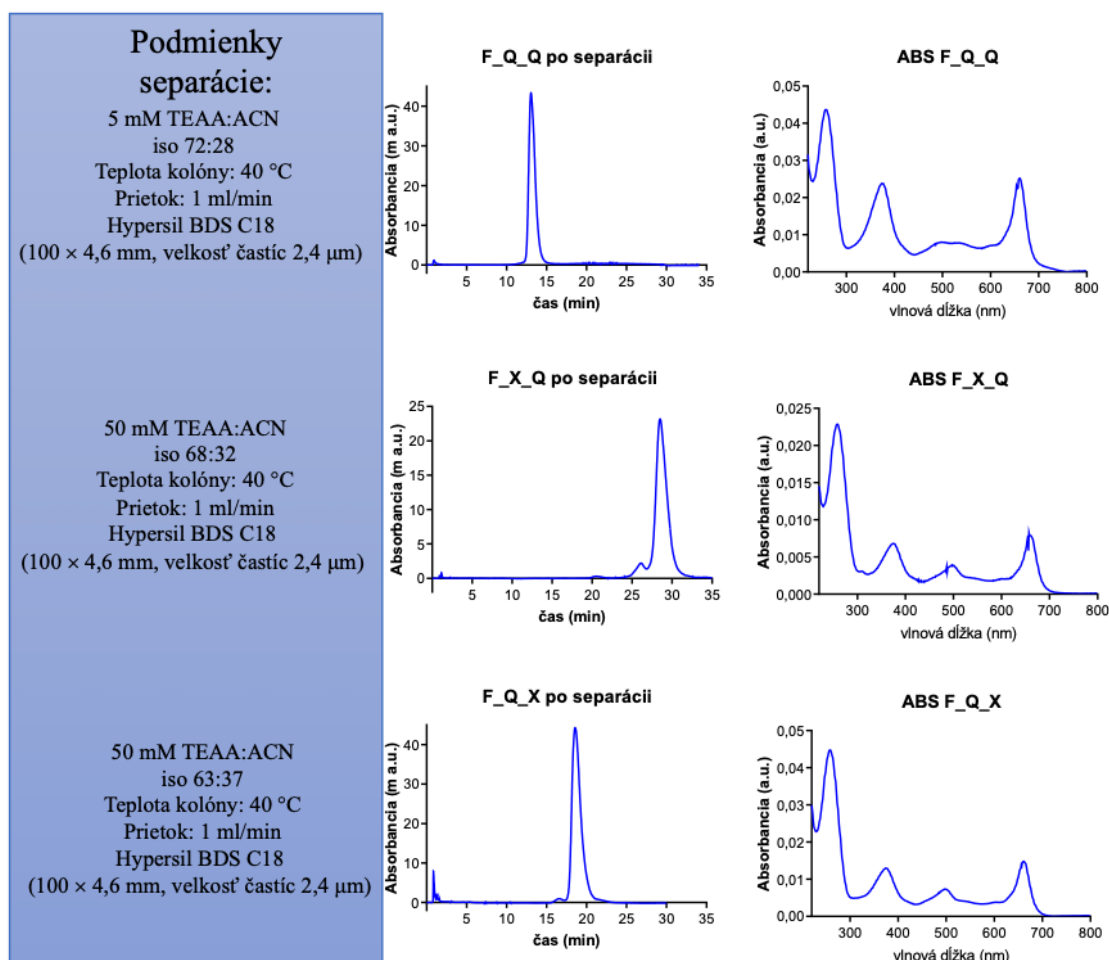
odstránili nízkomolekulárne nečistoty (vid' kapitola 4.9). Sondy analogicky značené zhášačom BBQ boli pripravené a dodané externou firmou GENERI BIOTECH. Schématické zobrazenie všetkých študovaných sond je na Obr. 26.



Obr. 26 Znáozornenie modifikácií AzaPc a BBQ sond.

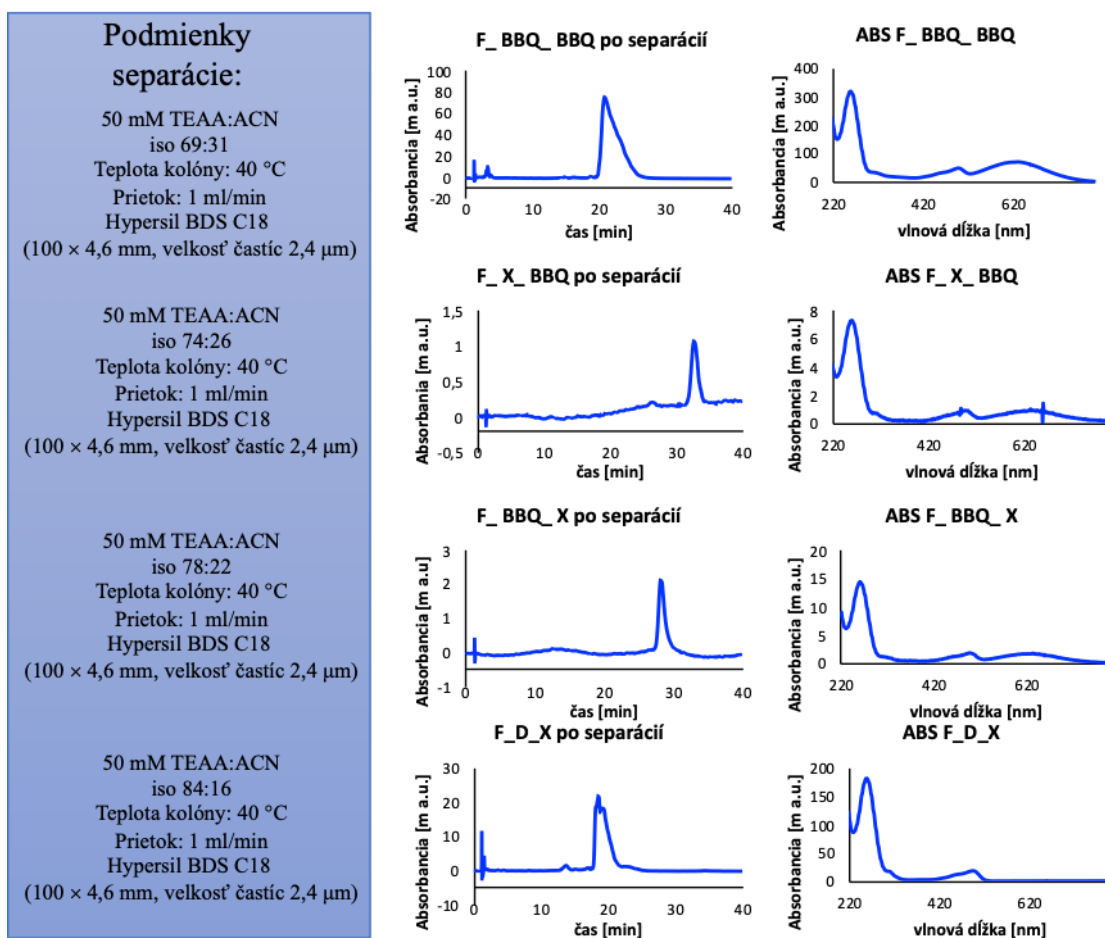
4.11 Čistenie sond v systéme HPLC

Následne boli pripravené sondy čistené pomocou semipreparatívnej HPLC (Obr. 27). Všetky odparené sondy boli rekonštituované prídavkom vody tak, aby výsledná koncentrácia odpovedala približne 0,1-0,5 mM pre čistenie pomocou semipreparatívnej HPLC. Ako mobilná fáza bola použitá zmes acetonitrilu (ACN) a trietylamónium-acetátového (TEAA) pufru, ktorých vzájomný pomer bol upravovaný podľa čistenej sondy. Ako stacionárna fáza slúžila C18 reverznej kolóny Hypersil BDS C18 (100 × 4,6 mm, veľkosť častíc 2,4 μm). Kolóna bola temperovaná na 40 °C a prietok bol nastavený na 1 ml/min. Správne frakcie boli zbierané na základe údajov z DAD detektoru v momente, keď bol na absorpčnom spektre viditeľný zhášač, FAM aj ODN reťazec a aby sa znížil objem zbieraných frakcií tak v čase, v ktorom bolo detekované požadované spektrum sa pomer ACN zvýšil o 1–2 %. Zbierané frakcie boli odparené a uchovávané v mrazničke (–20 °C).



Obr. 27 Chromatogramy (pri 260 nm) a absorpčné spektrá AzaPc sond po separácii.

BBQ značené sondy boli čistené semipreparatívnou HPLC za nastavenia a spracovania vzorku, ktoré je uvedené vyššie. Výsledné podmienky separácie sú uvedené v nasledujúcom obrázku (Obr. 28).



Obr. 28 Chromatogramy (pri 627 nm pre BBQ sondy a 497 nm pre sondu F_D_X) a absorpčné spektrá sond po separácii.

4.12 Hodnotenie sond

Efektivita zhášania všetkých pripravených sond bola meraná podľa nasledujúceho postupu. Do kyvety sa pridalo 600 μ l hybridizačného pufru (20 mM Tris-HCl (pH 8.4), 2 mM MgCl₂, 50 mM KCl) a zmerala sa bazálna fluorescencia pufru. Potom bolo pridané také množstvo sondy, aby výsledná koncentrácia odpovedala 50 nM a merala sa fluorescencia. Potom sa pridala antisense ODN tak, aby jej výsledná koncentrácia bola 250 nM a kyveta sa zahriala na 75 °C po dobu 10 minút. Následne kyveta chránená pred svetlom chladla pri laboratórnej teplote 0,5 hodiny a potom sa merala fluorescencia. Následne sa pridal 1 μ l enzýmu DNasy (DNase I (1 U, Thermo Scientific)) a okamžite sa začala sledovať fluorescencia (10 cyklov, meranie každé 2 minúty).

Výsledné hodnoty boli dosadené do vzorca:

$$QE = \left[1 - \left(\frac{F_x - F_b}{F_{max} - F_b} \right) \right] \times 100$$

kde :

F_x je hodnota okamžitej fluorescencie

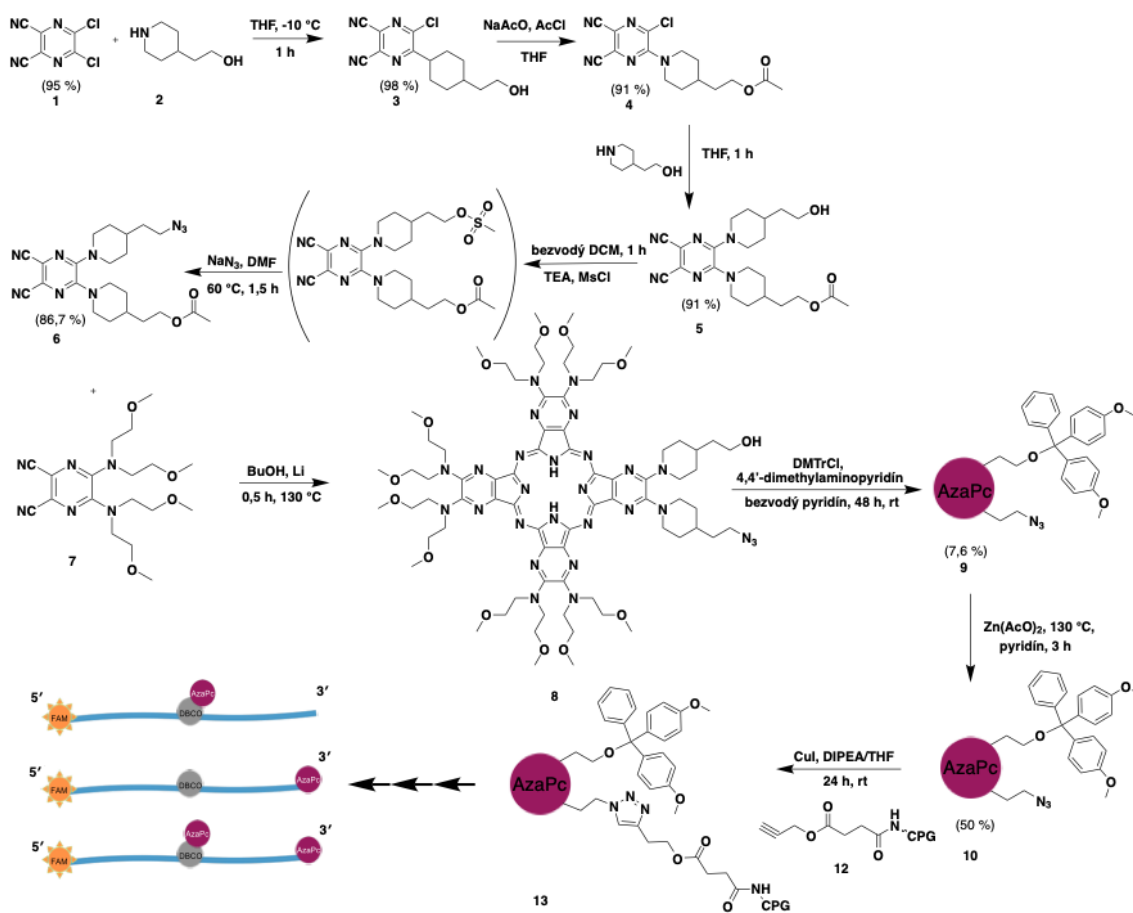
F_b je hodnota bazálna fluorescencia

F_{max} je maximálna hodnota fluorescencie po pridaní DNasy

5. Diskusia a výsledky

Cieľom mojej práce bolo syntetizovať dialkylamino substituovaný AzaPc, pripraviť trojito značenú sondu a porovnať efektivitu jej zhášania oproti sondám značeným dvojito. Okrem toho som hodnotil vplyv polohy zhášača na efektivitu zhášania.

5.1 Syntéza AzaPc

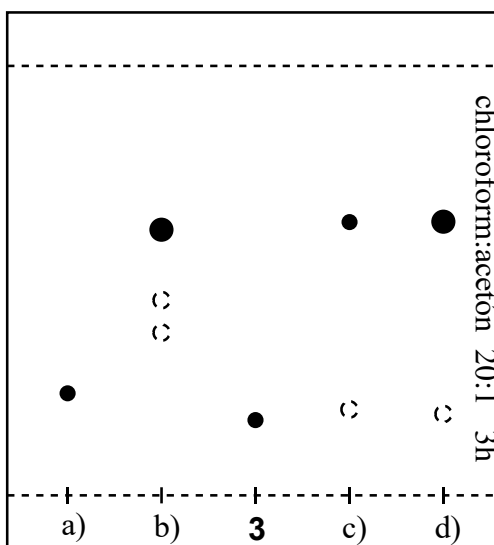


Obr. 29 Schéma syntézy AzaPc použitého na väzbu na 3'-koniec ODN.

Syntéza AzaPc začala najskôr prípravou vhodných prekurzorov – substituovaných pyrazin-2,3-dikarbonitrilov. V prvom kroku vznikala nukleofilnou substitúciou atómu chlóru v látke **1** látka **3**. Následne bola jej hydroxylová skupina ochránená acetyláciou (Obr. 29). V tomto kroku pri syntéze látky **4** som zisťoval najvýhodnejšie podmienky acetylácie látky **3**. Jednotlivé reakčné podmienky sú uvedené v tabuľke 1. Reakcie prebiehali po dobu 3 hodín v 2 ml THF. Po ukončení reakcie som vyvinul TLC v sústave chloroform:acetón v pomere 20:1 (Obr. 30).

Tabuľka 1 Reakčné podmienky acetylácie látky **3**

	Reakčné podmienky:		Reakčné podmienky:
a)	100 mg látky 3 10 eq anhydridu kyseliny octovej	c)	100 mg látky 3 10 eq anhydridu kyseliny octovej 1,5 eq NaAcO
b)	100 mg látky 3 10 eq anhydridu kyseliny octovej + katalytické množstvo H ₂ SO ₄	d)	100 mg látky 3 5 eq AcCl 1,5 eq NaAcO

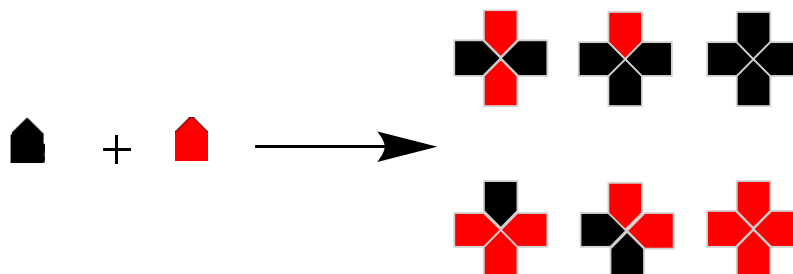


Obr. 30 TLC po acetylácii za rôznych reakčných podmienok.

Za reakčných podmienok a) reakcia neprebehla. V prípade b) reakcia prebiehala kvantitatívne ale produkt bol znečistený (pravdepodobne v dôsledku hydrolyzy nitrilových skupín silnou kyselinou). V prípade c) reakcia prebiehala dobre, ale nie lepšie ako za podmienok d), ktoré boli zvolené ako finálne reakčné podmienky pre syntézu látky **4**. Následne bola prevedená nukleofilná substitúcia druhého atómu chlóru na látku **5** a voľná OH skupina bola v dvoch krokoch (mesylácia a následná substitúcia) prevedená na azidoskupinu. Druhý prekurzor (látka **7**), ktorý bol použitý do

cyklotetramerizácie a tvoril tri štvrtiny výsledného makrocyklu, bol už v minulosti pripravený v laboratóriu obdobne nukleofilnou substitúciou.²⁶

Do cyklotetramerizácie teda vstúpili dva prekurzory a výsledné produkty reakcie boli dôsledkom štatistickej kondenzácie (Obr. 31).



Obr. 31 Schematicky znázornené produkty štatistickej kondenzácie.

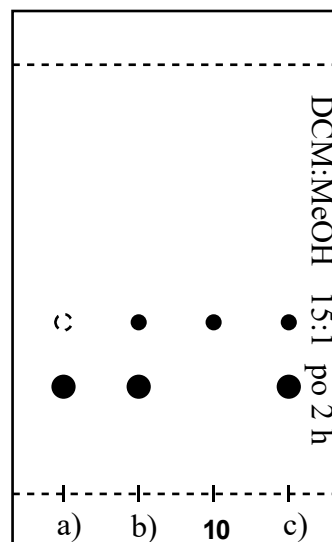
Takto vznikala zmes kongenerov, kedy každý kongener obsahoval jednu až štyri hydroxylové skupiny. Bohužiaľ retenčný faktor jednotlivých kongenerov bol veľmi podobný, kvôli tomu, že hydroxylové skupiny jedného prekurzoru mali veľmi podobný vliv na hydrofilitu výsledného makrocyklu ako bis(metoxyetyl)amino substituenty druhého prekurzoru. Vyššie zmienená skutočnosť znemožňovala separáciu pomocou stĺpcovej chromatografie (Obr. 32). Preto bol do zmesi kongenerov chránením hydroxy skupiny/skupín zavedený jeden až štyri DMTr. Takto substituované kongenery mali už dostatočne rozdielne retenčné faktory pre delenie stĺpcovou chromatografiou. Zavedenie DMTr do výsledného makrocyklu umožnilo separáciu žiadaného kongeneru (Obr. 32, znázornený červeno), avšak okrem toho, bolo nepostrádateľné aj pre zistenie „loadingu“ AzaPc na pevnú fázu v ďalšej fáze projektu. Do takto pripravenej a prečistenej látky **9** bol zavedený zinočnatý kation ako centrálny kation za vzniku AzaPc **10**.



Obr. 32 H2mix: zmes 6 kongenerov s OH skupinami. Trit: zmes kongenerov po tritylácii.

Podmienky detritylácie boli vyskúšané so separovanou látkou **10** a tromi rôznymi kyselinami. Látka **10** reagovala s príslušnou kyselinou v pomere 1:2. Následne bolo vyhotovené TLC (Obr. 33).

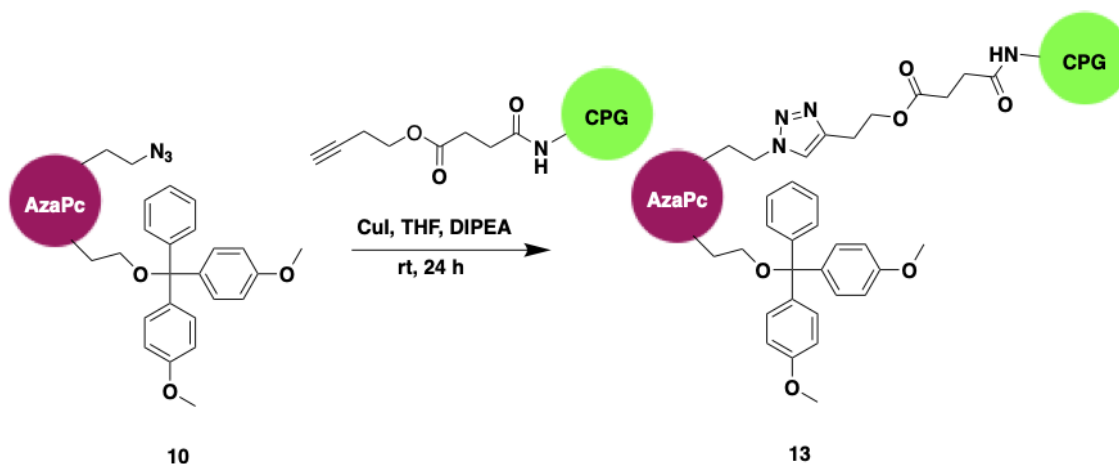
V prípade kys. trichlóroctovej reakcia prebiehala dostatočne v prospech detritylovaného produktu. Pri použití kys. trifluóroctovej alebo kys. p-toluénsulfónovej reakcia prebiehala v prospech detritilovaného produktu, ale škvrna odpovedajúca východzej látke **10** bola v oboch prípadoch intenzívnejšia ako pri použití kys. trichlóroctovej. Z tohto dôvodu bola použitá kyselina trichlóroctová na odchránenie hydroxyskupiny.



Obr. 33 TLC detritylácie pre rôzne kyseliny. a) kys. trichlóroctová, b) kys. trifluóroctová, c) kys. p-toluénsulfónová.

5.2 Syntéza ODN značených AzaPc a HPLC čistenie

Po zavedení zinočnatého katiónu do centra makrocyklu som naviazal látku **10** na pevnú fázu alkýn-CPG. Reakciou voľby bola v tomto prípade med'ou katalyzovaná azid-alkýn cykloadícia, ktorá prebieha medzi azidom látky **10** a trojnou väzbou alkýn-CPG za katalýzy CuI za vzniku triazolového cyklu medzi látkou **10** a CPG (Obr. 34). Reakcie tohto typu patria do tzv. „click“ chémie.



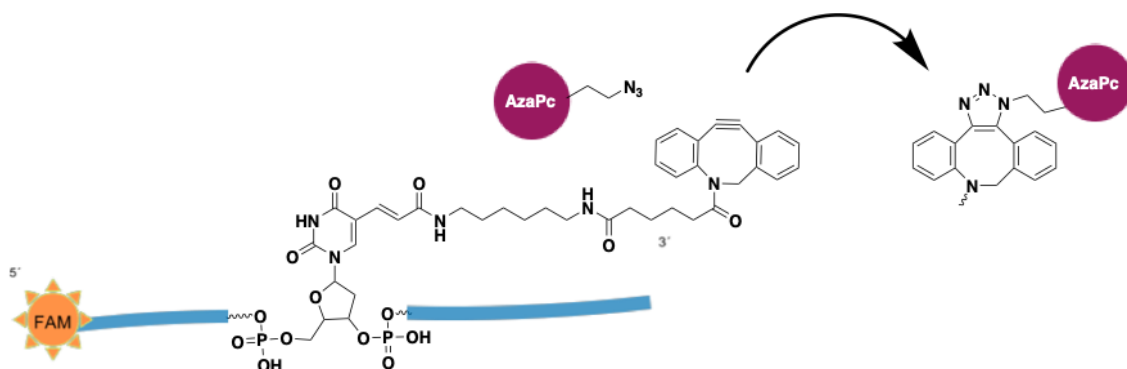
Obr. 34 Znáznornenie naviazania AzaPc na pevnú fázu.

K takto na pevnú fázu upevnenému AzaPc bol v externej firme GENERI BIOTECH prisyntetizovaný ODN reťazec v rámci automatickej syntézy v DNA/RNA syntetizátore:

5'-FAM-TCTTTTGGAAAAGTTATA[DBCodT]CTACTTACAGAAAAGTAAAT-(AzaPc-CPG)-3',

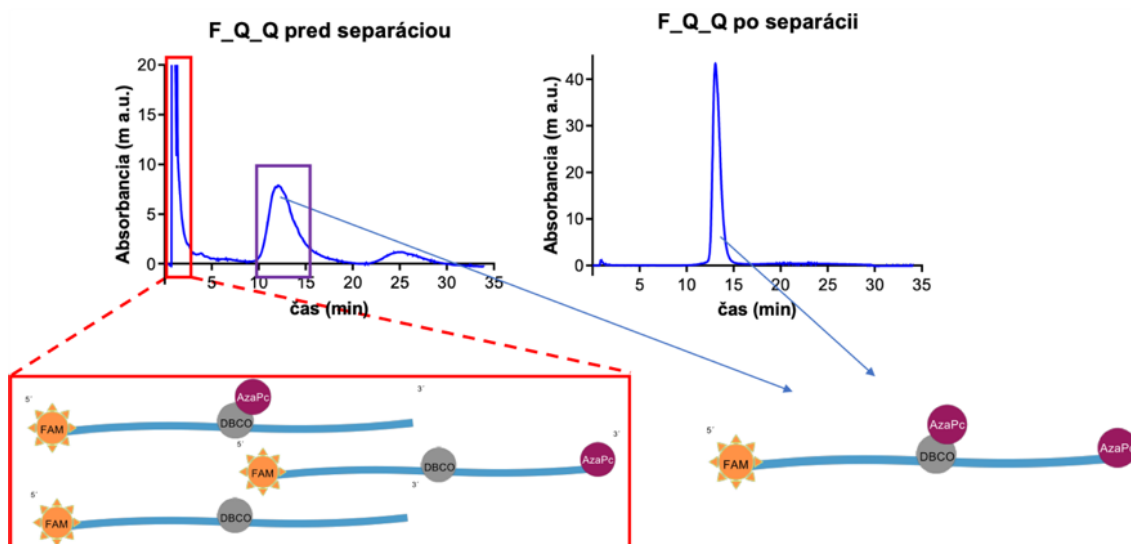
ktorý obsahoval na 5'-konci fluorofór fluoresceín a na 3'-konci zhášač **11** naviazaný na pevnej fáze viazaný cez hydroxylovú skupinu. Približne v strede ODN retazca bol dibenzoazacykloktín (DBCO), cez ktorý bol k ODN pripojený AzaPc zhášač **14**.

DBCO je molekula obsahujúca vo svojej štruktúre trojnú väzbu. Práve na túto trojnú väzbu sa viaže azid látky **14** za vzniku triazolového kruhu. Táto reakcia bola spomínaná už pri zavádzaní látky **10** na CPG, jedná sa o alkýn-azid cykloadíciu, ale v tomto prípade reakcia vďaka silnému pnutiu väzieb v DBCO prebieha samovolne, bez katalýzy CuI (Obr. 35). V prípade značenia DNA je neprítomnosť meďných iontov výhodou, pretože tie môžu ničiť DNA reťazce.



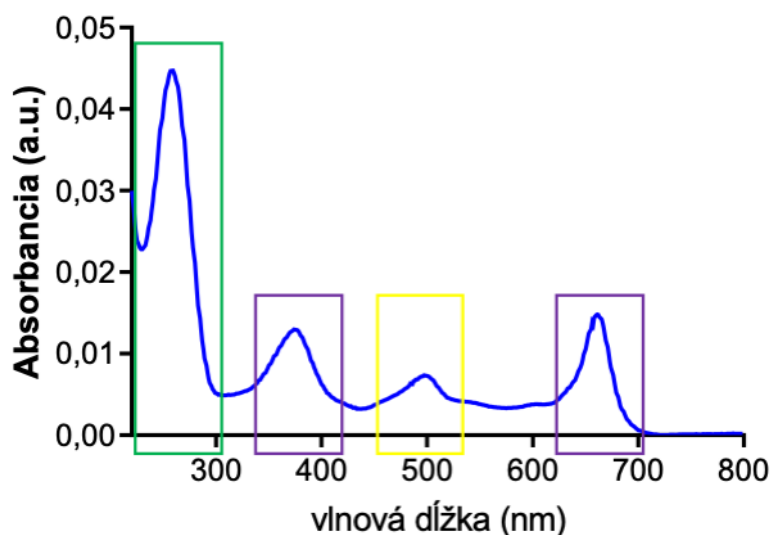
Obr. 35 Znážornenie väzby AzaPc **14** na DBCO za vzniku triazolového cyklu.

Takto pripravené sondy boli odštiepené z pevnej fáze pomocou 32% amoniaku a následne prečistené gélovou chromatografiou v kolónke (CentriPure N10) od prípadných nízkomolekulárnych nečistôt. Následne podľa absorbančie zmeranej pri 260 nm, bola určená koncentrácia, rozpúšťadlo odparené a sondy rozpustené vo vode tak, aby výsledná koncentrácia odpovedala približne 0,1-0,5 mM pre čistenie semipreparatívnym HPLC. ODN po odštiepení z pevnej fáze môžu okrem požadovaného produktu obsahovať aj nedokonale značené ODN reťazce (napr. chýbajúci zhášač alebo FAM, nedokonale vymytý zhášač použitý pre click). Pre ilustráciu uvádzam na ďalšom obrázku (Obr. 36) sondu F_Q_Q pred a po separácií (podmienky 5 mM TEAA:ACN 72:28).



Obr. 36 Znáznorenie sondy F_Q_Q pred a po HPLC. V prvom píku (červeno) sa eluujú nedokonale značené ODN (chýbajúci zhášač/FAM), v druhom píku (fialový) som odoberal žiadanú sondu F_Q_Q .

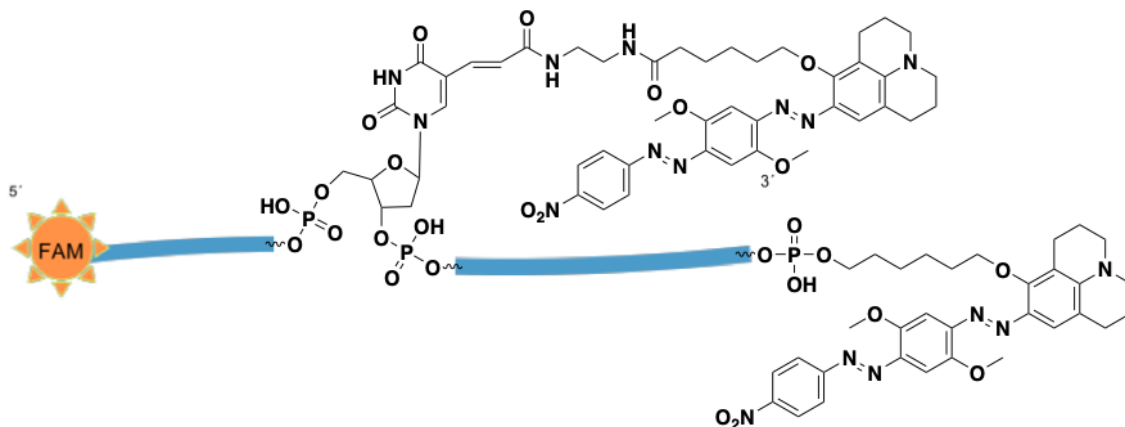
Pri HPLC bola použitá kolóna Hypersil BDS C18 (100 × 4,6 mm, veľkosť častíc 2,4 μm). Systém bol temperovaný na 40 °C a prietok nastavený na 1 ml/min. Začiatkové zloženie mobilnej fázy bolo 5 mM TEAA:ACN v pomere 65:35 a bolo upravené v priebehu delenia podľa vlastností separovanej sondy. Ako hlavný určujúci parameter pri rozhodovaní, ktorý pík v chromatograme obsahuje zvolený produkt, bolo brané do úvahy absorpčné spektrum (Obr. 37) v eluovanom píku (ODN retazec absorbuje pri 260 nm, FAM absorbuje pri 495 nm a AzaPc absorbuje vo viacerých pásech, avšak ako hlavná sa brala intenzita v oblasti Q-pásu (okolo 660 nm)).



Obr. 37 Absorpčné spektrum sondy F_Q_X , ODN (zelená) absorbuje pri 260 nm, FAM (žltá) absorbuje pri 495 nm, AzaPc (fialovo) absorbuje vo viacerých pásoch ale ako hlavný sa bral Q-pás (660 nm).

Výsledné podmienky separácie sú uvedené v kapitole 4.11.

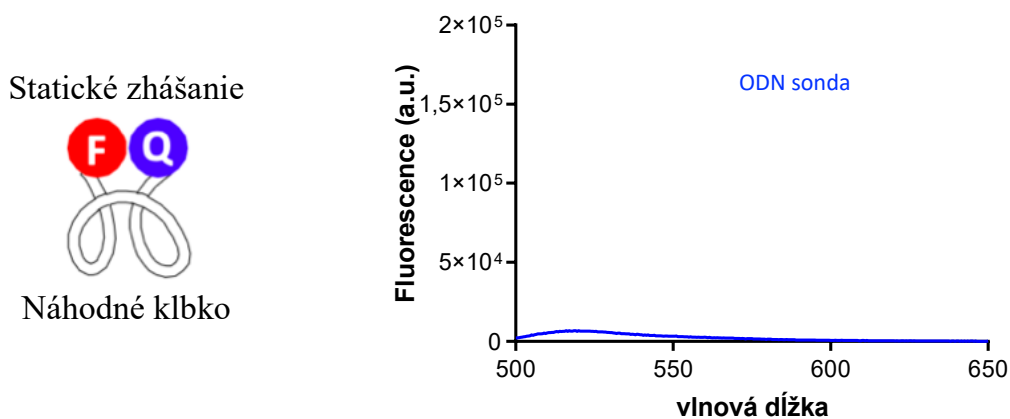
Sondy s BBQ zhášačom boli pripravené externou firmou GENERI BIOTECH. Celkovo boli pripravené tri sondy s označením F_BBQ_X, F_D_BBQ a F_BBQ_BBQ. Ich štruktúra a spôsob väzby na ODN je načrtnutý nižšie (Obr. 38). V tomto prípade som len čistil pripravené sondy pomocou HPLC.



Obr. 38 Znáznornená sonda F_BBQ_BBQ a väzba BBQ na ODN.

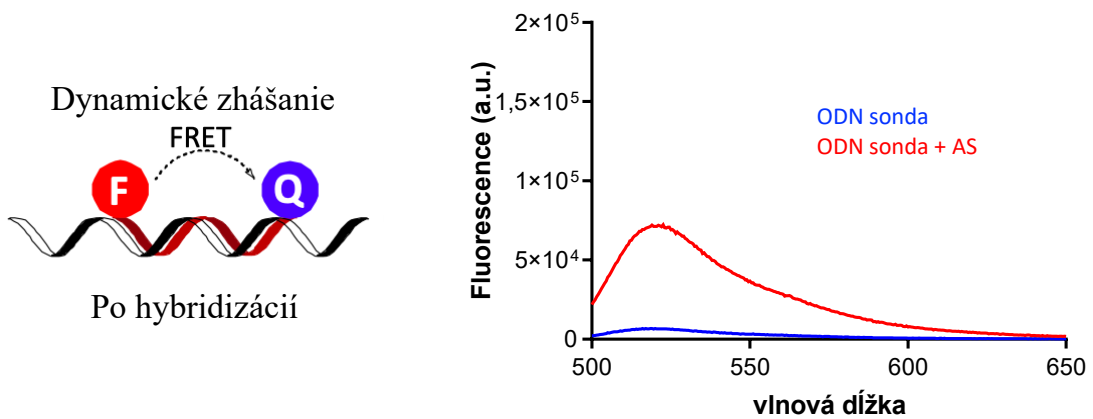
5.3 Stanovenie účinnosti zhášania

Pripravené sondy boli ďalej použité pre porovnanie účinnosti zhášania, pri ktorom sa sledoval hlavne vplyv vzdialenosti medzi fluoroforóm a zhášačom a potenciálne vyššia účinnosť pri použití dvoch zhášačov (sonda F_Q_Q). Výsledky AzaPc sond boli porovnané z komerčne dostupným BBQ zhášačom. Pri samotnom meraní účinnosti zhášania (QE, quenching efficiency) bola meraná fluorescencia hybridizačného pufru ako bazálna fluorescencia. Následne bolo do kvety pridané také množstvo sondy, aby výsledná koncentrácia odpovedala 50 nM a zmerala sa fluorescencia. ODN reťazec sondy bol v tomto okamžiku v roztoku vo forme náhodného kľbka a zhášač a fluorofór spolu interagovali na základe hydrofóbných interakcií a tvorili heterodimér (Obr. 39). Jednalo sa o statické zhášanie.



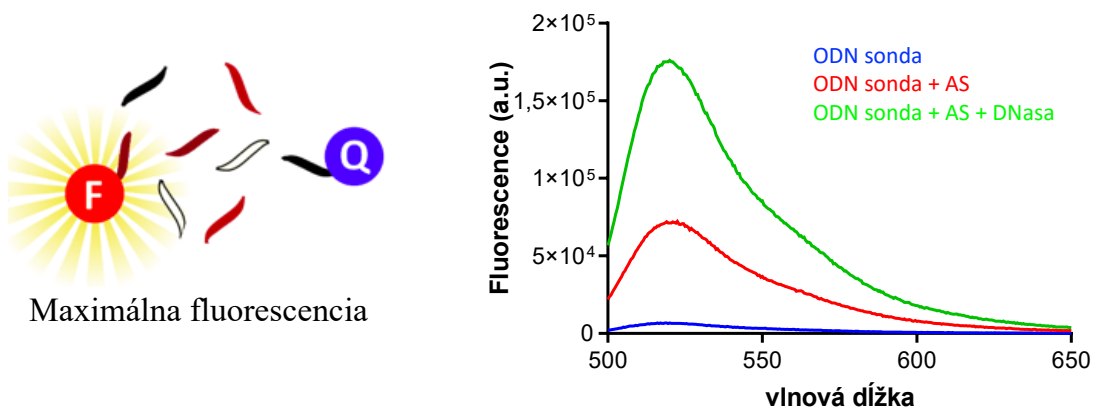
Obr. 39 Samotná sonda F_D_Q v roztoku vo forme náhodného kľbka, dochádza ku statickému zhášaniu na základe tvorby heterodiméru fluorofóru F a zhášaču Q a výsledná fluorescencia je minimálna (modrá krivka).

Po meraní samotnej sondy bol pridaný päť násobok antisense ODN o sekvencii: TCTATGTCTCATTACTTTTCTGTAAAGTAGATATAACTTTTCAAAAAGACA GTCAATTC, ktorá je komplementárna (**tučne**) k zvoleným sondám. Následne bola kviveta zahriata vo vodnej lázni na 75 °C na 10 minút a potom bez prístupu svetla chladla 30 minút, aby došlo k hybridizácii. Po vychladnutí bola meraná fluorescencia. Naviazaním sondy na antisense sa od seba vzdialil fluorofór a zhášač, ktoré už nemohli spolu priamo interagovať na základe hydrofóbnych interakcií a uplatňuje sa dynamické zhášanie, ktoré nie je také účinné ako statické preto narastá fluorescencia (Obr. 40).



Obr. 40 Po pridaní antisense AS do roztoku a následnej hybridizácii je fluorescencia tlmená dynamickým zhášaním, ktoré má však nižšiu efektivitu ako zhášanie statické. Pozorujeme nárast fluorescencie (červená krivka).

Následne bol do kvivety pridaný enzým DNasa, ktorý rozštiepal DNA reťazce na malé kúsky. Tým došlo k oddeleniu fluorofóru a zhášača od seba voľne do roztoku a vzdialenosť medzi nimi narástla natolko, že už nedochádzalo k žiadnemu zhášaniu (Obr. 41). Túto hodnotu fluorescencie potom môžeme považovať za maximálnu, ktorú môže daná sonda dosiahnuť a použiť ju následne pre výpočet účinnosti zhášania.



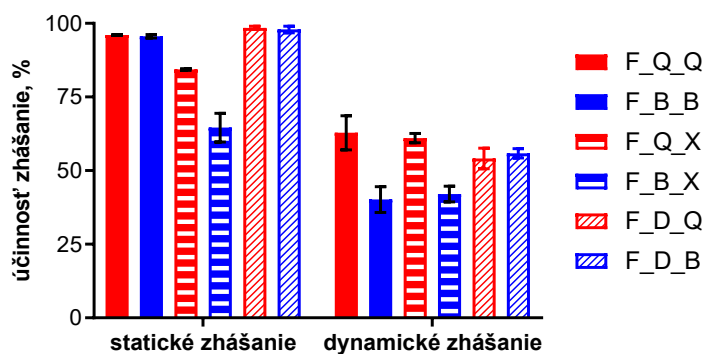
Obr. 41 Po pridaní DNasy došlo k rozštiepaniu ODN, fluorofór F a zhášač Q sa dostali voľne do roztoku, k zhášaniu nedochádza a fluorescencia dosahuje maximálnych hodnôt (zelená krivka).

Tieto merania som zopakoval trikrát pre každú sondu. Výsledné hodnoty som dosadil do vzorca a spočítal účinnosť zhášania QE:

$$QE = \left[1 - \left(\frac{F_x - F_b}{F_{max} - F_b} \right) \right] \times 100$$

v ktorom hodnote F_x odpovedala hodnota fluorescence samotnej sondy pre výpočet efektivity statického zhášania (Obr. 39) alebo hodnota po pridaní antisense pre výpočet efektivity dynamického zhášania (Obr. 40). Hodnota F_{max} odpovedala maximálnej hodnote fluorescence, ktorá bola nameraná po pridaní DNasy (Obr. 41). Hodnota F_b je hodnota bazálnej fluorescence.

Výsledné hodnoty som spracoval do grafu (Obr. 42):



Obr. 42 Výsledné hodnoty QE pre jednotlivé sondy.

Výsledky statického zhášania AzaPcs sond F_D_Q a F_Q_Q dosahujú podobných hodnôt. Sonda F_Q_X dosahuje hodnôt nižších, pravdepodobne v dôsledku horšieho priblíženia zhášača, ktorý je umiestnený v strede ODN reťazca a fluorofóru. Najnižšiu hodnotu dynamického zhášania dosiahla naopak sonda F_D_Q, čo bolo očakávané, keďže efektivita dynamického zhášania klesá so zväčšujúcou sa vzdialenosťou zhášača a fluorofóru. Sondy F_Q_Q a F_Q_X dosiahly podobných hodnôt dynamického zhášania. Sondy obsahujúce BBQ zhášač sa v rámci statického zhášania správali veľmi podobne ako v prípade sond AzaPcs. Pri dynamickom zhášaní boli výsledky prakticky porovnateľné pre všetky sondy obsahujúce BBQ, vo väčšine prípadov bolo ale zhášanie fluorescence dynamickým mechanizmom výrazne horšie ako pri AzaPcs.

6. Záver

Podnetom pre túto prácu bol článok, v ktorom boli využité trojito značené sondy (s FAM na 5'-konci, s jedným zhášačom na 3'-konci a s druhým v strede ODN reťazca) a qPCR pre kvantifikáciu deoxyribonukleosidtrifosfátov ako alternatíva k metódam využívajúcim rádioizotopy alebo chromatografické metódy.²³

Mojim cieľom bolo pripraviť trojito značenú sondu s takýmto usporiadaním zhášačov a FAM za použitia AzaPcs a porovnať efektivitu zhášania takto pripravenej trojito značenej sondy so sondou značenou dvojito a vplyv polohy zhášača na efektivitu zhášania. Vo výsledku som nasynetizoval dialkylamino substituovaný AzaPc s hydroxylovou funkčnou skupinou pre naviazanie ODN reťazca a azidovou funkčnou skupinou pre zavádzanie na pevnú fázu. Takto substituovaný AzaPc som následne aj izoloval a prečistil v systéme HPLC. Následne som úspešne pripravil trojito a dvojito značené ODN sondy a zmeral efektivitu zhášania. Hodnoty statického aj dynamického zhášania pripravených AzaPc sond dosahovali veľmi blízkych hodnôt a aj napriek tomu, že sonda značená trojito dosahovala o trochu lepších výsledkov, tak rozdiel medzi AzaPc sondami nebol naťolko výrazný, aby som mohol povedať, že mnou pripravené trojito značená AzaPc sonda je výhodnejšia ako sondy značené dvojito. Čo sa týka porovnania sond s AzaPc a sond s BBQ tak z hľadiska zhášania sa ukázali výhodnejšie AzaPc sondy. Záverom z mojej práce vyplýva, že vzhľadom k syntetickej náročnosti, nie je dôvod uprednostňovať trojito značenú AzaPc sondu pred AzaPc sondou značenou dvojito.

Výsledky mojej syntetickej práce pri príprave AzaPc boli zahrnuté do publikácie popisujúcej rôzne možnosti modifikácie ODN reťazcov, v ktorej som spoluautorom:

Demuth J, Miletin M, Machan M, **Kantor M**, Zimcik P, Novakova V, [Synthesis and J-Dimer Formation of Tetrapyrizinoporphyrazines with Different Functional Groups for Potential Biomolecular Probe Applications](#), *ChemPlusChem*, **2020**, 85, 527-537 (IF₂₀₁₈ = 3,441, Q2).

7. Použitá literatura

¹ Nováková, V.; Studium strukturních a fotofyzikálních aspektů azaftalocyaninů se zaměřením na jejich senzorní vlastnosti, Habilitační práce. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Hradec Králové 2014.

² Nováková, V.; Donzello, M. P.; Ercolani, C.; Zimčík, P.; Stuzhin, P. A.; Tetrapyrazinoporphyrazines and their metal derivatives. Part II: Electronic structure, electrochemical, spectral, photophysical and other application related properties, *Coord. Chem. Rev.*, **2018**, *361*, 1-73.

³ Zimčík, P.; Azaftalocyaniny – Od syntéz přes fotochemické a fotofyzikální vlastnosti k aplikacím, *Chem. Listy*, **2012**, *106*, 275-282.

⁴ McKeown, N. B.; *Phthalocyanine Materials: Synthesis, Structure and Function* 1.vyd., Cambridge University Press, Cambridge 1998. ISBN 9780521496230

⁵ Wöhrle, D.; Schnurpfeil, G.; Makarov, G. S.; Kazarin, A.; Suvorova, N. O.; Practical Applications of Phthalocyanines – from Dyes and Pigments to Materials for Optical, Electronic and Photo-electronic Devices, *Macroheterocycles*, **2012**, *5*, 191-202.

⁶ Kwiatkowski, S.; Knap, B.; Przystupski, D.; Saczko, J.; Kędzierska, E.; Knap-Czop, K.; Kotlińska, J.; Michel, O.; Kotowski, K.; Kulbacka, J.; Photodynamic therapy - mechanisms, photosensitizers and combinations, *Biomed. Pharmacother.*, **2018**, *106*, 1098-1107.

⁷ Nováková, V.; Zimčík, P.; Miletin, M.; Váchová, L.; Kopecký, K.; Lang, K.; Chábera, P.; Polívka, T.; Ultrafast intramolecular charge transfer in tetrapyrazinoporphyrazines controls the quantum yields of fluorescence and singlet oxygen, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2010**, *12*, 2555-2563.

⁸ Nováková, V.; Lochman, L.; Zajícová, I.; Kopecký, K.; Miletín, M.; Lang, K.; Kirakci, K.; Zimčík, P.; Azaphthalocyanines: Red Fluorescent Probes for Cations, *Chem. - Eur. J.*, **2013**, *13*, 5025-5028.

⁹ Demuth, J.; Kučera, R.; Kopecký, K.; Havlínová, Z.; Libra, A.; Nováková, V.; Miletín, M.; Zimčík, P.; Efficient Synthesis of a Wide-Range Absorbing Azaphthalocyanine Dark Quencher and Its Application to Dual-Labeled Oligonucleotide Probes for Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reactions, *Chem. - Eur. J.*, **2018**, *24* (38), 9658-9666.

¹⁰ <https://www.generi-biotech.com/products/bbq650/> [stiahnuté 16.4.2020]

¹¹ <https://www.generi-biotech.com/products/bhq1/> [stiahnuté 16.4.2020]

¹² <https://www.generi-biotech.com/products/bhq2/> [stiahnuté 16.4.2020]

¹³ <http://www.generi-biotech.com/cs/produkty/bhq3/> [stiahnuté 16.4.2020]

¹⁴ <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/Q10193?CID=AFLBC-Q10193#/Q10193?CID=AFLBC-Q10193> [stiahnuté 16.4.2020]

¹⁵ Kopecký, K.; Nováková, V.; Miletín, M.; Kučera, R.; Zimčík, P.; Solid-Phase Synthesis of Azaphthalocyanine-Oligonucleotide Conjugates and Their Evaluation As New Dark Quenchers of Fluorescence, *Bioconjugate Chem.*, **2010**, *21* (10), 1872-1879.

¹⁶ Kopecký, K.; Nováková, V.; Miletín, M.; Kučera, R.; Zimčík, P.; Synthesis of new azaphthalocyanine dark quencher and evaluation of its quenching efficiency with different fluorophores, *Tetrahedron*, **2011**, *67* (33), 5956-5963.

¹⁷ Murray, R. K.; Granner, D. K.; Mayes, P. A.; Rodwell, V. W.; *Harpers Illustrated Biochemistry*, 26. vyd., The McGraw-Hill Companies, New York, 2003.

-
- ¹⁸ Zhang, H.; Li, F.; Dever, B.; Li, X.; Le, X. Ch.; DNA-Mediated Homogeneous Binding Assays for Nucleic Acids and Proteins, *Chem. Rev.*, **2013**, *113* (4), 2812-2841.
- ¹⁹ Leckband, D.; Measuring the Forces that Control Protein Interactions, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **2000**, *29*, 1-26.
- ²⁰ Liu, J.; Cao, Z.; Lu, Y.; Functional Nucleic Acid Sensors, *Chem. Rev.*, **2009**, *109* (5), 1948-1998.
- ²¹ Tsybulsky, D. A.; Kvach, M. V.; Ryazantsev, D. Y.; Aparin, I. O.; Stakheev, A. A.; Prokhorenko, I. A.; Martynenko, Y. V.; Gontarev, S. V.; Formanovsky, A. A.; Zatsëpin, T. S.; Shmanai, V. V.; Korshun, V. A.; Zavriev, S. K.; Molecular beacons with JOE dye: Influence of linker and 3' couple quencher, *Mol. Cell. Probes*, **2016**, *30* (5), 285-290.
- ²² Ryazantsev, D. Y.; Kvach, M. V.; Tsybulsky, D. A.; Prokhorenko, I. A.; Stepanova, I.A.; Martynenko, Y. V.; Gontarev, S. V.; Shmanai, V. V.; Zavriev, S. K.; Korshun, V. A.; Design of molecular beacons: 3' couple quenchers improve fluorogenic properties of a probe in real-time PCR assay, *Analyst*, **2014**, *139* (11), 2867-2872.
- ²³ Wilson, P. M.; Labonte, M. J.; Russell, J.; Louie, S.; Ghobrial, A. A.; Ladner, R. D.; A novel fluorescence-based assay for the rapid detection and quantification of cellular deoxyribonucleoside triphosphates, *Nucleic Acids Res.*, **2011**, *39* (17), e112.
- ²⁴ Kopecký, K.; Azaftalocyaniny jako nová skupina zhášečů fluorescence, Disertační práce. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Hradec Králové 2008.
- ²⁵ Huang, Q.; Liu, Z.; Liao, Y.; Chen, X.; Zhang, Y.; Li, Q.; Multiplex Fluorescence Melting Curve Analysis for Mutation Detection with Dual-Labeled, Self-Quenched Probes, *PLoS One*, **2011**, *6* (4), e19206.

²⁶ Demuth, J.; Miletín, M.; Machan, M.; Kántor, M.; Zimčík, P.; Nováková, V.; Synthesis and J-Dimer Formation of Tetrapyrazinoporphyrazines with Different Functional Groups for Potential Biomolecular Probe Applications, *ChemPlusChem*, **2020**, *85* (3), 527-537.