

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ



KATEDRA FARMACEUTICKÉ CHEMIE A FARMACEUTICKÉ ANALÝZY

DISERTAČNÍ PRÁCE

**STUDIE V OBLASTI FTALOCYANINŮ A
TETRAPYRAZINOPORFYRAZINŮ – PŘÍPRAVA,
VLASTNOSTI A POTENCIÁLNÍ BIOLOGICKÉ VYUŽITÍ.**

Mgr. Michaela Beranová

Vedoucí práce: doc. PharmDr. Miroslav Miletín, Ph.D.

Hradec Králové, 2024

Prohlášení

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně pod vedením svého školitele. 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, 2024

Mgr. Michaela Beranová

Poděkování

Ráda bych na tomto místě poděkovala všem lidem, kteří mi pomohli při mém studiu a při sepisování této práce.

Děkuji svému školiteli doc. PharmDr. Miroslavu Miletínovi, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady, veškerou pomoc během studia a především životní nadhled. Prof. PharmDr. Petru Zimčíkovi, Ph.D. a doc. PharmDr. Veronice Novákové, Ph.D. patří rovněž velký dík za odborné vedení a velkou spoustu zážitků, ale hlavně rad i úkolů, které mě posunuly dál v mé profesní kariéře.

Za finanční podporu této disertační práce děkuji těmto grantům a projektům Grantové agentury České republiky (GAČR: 17-19094S, 18-08169S, 21-14919J) a Univerzity Karlovy (Specifický vysokoškolský výzkum - SVV 260 547, 260 401, projekt Primus 20/SCI/013, projekt START CZ.02.2.69/0.0/0.0/19_073/0016935).

Za změření dat děkuji následujícím pracovníkům: PharmDr. Janě Křoustkové, Ph.D. a doc. PharmDr. Jiřímu Kunešovi, CSc. (NMR spektra), Ivě Vencovské (IČ spektra), prof. PharmDr. Lucii Novákové, Ph.D. (HRMS spektra). Mgr. Veronice Bačkovské z Generi Biotech děkuji za syntézu a odpar oligonukleotidů.

Velký dík patří mým milujícím rodičům, Jarušce a Danovi Beranovým, kteří mě vždy povzbuzovali, rozesmávali a vždy stáli při mně.

Nemenší uznání patří také naší partě na Katedře farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy, jmenovitě pak PharmDr. Jiřímu Demuthovi, Ph.D., PharmDr. Filipu Kostelanskému, Ph.D., Mgr. Lucii Rychvalské, PharmDr. Janu Kollárovi, Ph.D., PharmDr. Nele Váňové, Ph.D. a PharmDr. Lukášovi Lochmannovi, Ph.D. za souputnictví na trnité cestě a spoustu neuvěřitelných historek.

Dále pak PharmDr. Martě Kučerové, Ph.D. a doc. PharmDr. Radimu Kučerovi, Ph.D. za jejich skvělé přátelství a oporu. A mým adoptivním dětičkám M.Sc. Mary Angelie Alfréd, Mgr. Janě Lapešové, Mgr. Štefanu Bednárikovi, Mgr. Danu Mikulovi, M.Sc. Giulii Sperduti, Angele Vidale a Mgr. Petře Grossové, kteří mě toho hodně naučili, především pak shovívavosti a trpělivosti.

Speciální dík patří PharmDr. Barboře Vítovcové, Ph.D. za její přátelství neznající hranic a za to, že mě naučila ocenit víno.

Nakonec děkuji svému milujícímu partnerovi RNDr. Ondřeji Horáčkovi, Ph.D. za nekonečné pochopení, lásku a péči, kterou mi dává každý den.

Abstrakt

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy

Kandidát: Mgr. Michaela Beranová

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

Název: Studie v oblasti ftalocyaninů a tetrapyrazinoporfyrasinů – příprava, vlastnosti a potenciální biologické využití.

Ftalocyaniny (Pc) a od nich odvozené tetrapyrazinoporfyrasiny (TPyzPz) jsou už téměř jedno století předmětem rozsáhlého výzkumu v různých oblastech vědy. Makrocyclus s 18 π -elektronovým systémem konjugovaných dvojných vazeb je nositelem velmi zajímavých fotofyzikálních a fotochemických vlastností. Jimi jsou vysoká absorpce, fluorescenční emise v oblasti blízkého infračerveného záření (600–850 nm) a alternativní způsoby uvolnění excitovaného stavu energie, například produkce singletového kyslíku nebo intramolekulární přenos náboje. Tyto charakteristiky a jejich extrémně přesné ladění díky rozmanité a jednoduše připravitelné struktuře učinily z Pc a TPyzPz vhodné adepty na uplatnění v elektrotechnice, materiálovém průmyslu či medicíně. Ovšem ať už se jedná o fotodynamickou terapii nádorových a infekčních onemocnění nebo vývoj hybridizačních sond, stále se u nich projevují nežádoucí vlastnosti omezující jejich potenciální využití. Těmi jsou především nízká rozpustnost ve vodě a silná agregace ve většině rozpouštědel. Výzkumem těchto látek a jejich vlastností se zabývá i tato disertační práce, která tak navazuje na předchozí výzkum, studia a dlouholeté zkušenosti naší výzkumné skupiny AzaPc group.

Úvodní část je věnována přípravě křemičitých TPyzPz pomocí templátové a inzerční metody. Studuje vliv periferní substituce na podmínky syntézy a dále se zabývá i možností axiální substituce připravených komplexů.

Další část diskutuje problematiku stability centrálního kationtu hořčnatých komplexů Pc a TPyzPz. Zkoumá detaily mechanismu demetalace a přesný průběh s ohledem na podmínky prostředí molekuly. Kromě popisu rozdílu vlivu polárního a nepolárního rozpouštědla a kyselého prostředí, zkoumá i možnosti protekce molekul pomocí různých formulací (mikroemulze a lipozomy).

Třetí část se zabývá světlem indukovaného rozrušení lipozomů a řízeným uvolněním léčiva z jejich kavity pomocí fotosenzitizerů z rodiny zinečnatých a hlinitých komplexů Pc. Zkoumá vlastnosti molekul (velikost, charakter periferní substituce a schopnost produkce singletového kyslíku) na možnost interkalovat se do lipidové dvojvrstvy různých druhů připravených lipozomů a na schopnost řízeného uvolňování jejich obsahu.

V poslední části se tato práce zabývá post-syntetickou přípravou konjugátů organických molekul typu TPyzPz, BODIPY, akridinu a indocyaninu s oligonukleotidovým řetězcem (ON) pomocí strukturním napětím podporované azid-alkynové cykloadice (SPAAC). Porovnává kombinace tří parametrů této reakce (koncentrace značících roztoků, pozice modifikace na ON a použití různých pevných fází při syntéze ON). To je možné, neboť SPAAC dovoluje průběhu značení ihned po syntéze ON, tedy před odštěpením z pevné fáze a deprotekcí řetězce. Tím se vyhýbá obvykle nutné a zdlouhavé precipitaci z roztoku a purifikaci pomocí HPLC, což zvyšuje potenciální využití této metody v praxi.

Abstract

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmaceutical Chemistry and Pharmaceutical Analysis

Candidate: Mgr. Michaela Beranová

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

Title: Studies on phthalocyanines and tetrapyrizinoporphyrazines – preparation, properties and potential biological applications.

Phthalocyanines (Pc) and their derivatives, tetrapyrizinoporphyrazines (TPyzPz), have been the subject of extensive research in various fields of science for almost a century. The macrocycle with its 18 π -electron conjugated double bond system carries very interesting photophysical and photochemical properties. These are high absorption and fluorescence emission in the near-infrared region (600 – 850 nm) and alternative ways of excited state energy release such as singlet oxygen production or fast intramolecular charge transfer. These characteristics and their extremely precise tuning due to their diverse but easy-to-prepare structures have made Pc and TPyzPz suitable candidates for applications in electrical engineering, materials industry, or medical disciplines. However, whether for photodynamic therapy of cancer and infectious diseases or the development of hybridization probes, they still exhibit undesirable properties that limit their potential applications. These are mainly low solubility in water and strong aggregation in most solvents. The research of these substances and their properties is also the subject of this dissertation, which builds on previous research, studies and long-standing experience of our AzaPc group.

The first section is devoted to the preparation of silica TPyzPz by template and complexation methods and the influence of peripheral substitution on the synthesis conditions. The possibility of axial substitution of the prepared complexes is also discussed.

The second part describes the problem of stability of the central cation of magnesium complexes Pc and TPyzPz. It examines the details of the demetallation mechanism and the exact progression with respect to the environmental conditions of the molecule. In addition to describing the difference in the effect of polar and non-polar solvent and acidic conditions, it also explores the possibility of protecting the molecules using different formulations (microemulsions and liposomes).

The third part deals with light-induced disruption of liposomes and controlled drug release from their cavity by photosensitizers from the Pc family of zinc and aluminum complexes. It investigates the properties of the molecules (size, nature of peripheral substitution and ability to produce singlet oxygen) on the ability to intercalate into the lipid bilayer of different types of prepared liposomes and on the ability of controlled release of their contents.

In the last part, this work deals with the post-synthetic preparation of conjugates of organic molecules such as TPyzPz, BODIPY, acridine and indocyanine with oligonucleotide chain (ON) by structural strain promoted azide-alkyne cycloaddition (SPAAC). It compares combinations of three parameters of this reaction (concentration of labeling solutions, position of modification on ON, and use of different solid phases in ON synthesis). This is possible because SPAAC allows the labeling process to proceed immediately after ON synthesis, i.e., before chain cleavage and deprotection. This avoids the usually necessary and lengthy precipitation from solution and purification by HPLC, increasing the potential use of this method in practice.

Obsah

1	Seznam zkratk	14
2	Úvod	16
3	Současný stav poznání dané problematiky	17
3.1	Ftalocyaniny a azaftalocyaniny	17
3.1.1	Struktura a příprava	17
3.1.2	Vlastnosti	22
3.2	Využití ftalocyaninů a tetrapyrazinoporfyrazinů	26
3.2.1	Fotosenzitizéry ve fotodynamické terapii	27
3.2.2	Barviva v <i>in vitro</i> a <i>in vivo</i> diagnostice	29
3.3	Lipozomy a uvolňování jejich obsahu	30
3.4	Příprava modifikovaných oligonukleotidů	31
3.4.1	Syntéza oligonukleotidů	31
3.4.2	Modifikace oligonukleotidů	32
3.5	Click chemie	33
4	Cíl disertační práce	35
5	Experimentální část	36
5.1	Studium syntézy periferně substituovaných křemičitých komplexů tetrapyrazinoporfyrazinů	37
5.1.1	Metoda inzerce	37
5.1.2	Axiální modifikace	39
5.1.3	Fotofyzikální monitoring inzerčních reakcí	39
5.2	Studium stability hořčnatých komplexů ftalocyaninů a tetrapyrazinoporfyrazinů v kyselém prostředí	39
5.2.1	Příprava pufrů ve vodě rozpustných vzorků a hodnocení stability komplexů	40

5.2.2	Spektrální měření v organickém rozpouštědle, příprava vzorků a hodnocení stability komplexů	40
5.2.3	Příprava mikroemulzí a hodnocení stability komplexů	41
5.2.4	Příprava lipozomů a hodnocení stability komplexů	41
5.3	Studium vlastností ftalocyaninových fotosenzitizérů při světlem indukovaném uvolňování lipozomálního obsahu	42
5.3.1	Fotosenzitizéry.....	42
5.3.2	Lipozomy.....	43
5.3.3	Studium inkorporace fotosenzitizérů do lipozomů.....	44
5.3.4	Uvolnění lipozomálního obsahu světelnou indukcí.....	44
5.3.5	Fotodegradace fotosenzitizérů inkorporovaných do lipozomů.....	45
5.4	Studium efektivity azid-alkynové cykloadice při modifikaci oligonukleotidů	45
5.4.1	Syntéza oligonukleotidů	45
5.4.2	Značení a deprotektce	46
5.4.3	Chromatografické podmínky	47
6	Výsledky a diskuze.....	49
6.1	Studium syntézy periferně substituovaných křemičitých komplexů tetrapyrazinoporfyrasinů	49
6.1.1	Templátová metoda	50
6.1.2	Inzerce křemičitých kationtů do bezkovových tetrapyrazinoporfyrasinů	51
6.1.3	Axiální modifikace	55
6.2	Studium stability hořčnatých komplexů ftalocyaninů a tetrapyrazinoporfyrasinů v kyselém prostředí.....	57
6.2.1	Demetalace v organickém rozpouštědle	59
6.2.2	Demetalace v polárním prostředí a nosičových systémech	62

6.3	Studium vlastností fotosenzitizérů při světlem indukovaném uvolňování lipozomálního obsahu	66
6.3.1	Fotosenzitizéry	67
6.3.2	Lipozomy a kargo.....	70
6.3.3	Interakce fotosenzitizérů s lipozomy.....	71
6.3.4	Uvolňování indukované světlem.....	74
6.4	Studium efektivity azid-alkynové cykloadice při modifikaci oligonukleotidů	79
6.4.1	Značení oligonukleotidů.....	80
6.4.2	Analýza a vyhodnocování	83
6.4.3	Výsledky značení	87
7	Závěr	93
8	Seznam publikovaných vědeckých a odborných prací	95
8.1	Články v impaktovaných časopisech	95
8.2	Ústní prezentace	95
8.3	Plakátová sdělení.....	96
9	Granty	97
9.1	Hlavní řešitelka	97
9.2	Členka výzkumného týmu.....	97
10	Stáže, ocenění a další profesní zkušenosti	98
10.1	Výzkumná stáž	98
10.2	Obdržená ocenění	98
10.3	Odborné kurzy	98
10.4	Profesní členství	98
11	Reference	99

1 Seznam zkratek

- AAC azid-alkynová cykloadice
- AzaPc azaftalocyanin (z angl. Azaphthalocyanine)
- BO14 akridinová oranž zásaditá (z angl. Basic orange 14)
- BODIPY 4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen (z angl. Boron dipyrromethene)
- CPG skleněná pevná fáze (z angl. Controlled pore glass)
- CuAAC azid-alkynová cykloadice katalyzovaná mědnými kationty (z angl. Copper-catalyzed azide-alkyne cycloaddition)
- Cy5 Cyanine 5
- DBCO 11,12-didehydro-5,6-dihydrodibenz[b,f]azocin (triviálně Dibenzoazacyklooktyn)
- DBU 1,8-diazabicyklo[5,4,0]undec-7-en
- DCA kyselina dichloroctová (z angl. Dichloroacetic acid)
- DCM dichlormethan
- DCP 5,6-dichlorpyrazin-2,3-dikarbonitril
- DDS nosičový systém (z angl. Drug delivery system)
- DMSO dimethylsulfoxid
- DOPC dioleoylfosfatidylcholin (z angl. Dioleoylphosphatidylcholine)
- DOX doxorubicin hydrochlorid
- DPBF 1,3-difenyliisobenzofuran
- EGFR receptor pro epidermální růstový faktor (z angl. Epidermal growth factor receptor)
- ekv. ekvivalent
- EMA Evropská léková agentura (z angl. European Medicine Agency)
- FAM 6-karboxyfluorescein
- FDA Úřad pro kontrolu potravin a léčiv (z angl. Food and Drug Agency)
- HPLC vysokoúčinná kapalinová chromatografie (z angl. High performance liquid chromatography)
- HRMS hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením (z angl. High resolution mass spectrometry)
- ICT intramolekulární přenos náboje (z angl. Intramolecular charge transfer)
- IR infračervená spektroskopie (z angl. Infrared spectroscopy)
- ISC mezisystémový přechod (z angl. Intersystem crossing)
- LCAA-CPG kontrolovaně porézní sklo modifikované dlouhým alkylaminovým spojovacím řetězcem (z angl. Long chain alkylamino linker controlled pore glass)

LUVET extrakční příprava velkých unilamelárních vezikul (z angl. Large unilamellar vesicles extrusion technique)

MALDI-TOF Matricí asistovaná laserová desorpce/ionizace-doba letu (z angl. Matrix-assisted laser desorption ionization-Time of flight)

MGB molekuly vážící se do malého žlábků DNA (z angl. Minor Groove Binders)

MeOH methanol

MLV multilamelární vezikuly (z angl. Multilamellar vesicles)

NMR nukleární magnetická rezonance

ON oligonukleotid (z angl. Oligonucleotide)

PBS fosfátový pufr (z angl. Phosphate buffer saline)

Pc ftalocyanin (z angl. Phthalocyanine)

PDT fotodynamická terapie (z angl. Photodynamic therapy)

Ph. Eur. Evropský lékopis (z angl. European Pharmacopoeia)

Ps fotosenzitizér (z angl. Photosensitizer)

PS polystyren

qPCR kvantitativní polymerázová řetězcová reakce (z angl. quantitative Polymerase Chain Reaction, případně quantitative real-time PCR)

ROS reaktivní formy kyslíku (z angl. Reactive oxygen species)

RuAAC azid-alkynová cykloadice katalyzovaná ruthnatými kationty (z angl. Ruthenium-catalyzed azide-alkyne cycloaddition)

rt pokojová teplota (z angl. Room temperature)

SEC gelové chromatografie (z angl. Size exclusion chromatography)

SPAAC vnitřním pnutím podporovaná azid-alkynová cykloadice (z angl. Strain promoted azide-alkyne cycloaddition)

TEAA triethylamonium acetát

TCA kyselina trichloroctová (z angl. Trichloroacetic acid)

TFA kyselina trifluoroctová (z angl. Trifluoroacetic acid)

THF tetrahydrofuran

TLC tenkovrstvá chromatografie (z angl. Thin layer chromatography)

TLC-MS tenkovrstvá chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií (z angl. Thin layer chromatography – Mass spectrometry)

TPyzPz tetrapyrazinoporfyrazin (z angl. Tetrapyrazinoporphyrin)

ZnPc nesubstituovaný zinečnatý ftalocyanin (z angl. Zinc Phthalocyanine)

2 Úvod

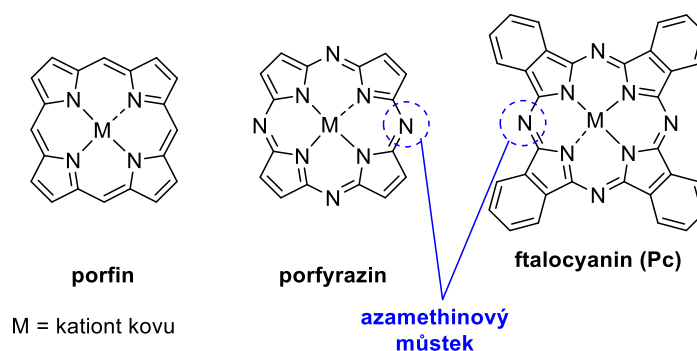
Ftalocyaniny (Pc) a příbuzné látky odvozené od porfinu jsou zkoumány v mnoha technických i biomedicínských oborech již po mnoho let. Struktura obsahující 18 delokalizovaných π -elektronů se vyznačuje unikátními fotofyzikálními a fotochemickými vlastnostmi,¹ díky kterým jsou Pc zkoumány po řadu let již od prvních zmínek v literatuře z počátku 20. století.²⁻⁴ Výrazná fluorescence, fotodynamický potenciál a možnost vnitřního přenosu náboje z nich činí nepostradatelnou součást fotodynamické terapie (PDT),⁵ senzorů pro detekci kationtů kovů⁶ a pH⁷ nebo zhášení fluorescence. Přítomnost rozsáhlého elektronového systému π vazeb ve struktuře má ovšem za následek i jejich nežádoucí vlastnosti jako například silné intermolekulární interakce, které jsou příčinou jejich zvýšené agregace. Další nevýhodou je špatná rozpustnost v polárních rozpouštědlech a nízká výtěžnost v případě přípravy asymetrických Pc. Přestože již bylo připraveno velké množství sloučenin charakteru Pc a jejich dusíkatých analogů, existuje v této oblasti řada výzev a možností, jak zlepšit vlastnosti připravovaných molekul a tím zlepšit jejich stávající aplikace nebo umožnit zcela nové využití.

3 Současný stav poznání dané problematiky

3.1 Ftalocyaniny a azaftalocyaniny

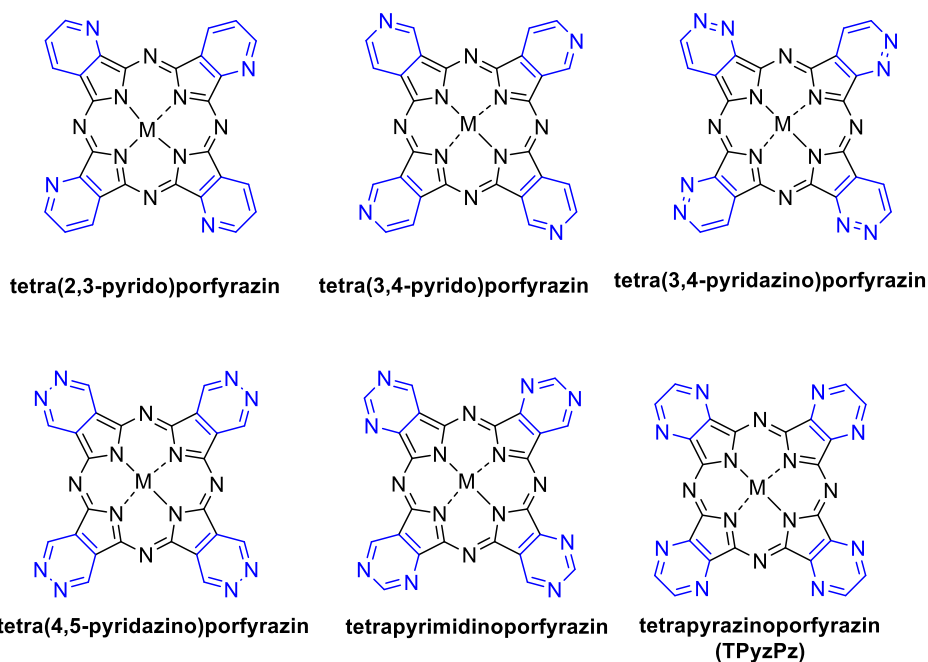
3.1.1 Struktura a příprava

Ftalocyaniny (Pc, z angl. Phthalocynines) jsou organické planární makrocyclické molekuly s rozsáhlým systémem konjugovaných vazeb. Řadí se mezi porfyriziny, jež vychází ze struktury cyklotetrapyrrolového porfinu izosterní záměnou methinového můstku za atom dusíku a vzniku **azamethinového přemostění** (obr. 1).⁸ Tyto a odvozené sloučeniny získaly svoji nezastupitelnou roli v mnoha metabolických procesech díky schopnosti koordinovat kationty kovů, což dokazují významní zástupci metaloporfirů jako hem, chlorofyl nebo kobalamin, které jsou esenciálními funkčními molekulami živých systémů.



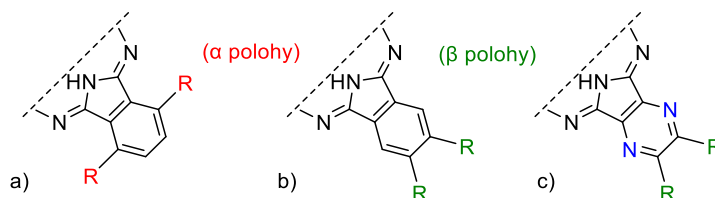
Obrázek 1 Struktury obecných makrocyclů založených na porfinovém jádře.

Pc jsou vyšším homologem porfyrizinů, jejichž struktura vznikla přikondenzováním benzenových jader k jeho pyrrolovým jednotkám. Pokud je kterýkoliv methinový atom ve skeletu Pc izosterně nahrazen dusíkem, hovoříme o tzv. azaftalocyaninech (AzaPc, z angl. Azaphthalocyanines). Na základě polohy a počtu těchto dusíků v jádře rozlišujeme několik strukturních derivátů AzaPc – tetrapyridoporfyriziny, tetrapyridazoporfyriziny, tetrapirimidoporfyriziny, a **tetrapyrizinoporfyriziny** (TPyzPz, z angl. Tetrapyrizinoporphyrazines) (obr. 2). v naší vědecké skupině AzaPc group jsou předmětem výzkumu především Pc a TPyzPz na něž byla zaměřena i tato disertační práce.



Obrázek 2 Strukturní typy AzaPc.

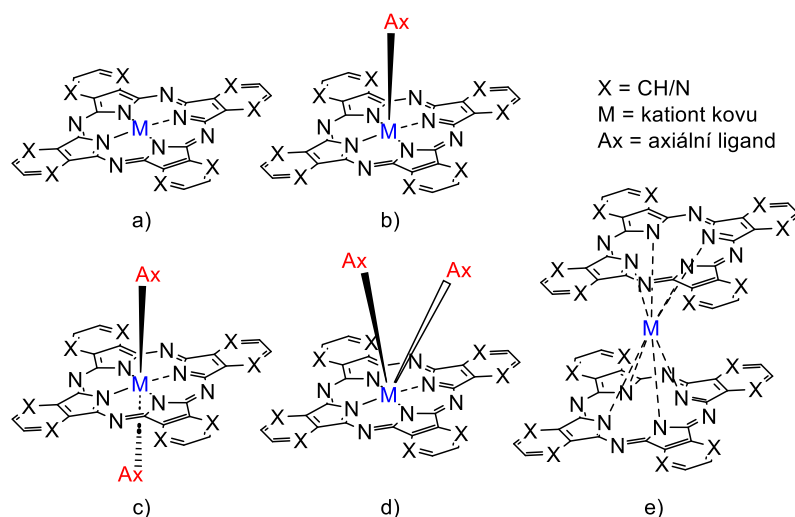
Základní skelet těchto makrocyclů na sobě může nést další substituenty, které mohou velmi jemně upravovat výsledné fyzikálně-chemické a rovněž fotofyzikální vlastnosti celé molekuly. U Pc rozlišujeme na benzenovém jádře dvě základní polohy substituentů, těmi jsou neperiferní (α poloha) a periferní (β poloha) (obr. 3a,b). TPyzPz lze modifikovat pouze v periferních polohách (obr. 3c).



Obrázek 3 Polohy substituce a) neperiferní (α) u Pc, b) periferní (β) u Pc, c) periferní (β) u TPyzPz.

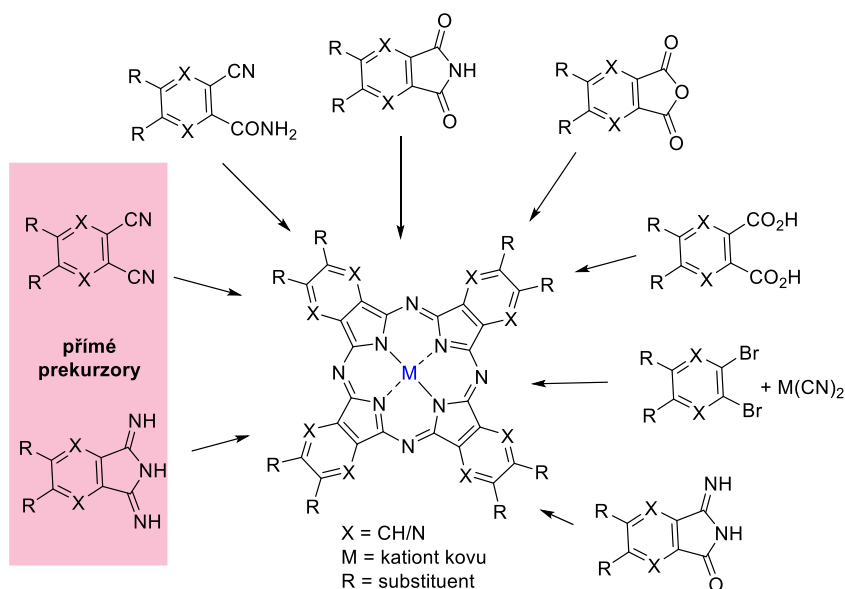
Naopak do svého jádra mohou koordinačně vázat různé ionty kovů i nekovů, které díky své velikosti a hmotě ovlivňují nejen zakřivení roviny makrocyclu, a tedy i míru agregace, ale i cesty relaxace excitovaných makrocyclů (viz dále). Nejběžnější jsou planární komplexy s dvojmocnými kationty kovů (Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} nebo Zn^{2+}) (obr. 4a). Komplexy s vysoce valentními kovy, např. Ti, V, Cr, Mn, Fe, Al, Ga, In, Si, Ge, Ru, obsahující jeden nebo více axiálně koordinujících ligandů zavádějí do struktury třetí rozměr. Axiální vazby pak otevírají možnost další funkcionalizace struktury Pc a TPyzPz pro širší aplikace a bez nutnosti syntetizovat asymetrické makrocycly (viz dále).

V závislosti na vaznosti a velikosti iontů kovů pak vznikají různé typy axiální substituce. Jedná se buď o monoaxiální komplexy nesoucí jeden anionický substituent⁹ (obr. 4b) nebo diaxiální komplexy u nichž se rozlišuje *cis* a *trans* uspořádání^{10, 11} (obr. 4c,d). Koordinovat se ale mohou i vícevalentní kovy, jež přijímají až čtyři axiální ligandy.¹² Navíc se u kationtů kovů větších než centrální kavita makrocyklu setkáváme s tzv. sendvičovými komplexy¹³ (obr. 4e).



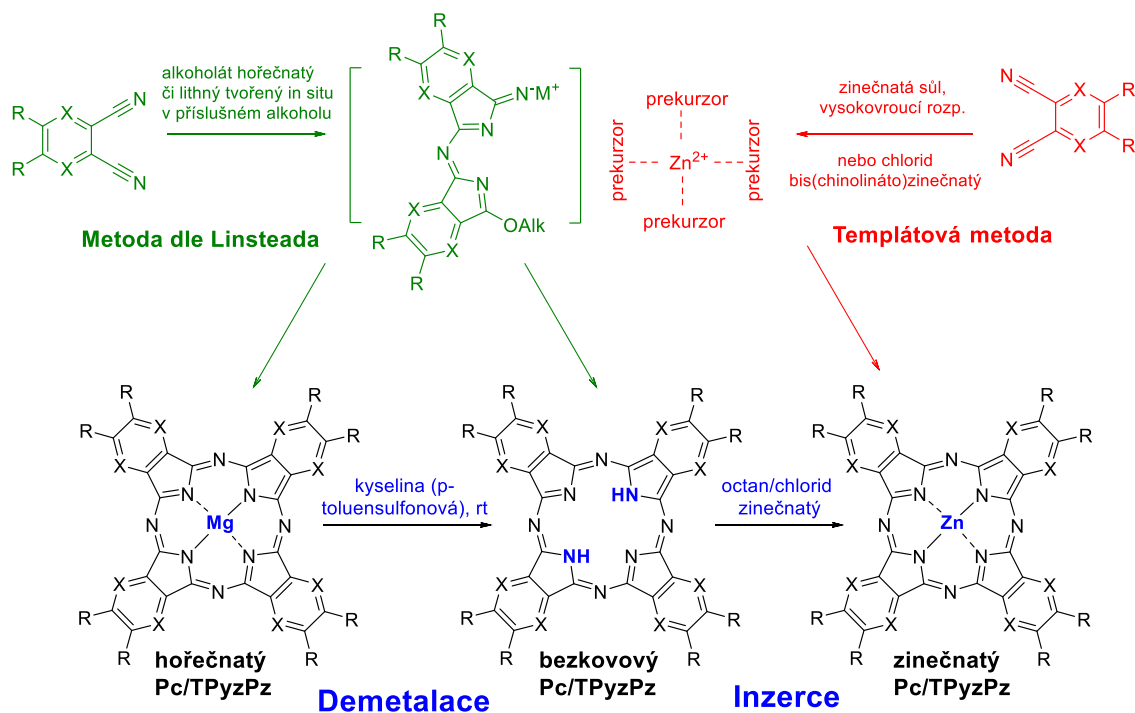
Obrázek 4 Strukturální typy metalokomplexů Pc ($X = CH$) a TPyzPz ($X = N$).

Podle literatury lze k syntéze Pc použít několik strategií (obr. 5). Obecně platí, že Pc vznikají procesem reduktivní cyklotetramerizace provedené zahřátím dusíkatých derivátů kyseliny ftalové.



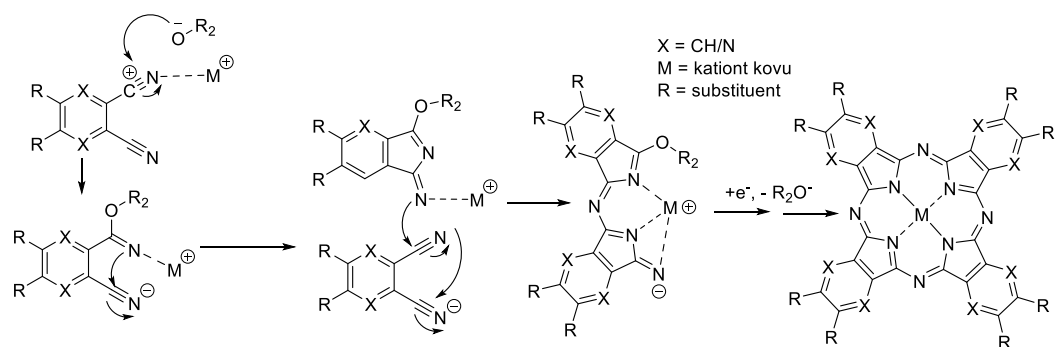
Obrázek 5 Prekurzory pro přípravu Pc ($X = CH$) a TPyzPz ($X = N$).

Nejčastěji používanými prekurzory jsou ftalonitrily (pyrazin-2,3-dikarbonitrily v případě TPyzPz) a diiminoisindoly. Jako výchozí materiál však lze použít i kyselinu ftalovou, ftalanhydrid, ftalimid, *o*-kyanobenzamid nebo dibrombenzen, protože implementace těchto látek vede obvykle k *in situ* tvorbě ftalonitrilů a diiminoisindolů, které jsou vlastními prekurzory pro proces cyklotetramerizace.¹⁴ Celkově můžeme rozlišit tři metody přípravy Pc a TPyzPz. Jedná se o metodu dle Linstead, templátovou metodu a metodu inzerce kovu do bezkovového makrocyklu (obr. 6).



Obrázek 6 Přehled syntetických metod přípravy Pc ($X = \text{CH}$) a TPyzPz ($X = \text{N}$). Metoda postupné výstavby cyklotetrameru dle Linstead (zeleně), templátová metoda (červeně), demetalace hořečnatého komplexu a následná inzerce zinečnatého kationtu – inzerce (černě).

Metoda dle Linstead má původ již ve třicátých letech 20. století.^{2, 15} Christie a spol. studovali mechanismus vzniku Pc (obr. 7).¹⁶ Předpokládá se, že vlastní reakce je iniciována nukleofilním atakem alkoholátové skupiny na elektronově deficitní uhlík dinitrilu za vzniku alkykarboximidátového aniontu koordinujícího kation kovu. Alkykarboximidátový aniont atakuje další molekulu dinitrilu za vzniku dimerního komplexu. Stejný mechanismus platí pro přidání dalších dvou molekul dinitrilu. Posledním krokem je pak uzavření kruhu do cyklotetrameru, ze kterého se po přenosu dvou elektronů eliminuje původní alkoholát za vzniku ftalocyanátového komplexu příslušného kationtu kovu.¹⁷



Obrázek 7 Schéma Linsteadovy cyklotetramerizace za iniciace alkoholátem Pc ($X = CH$) a TPyzPz ($X = N$).

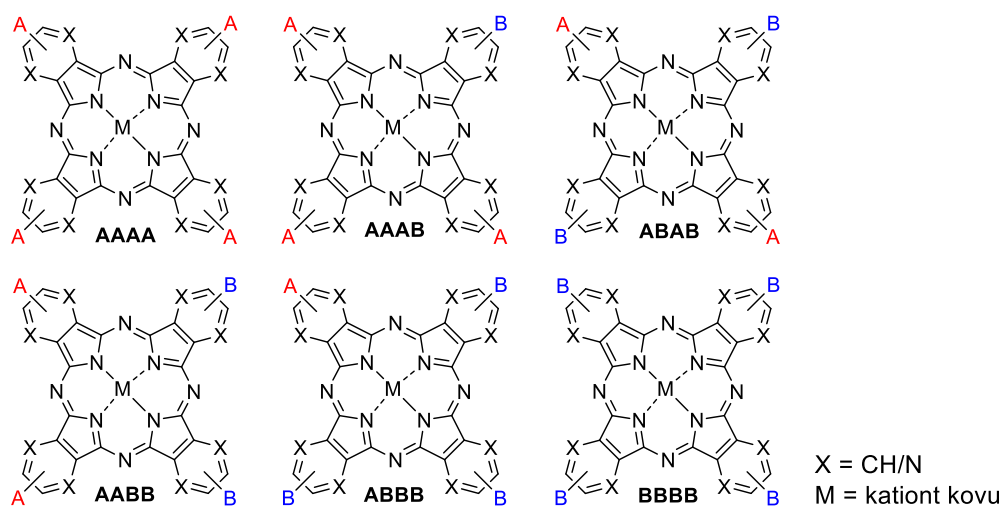
Reaktivita závisí především na charakteru substituentů a alkoholátu. Pokud jsou substituenty periferie elektron-odtahující, zvyšují elektronový deficit uhlíku nitrilové skupiny a cyklotetramerizace makrocyklů bez centrálního atomu kovu může probíhat už za mírně zvýšené teploty. Naopak jedná-li se o substituenty, jež jsou donorem elektronů, je nutné využít vysoko vroucích rozpouštědel, jako jsou *N,N*-dimethylformamid, chinolin nebo *N,N*-dimethylacetamid. Vysoká reakční teplota může vyvolat problém u termolabilních substituentů, především alkylsulfanylových a alkoholátových skupin. Tyto skupiny mohou být během reakce odštěpeny a nahrazeny jinou nukleofilní skupinou přítomnou v reakční směsi, což vede k nechtěnému asymetrickému produktu. Kationt kovu ovlivňuje reakci především velikostí svého atomu a svou valencí, proto se většinou s výhodou využívá lithných nebo hořečnatých alkoholátů, které jsou reaktivnější než ostatní kationty a poskytují tedy vyšší výtěžky. Při použití lithných kationtů nebo velmi slabě nukleofilních až nenukleofilních bazí (např. DBU), dochází k jejich okamžité disociaci po dokončení reakce a vznikají bezkovové Pc a TpyzPz (obr. 6).¹⁸⁻²⁰ Vysoká reaktivita lithných kationtů a bazí je nevýhodou u prekurzorů s labilními periferními funkčními skupinami (viz výše), kde se proto preferenčně používá hořečnatý alkoholát.

21

Hořčík je nejlehčí kov, jenž se po cyklotetramerizační reakci stabilně koordinuje do jádra vzniklého makrocyklu. Ovšem na druhou stranu jej lze z jádra cyklotetrameru relativně jednoduše disociovat demetalací pomocí kyselin, např. *p*-toluensulfonové, už za pokojové teploty (obr. 6).²²⁻²⁴ Bezkovové ligandy se mohou využít samostatně nebo k přípravě komplexů s kationty kovů, jež podstupují neochotně cyklotetramerizace templátovou metodou. Tyto kationty se dají do struktury jednoduše inzerovat za zvýšené teploty v přítomnosti vhodné soli.²⁵ Nejčastěji se používají bezvodé octany či chloridy obsahující

požadovaný kation kovu (obr. 6).⁸ Někdy bývá zdrojem i kov samotný, zde je ovšem potřeba přidat katalyzátor (močovina, molybdenan amonný).^{25, 26} V templátové metodě reagují čtyři ekvivalenty prekursoru s jedním ekvivalentem kovu / kovové soli. Kationt soli příslušného kovu koordinuje prekursoru kolem sebe do dostatečné blízkosti pro vznik cyklotetrameru.²⁷ Tato metoda vyžaduje prostředí vysoko vroucích rozpouštědel (chinolin, *N,N*-dimethylformamid, pyridin apod.) pro dodání potřebné energie.¹⁸ S ohledem na prekursor může být často nutný přídavek zdroje amoniaku (např. močovina), který podporuje tvorbu diiminoisindolů *in situ*.

Pokud reakce zahrnuje dva různé prekursoru, A a B, vznikají kromě standardních symetrických systémů AAAA a BBBB i další kongenery s různou kombinací jednotek A a B. Konkrétně se může jednat o asymetrické kongenery typu AAAB, ABAB, AABB nebo ABBB (obr. 8).^{28, 29} Všechny kongenery se od sebe mohou lišit svými spektrálními, optickými i elektrochemickými vlastnostmi, a proto je jejich struktura navrhována vždy pro přesně danou aplikaci. Hlavní nevýhodou metody statistické kondenzace jsou nižší výtěžky produktů (15-18 %), a to i v případě preferenčního poměru vstupujících prekursorů, např. 3:1 pro přípravu kongeneru AAAB.

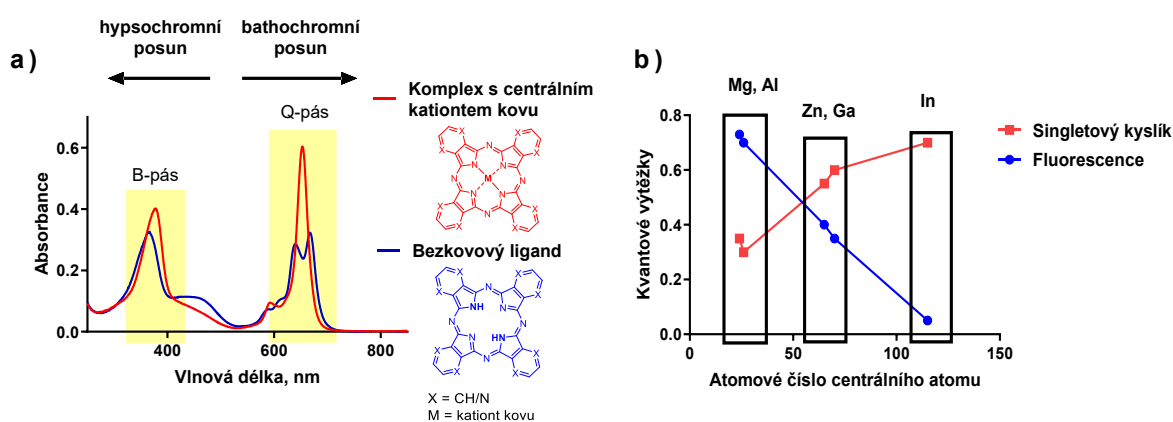


Obrázek 8 Schéma vzniku šesti kongenerů statistickou kondenzací, Pc ($X = CH$) a TPyzPz ($X = N$).

3.1.2 Vlastnosti

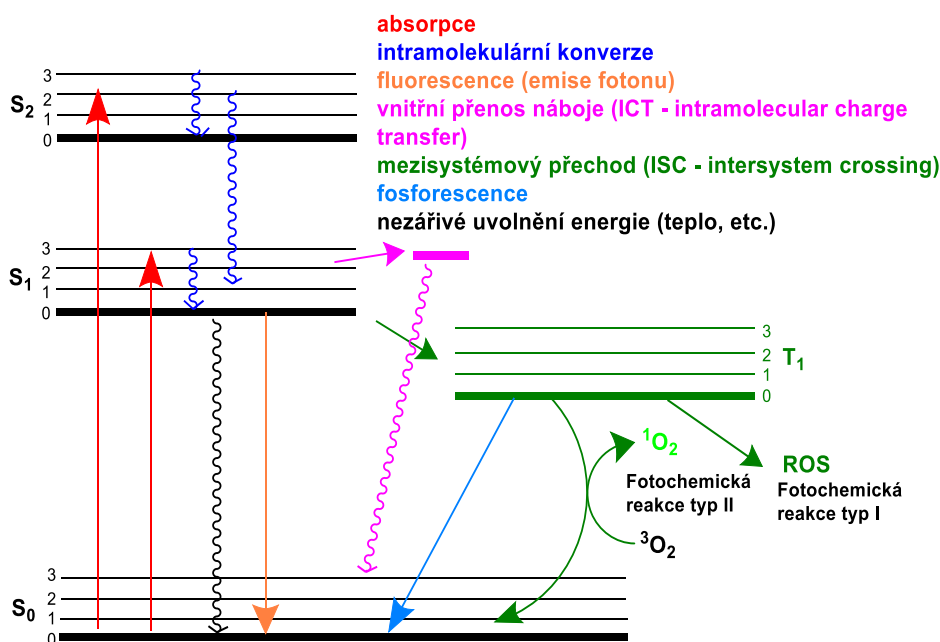
Pc a TpyzPz jsou známé svými jedinečnými optickými a fotochemickými vlastnostmi, dále také tepelnou a chemickou stabilitou vůči kyselinám a zásadám. V absorpčních spektrech Pc a TpyzPz se díky azamethinovým můstkům objevují dva oddělené pásy

(obr. 9a).^{30, 31} Vysokoenergetický Soretův neboli B-pás při 200 – 350 nm je většinou strukturálními změnami ovlivněn jen minimálně na rozdíl od nízkoenergetického Q-pásu při vlnové délce 620 – 700 nm, který je zodpovědný za intenzivní modrou, zelenou až fialovou barvu.^{30, 32} Právě tvar a plocha Q-pásu je velmi citlivým ukazatelem změny struktury, která odhalí i fyzikálněchemické změny v rozpustnosti či interakce s jinými molekulami. Pc a TPyzPz s koordinovaným centrálním kationtem se díky D_{4h} symetrii vyznačují absorpčními spektry s ostrým Q-pásem bez známek štěpení (obr. 9a, červená). Oproti tomu bezkovové makrocykly jsou většinou charakterizovány výrazně rozštěpeným Q-pásem, což svědčí o symetrii D_{2h} s vyšší degenerací orbitalů.³³



Obrázek 9 a) Absorpční spektra komplexů s a bez centrálního kationtu kovu, b) Závislost atomového čísla centrálního kationtu makrocyklů na výtěžky fluorescence a singletového kyslíku.

Díky své geometrii a planárnímu π -systému dvojných vazeb mohou po dodání energie (např. absorpcí světelné energie) přecházet do vyšších energetických hladin (tzv. excitovaných stavů). Excitované stavy molekul jsou nestabilní a molekula se proto rychle vrací zpět do svého základního stavu. Může tak učinit několika různými relaxačními cestami. Vše je přehledně znázorněno v tzv. Jablonského diagramu (obr. 10). Elektronické singletové stavy S_0 , S_1 a S_2 obsahují pouze kompletní elektronové páry (multiplicita = 1). Po absorpci energie světla o vhodné vlnové délce přechází molekula ze základního stavu S_0 do excitovaných stavů S_1 , nebo S_2 . K uvolnění přebytečné energie nestabilní excitované molekuly při návratu do základního stavu, tzv. relaxaci, může dojít několika způsoby v závislosti na struktuře Pc a TPyzPz.³⁴



Obrázek 10. Modifikovaný Jablonského diagram, podle ³⁵

Prvním případem je **fluorescence** (tj. emise fotonu, obr. 10, oranžová) trvající $\approx 10^{-9}$ až 10^{-8} s, jejíž vlnová délka je vždy delší, než jaká byla absorbována tzv. Stokesův posun. ³⁶ Po excitaci může rovněž dojít ke změně spinu elektronu a **mezisystémovému přechodu** do tripletového stavu (ISC, z angl. Intersystem crossing, obr. 10, zelená), v němž mají dva elektrony stejný spin. ³⁴ z tohoto energetického mezistupně může molekula zbytek energie opět uvolnit jako emisi fotonů (tj. fosforescenci, obr. 10, modrá) nebo může svoji energii předat jiné molekule např. molekulárnímu kyslíku (3O_2), ze kterého tak vzniká **singletový kyslík** (1O_2). Tento proces se označuje jako fotochemická reakce typu II. Singletový kyslík je extrémně reaktivní, toxický a na rozdíl od jiných reaktivních forem kyslíku (ROS, z angl. Reactive oxygen species) má relativně dlouhý poločas rozpadu, který se měří v mikrosekundách. ³⁷ V závislosti na podmínkách (okysličení prostředí) může dojít k produkci jiných ROS jako jsou hydroxylové radikály nebo superoxidové ionty vznikající fotochemickou reakcí typu I.

Pravděpodobnost odevzdání energie určitou relaxační cestou lze definovat pomocí tzv. kvantových výtěžků. Jedná se o množství jednotek daného procesu (molekul singletového kyslíku, emitovaných fotonů apod.) na počet absorbovaných fotonů. ³⁸ Pokud se v molekule vyskytuje vhodný donor-akceptorový systém, může se molekula relaxovat dalším kompetitivním procesem – **intramolekulárním přenosem náboje** (ICT, z angl.

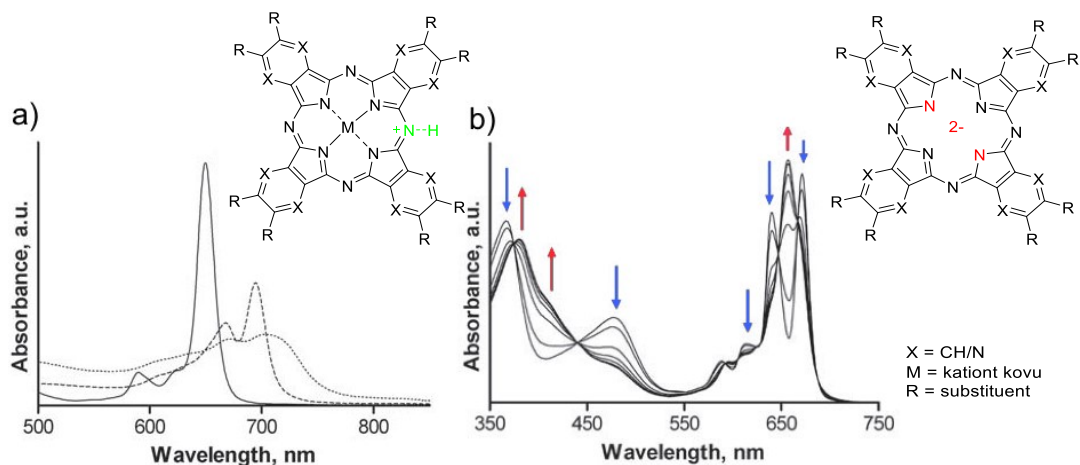
Intramolecular charge transfer, obr. 10, růžová). Tento proces je velice rychlý a proto obvykle převáží nad všemi výše zmíněnými.³⁹

Intenzita a způsob relaxace jsou ovlivněny strukturou molekuly. TPyzPz mají vyšší tendenci k fluorescenci než Pc. Velký vliv na výsledné fotofyzikální vlastnosti má i centrální atom. Komplexy s centrálními atomy s vyšším atomovým číslem jako jsou Co, Ni, Zn, Ga mají všeobecně vyšší hodnotu kvantového výtěžku singletového kyslíku.^{40, 41} Naopak je tomu u komplexů s prvky o nižší molekulové hmotnosti (např. Mg, Si a P), které ve větší míře relaxují cestou fluorescence ($\Phi_{\Delta} \sim 0,20$; $\Phi_F = 0,40-0,89^{41}$) (obr. 9b).

⁴⁰ Tento jev se nazývá **efekt těžkého atomu**, kdy zavedení těžšího atomu do molekuly vede k vyšší míře ISC, a tedy i následné vyšší produkci singletového kyslíku.³⁸

Bezkovové Pc a TPyzPz mají obvykle nižší kvantové výtěžky jak fluorescence tak produkce singletového kyslíku, přesný důvod zatím není znám.⁸ Nemalou roli v hodnotách emisí hraje i periferní substituent, a především charakter spojujícího atomu periferní substituce. Alkyl/aryl- a alkyloxy/aryloxy substituované deriváty mají obvykle vyšší emisi fluorescence na úkor produkce singletového kyslíku, alkylsulfanyl pak naopak podporuje produkci singletového kyslíku.⁸ V případě alkylamino substituovaných derivátů dochází pouze k minimální produkci singletového kyslíku a emisi fluorescence nebo nedochází k těmto procesům vůbec. Je to způsobeno relaxací pomocí ICT (viz výše), kde volný elektronový pár dusíku slouží jako donor a skelet makrocyklů jako akceptor elektronů. Vzhledem k více elektron-deficitnímu charakteru TPyzPz, je tento proces daleko silnější u TPyzPz než u Pc. Alkylamino substituované TPyzPz se proto s oblibou zkoumají jako tzv. dark quenchers neboli temné zhášeče.

Z hlediska acidobazických vlastností Pc a TPyzPz jsou důležité bazické azamethinové dusíky porfyrázinu a samozřejmě dusíky přítomné v pyrazinech u TPyzPz. Pokud se v makrocyklech nevyskytují centrální kationty kovu, chovají se centrální pyrrolové heterocykly s ohledem na použité rozpouštědlo jako N-kyseliny. Celkově mají tedy Pc a TPyzPz amfoterní charakter.⁸ Snadno odstupující protony z centrálních dusíků u TPyzPz lze pozorovat pomocí absorpčních spekter (obr. 11b), protože spektra úplně deprotonovaných makrocyklů odpovídají svým analogům s centrálním iontem kovu díky zvýšené symetrii D_{4h} .⁴² Protonaci azamethinových dusíků lze naproti tomu monitorovat vznikem bathochromně posunutého absorpčního pásu oproti Q-pásu (obr. 11a).



Obrázek 11 Absorpční spektra komplexů a) neprotonovaný (plná čára), monoprotonovaný (čárkovaná čára) a diprotonovaný (tečkovaná čára), inset: struktura monoprotonizovaného komplexu, b) změna absorpčního spektra při deprotonaci centrálních dusíků (pokles rozštěpeného Q-pásu – modré šipky a vznik ostrého Q-pásu – červené šipky), inset: struktura deprotonizovaného komplexu. Převzato a upraveno z⁴³

Rozsáhlý systém konjugovaných vazeb má i nežádoucí vliv na vlastnosti Pc a TPyzPz, jelikož u nich dochází k silné π - π interakci.³⁵ Důsledkem je agregace, která má za následek nerozpustnost v nejběžnějších organických polárních i nepolárních rozpouštědlech, a tedy komplikace procesu izolace a čištění.⁴⁴ Navíc jsou agregáty Pc a TPyzPz fotofyzikálně neaktivní. Jev agregace a problematiku rozpustnosti lze částečně kompenzovat pomocí charakteru periferní substituce. Stericky objemné substituenty jako *tert*-butyl nebo fenoxyskupina jsou velmi účinné v organickém prostředí,⁴⁵ kde brání těsnému přiblížení cyklů a tedy tvorbě dimerů a vyšších agregátů.²¹ Mnoho aplikací Pc a TPyzPz vyžaduje vodné prostředí, zde se osvědčila periferní substituce nabitými skupinami, např. kladně nabitě aminoskupiny, či záporně nabitě karboxylové nebo sulfonové skupiny. Jejich počet však musí být dostatečný (minimálně osm substituentů).⁴⁶ Dalším možným způsobem prevence agregace je axiální vazba substituentu na centrálním atomu makrocyklu (Al, Si, V, Ru).

3.2 Využití ftalocyaninů a tetrapyrazinoporfyrazinů

Obecně jsou Pc a TPyzPz díky svým vlastnostem využívány v mnoha různých oblastech jako je materiálová chemie, barvířský průmysl, elektrochemie a medicínská chemie. Konkrétně je lze využít pro absorpci panchromatického světla,⁴⁷ pro tvorbu Langmuirových-Shaeferových filmů⁴⁸ nebo jako povlaky pro elektrody uhlíkových nanotrubic,⁴⁹ senzory plynů,⁵⁰ polovodičové materiály,⁵¹ do fotovoltaických článků,⁵²

⁵³ tekutých krystalů, ^{54, 55} fotodynamické terapie, ⁵⁶⁻⁵⁸ diagnostiky a biozobrazování. ⁵⁹ Poslední tři jmenované oblasti jsou pro účely této práce v dalším textu představeny blíže.

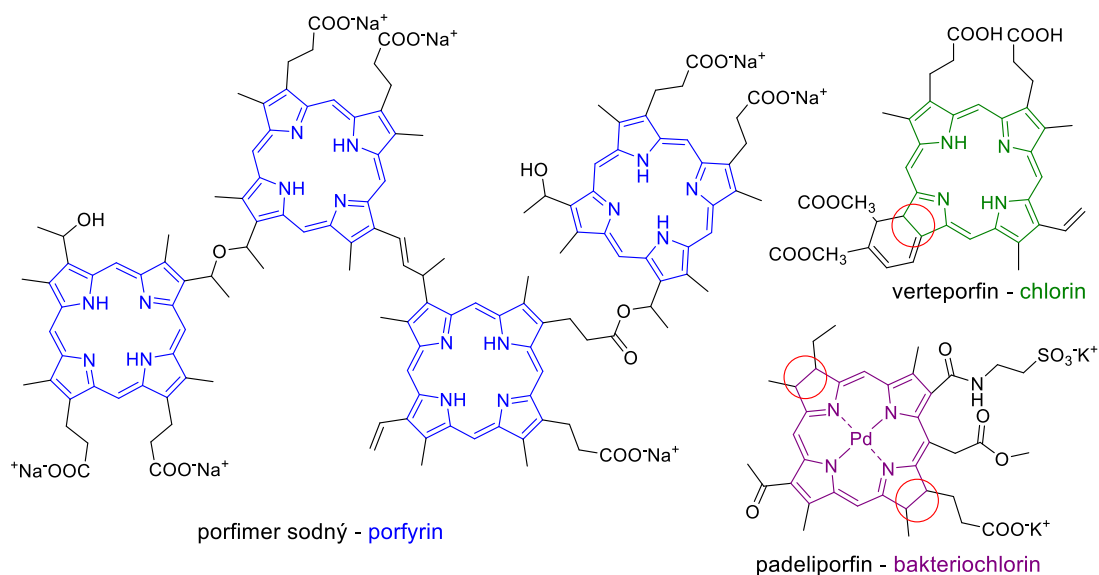
3.2.1 Fotosenzitizéry ve fotodynamické terapii

Fotodynamická terapie (PDT, z angl. Photodynamic therapy) je rychle se rozvíjející léčebná metoda s různými klinickými aplikacemi především u nádorových a kožních chorob. ⁶⁰ Spočívá v expozici tkání fotosenzibilizujícímu léčivu, po níž následuje ozáření světlem vhodné vlnové délky a následné produkci singletového kyslíku. ⁶¹⁻⁶³ Fotosenzitizéry (Ps, z angl. Photosensitizers) jsou navrhovány tak, aby byly schopné po excitaci světlem relaxovat přednostně cestou ISC spojené s vysokou produkcí singletového kyslíku, popřípadě dalších ROS. Tyto radikály ihned po vzniku oxidují blízké biomolekuly (bílkoviny a lipidy), čímž se narušuje primární funkce buněk a dochází k apoptóze či nekróze nádorové/cílové tkáně. ⁶⁴

Aktivace světlem klade důraz na absorpční vlastnosti Ps. Ovšem i endogenní látky mohou absorbovat elektromagnetické záření především ve vlnových délkách 200 – 600 nm a samotná voda naopak absorbuje při vyšších vlnových délkách. ⁶¹ Pro aktivaci PDT tak vzniká relativně úzké rozmezí spektra 600 – 1300 nm nazývané **optické okno biologických tkání**. To se ovšem dále zužuje, jelikož pouze vlnové délky do 850 nm disponují dostatečnou energií pro aktivaci tripletového stavu a produkci singletového kyslíku.

Ačkoliv je PDT lokalizovaná prostřednictvím cíleného ozařování nádoru, světlo může aktivovat i Ps v buňkách kolem místa terapie. Proto se molekuly Ps konjugují s peptidy nebo protilátkami, které zajišťují receptorem zprostředkovaný přenos léčiva pouze do nádorových buněk (viz dále). ⁶⁵ Ovšem uvolněné Ps se z organismu vylučují velmi pomalu a jsou zdrojem fototoxicity. ⁶⁶ Řešením jsou tzv. „aktivovatelné fotosenzitizéry“ (z angl. activatable photosensitizers), ^{64, 66} které jsou konjugované k ON sekvenci spolu se zhášeči. Právě ty deaktivují Ps do doby, než je v cílové buňce nádoru konjugát rozštěpen. Mnoho Ps je už schváleno ke klinickému použití americkým Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (FDA, z angl. Food and Drug Agency) a některé i Evropskou lékovou agenturou (EMA, z angl. European Medicine Agency). Úplně prvním klinicky schváleným přípravkem byl Protoporfin v roce 1993. Strukturně je převážná většina Ps odvozena právě od tetrapyrrolové struktury **porfyrinu** (porfimer sodný, kyselina

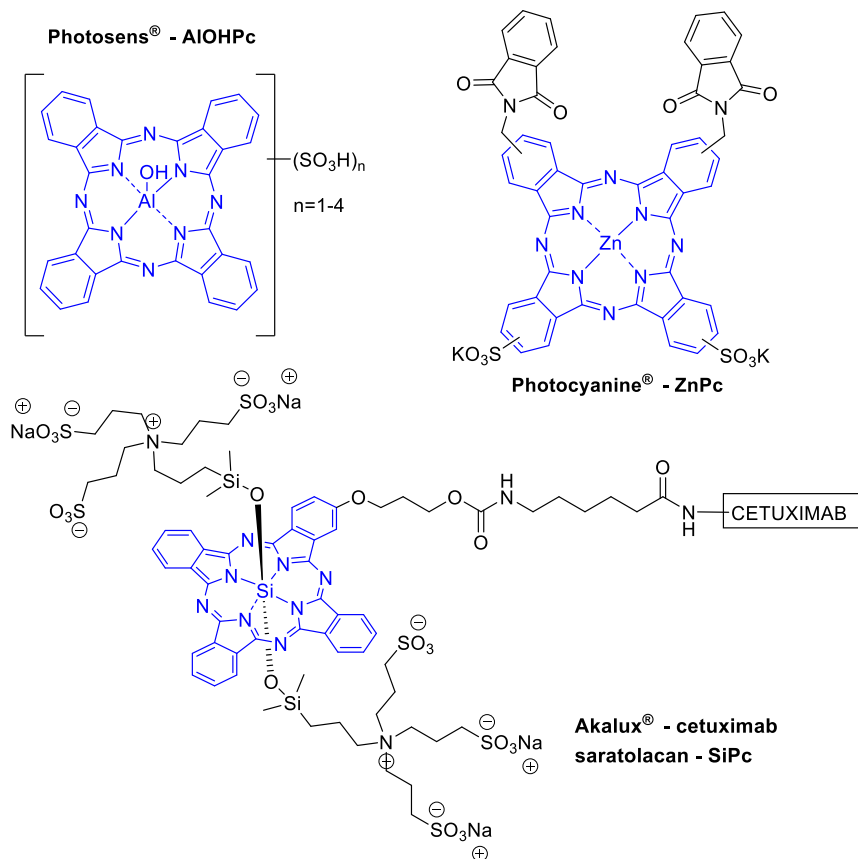
aminolevulová, methyl/hexyl-aminolevulát), jeho derivátů **chlorinů** (verteporfin, temoporfin, talaporfin), popř. **bakteriochlorinů** (chlorin e6, p6, purpurin, padoporfin, padeliporfin, photochlor) (obr. 12).



Obrázek 12 Příklady fotosensitizerů různých struktur s barevně zvýrazněným základem struktury – porfyrin (modře), chlorin (zeleně), bakteriochlorin (fialově).

Další strukturně významnou skupinou jsou vyšší homology porfyrinu – **Pc** představitelé již 3. generace Ps. Nejstarší přípravek Photosens[®], hlinitý hydroxyftalocyanátový periferně sulfonovaný komplex (obr. 13), vykazuje vynikající klinickou odezvu a fluorescenci u přirozeně se vyskytujících veterinárních nádorů.⁶⁷ Má také široké využití u infekcí.⁶⁸ Úspěšná byla léčba časných stadií a recidivujících lézí rtu, hltanu, hrtanu a jazyka, stejně jako primárních nádorů plic, recidivujících nádorů plic a jícnu.^{69, 70} Periferně nesubstituovaný **AlOHPc**, neboli hydroxyftalocyanátový hlinitý komplex byl úspěšně testován na karcinom prsu. Po lokální aplikaci bylo provedeno ozáření světlem o vlnové délce 600–700 nm. Tato studie ukázala, že léčba karcinomu prsu pomocí AlOHPc vedla k úplnému zmenšení nádorů u 90 % pacientů.⁷¹ I komplex zinečnatého ftalocyaninu (**ZnPc**, obr 13) prokázal pozitivní vliv na iniciaci buněčné apoptózy u buněk karcinomu prsu po ozáření světlem s vlnovou délkou 680 nm.⁷² Jeho modifikovaný derivát Photocyanine, který prokázal svou účinnost celkem nedávno,⁷³ je nyní už ve fázi klinického testování proti nádorům nosohltanu, hrtanu, jícnu a kůže.⁷⁴ Velký potenciál prokázal také křemičitý komplex Pc známý jako **IR750**, jež je schválen v Japonsku proti komplikovaným případům karcinomu hlavy a krku v konjugované formě s protilátkou cetuximabem zaměřenou na receptor pro epidermální růstový faktor (EGFR, z angl.

Epidermal growth factor receptor) jako přípravek Akalux[®] (cetuximab saratolacan, obr. 13).^{65, 75}



Obrázek 13 Příklady fotosenzitizérů odvozené ze struktury Pc.

3.2.2 Barviva v *in vitro* a *in vivo* diagnostice

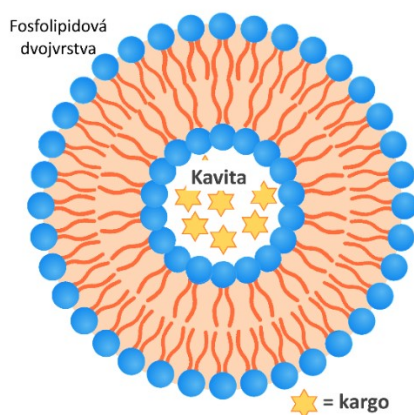
Fluorescenční spektroskopie je v posledních letech považována za významný úspěch, neboť umožnila prozkoumat nové cesty v oblasti molekulární dynamiky.^{34, 36} Stokes a Förster prokázali užitečnost fluorescenční spektroskopie v důležitých aplikacích, včetně identifikace buněk, sekvenování DNA, detekce a identifikace mutací.⁷⁶ Díky své specifitě, vysoké citlivosti k malým změnám ve strukturní dynamice a schopnosti detekovat velmi nízké koncentrace se fluorescenční spektroskopie stala základním analytickým nástrojem v oborech chemie a biochemie při monitoringu průběhu molekulárně biologických a biochemických reakcí.^{34, 44, 77}

V těchto metodách dochází k využití dvou různých molekul – donoru fluorescence (fluoroforu) a akceptoru fluorescence (zhášeče). Ty spolu vytvářejí komplex, jenž je vázán slabými ne vazebnými interakcemi, jakými jsou π - π hydrofobní interakce a

elektrostatické síly. ⁷⁸ Molekuly fluoroforu a zhášeče jsou navázány na vlákno oligonukleotidu (ON, z angl. Oligonucleotide) a společně tvoří hlavní části sondy. Těch je mnoho druhů s různými designy a využitím, mezi nejběžněji využívané patří dvojité značené sondy TaqMan, které mají nezastupitelné místo v kvantitativní polymerázové řetězcové reakci (qPCR, z angl. quantitative Polymerase Chain Reaction, případně quantitative real-time PCR) při identifikaci a kvantifikaci amplifikovaných sekvencí DNA. ⁷⁹

3.3 Lipozomy a uvolňování jejich obsahu

Lipozomy jsou sférické částice složené z fosfolipidové dvojvrstvy, které mohou obsahovat lipofilní léčiva ve svých lipidových membránách nebo hydrofilní látky ve vnitřní kavitě (obr. 14). Tato kavita může obsahovat i více druhů speciálních látek, ovšem zkoumají se běžně také lipozomy bez specifického obsahu. Z tohoto důvodu v této práci zavádíme pojem **kargo** pro odlišení skutečností týkajících se obecně lipozomů s obsahem jakýchkoliv látek v kavitě, týkajících se lipozomů s pouze konkrétní látkou obsaženou v kavitě a týkajících se lipozomů bez jakýchkoliv látek v kavitě. Kargo je tedy specifický obsah lipozomální kavity.



Obrázek 14 Stavba lipozomu s kargem.

Vzhledem ke své velikosti představují lipozomy pasivní cílený systém antineoplastické léčby založený na zvýšeném permeačním a retenčním účinku nádorových buněk. ^{80, 81} Spolu s nanočásticemi, nanokapslemi či mikroemulzemi se využívají ke snížení četných nežádoucích účinků protinádorové léčby a řadí se mezi technologické formulace podání

léčiv, tzv. nosičový systém (DDS, z angl. Drug delivery system)^{82, 83} Zároveň chrání obsah před rozkladem enzymy nebo atakem drsnějšího prostředí, např. v endozomech/lysozomech, nebo před působením vedlejších účinků léčiva v necílových tkáních.⁸⁴⁻⁸⁶

Úspěšnost tohoto konceptu závisí na řízeném uvolnění lipozomálního obsahu v cílové tkáni nebo ještě lépe v cytosolu cílových buněk. Toto lze provést různými fyzikálně chemickými podněty (pH, enzymy, teplo nebo světlo).^{87, 88} Uvolňování pomocí světelné indukce jeví velký potenciál díky své flexibilitě, jelikož v závislosti na použitých modifikacích lipozomů spouští celou řadu různých mechanismů indukovaného uvolňování peroxidace lipidů, světelné štěpení alkylového řetězce, oxidativní depegylace nebo fototermické přeměny.^{89, 90} Z nich nejvíce studovaná je peroxidace dvojných vazeb v alkylových řetězcích fosfolipidů tvořících lipozomální stěnu. Vzniklé hydroperoxy mohou destabilizovat lipidovou dvojvrstvu, což vede k její lýze a okamžitému uvolnění lipozomálního karga.^{90, 91} v této aplikaci byla zkoumána i řada Ps z rodiny Pc a dalších příbuzných látek.^{86, 92-95}

3.4 Příprava modifikovaných oligonukleotidů

Funkcionalizované syntetické ON⁹⁶⁻⁹⁸ jsou předmětem intenzivního zájmu v přírodních vědách, nanotechnologiích a příbuzných oborech. Zkoumá se také jejich využití jako katalytických činidel,^{99, 100} nebo např. nástrojů pro ukládání dat.^{101, 102} Přispívají k postupům v oblasti genetické diagnostiky,^{103, 104} jakož i k terapeutickým přístupům např. technologie antisense a SiRNA.^{105, 106} Velký potenciál existuje také ve vývoji konjugátů oligonukleotidových aptamérů a léčiv.¹⁰⁷ Vývoj vysoce spolehlivých a účinných metod modifikace syntetických a nativních nukleových kyselin je proto důležitou interdisciplinární otázkou na pomezí molekulární biologie, chemie a fyzikální chemie.

3.4.1 Syntéza oligonukleotidů

ON jsou krátké jedno- nebo dvouřetězcové úseky DNA nebo RNA s délkou do 100 nukleotidů, které jsou tvořeny řetězcem 3,5-(deoxy)ribózo-fosfátových jednotek. Na pentózu je pak v poloze 1 vázána jedna z pěti heterocyklických dusíkatých bází (A, C, G, T, U). Nativně vznikají převážně enzymatickou syntézou od 5'- ke 3'-konci. Synteticky vyráběné ON se však připravují naopak od 3'- k 5'-konci pomocí vysoce efektivní

fosforamiditové metody na pevné fázi,¹⁰⁸ která probíhá poloautomaticky na DNA/RNA syntetizérech.¹⁰⁹ Během čtyřkrokového prodlužování řetězce ON o další bazi je vznikající vlákno opakovaně vystaveno působení různě agresivním činidlům jako je kyselina trichloroctová, tetrazol a silně oxidační jód.¹¹⁰ V komerčních syntézách se používají hlavně dva strukturní typy pevných nosičů – sklo modifikované dlouhým alkylaminovým spojovacím řetězcem (LCAA-CPG, z angl. Long chain alkylamino linker controlled pore glass) a vysoce zesíťovaný aminomethylpolystyren (PS). Zatímco LCAA-CPG má hydrofilní charakter, PS je poměrně hydrofobní. Dalším důležitým parametrem pevných nosičů pro syntézu ON je velikost pórů. PS se obvykle používá pouze v jedné velikosti pórů (1000 Å), CPG je k dispozici s různou velikostí pórů – 500 Å, 1000 Å, 2000 Å, 3000 Å. CPG 500 Å se používá ve většině standardních komerčních syntéz, materiály s větší velikostí pórů se doporučují pro syntézy dlouhých řetězců (>50 bazi).

110, 111

3.4.2 Modifikace oligonukleotidů

Existuje mnoho typů funkčních molekul, které lze konjugovat s připravenými ON. Mezi nejčastěji používané patří fluorescenční značky, zhášedce fluorescence, specifické vazebné ligandy a molekuly stabilizující duplexy nukleových kyselin, jako jsou molekuly vážící se do malého žlábků DNA (MGB, z angl. Minor Groove Binders), nebo interkalátory.¹¹⁰ Syntetické nukleové kyseliny mohou být chemicky modifikovány přímo během syntézy nebo post-synteticky, a to buď ještě vázané na pevnou fázi, nebo volně v roztoku po odštěpení z pevné fáze. Všechny tyto přístupy mají své výhody a omezení.¹¹²

Vzhledem k automatizaci je **modifikace před a během syntézy** na syntetizéru rozhodně nejpohodlnější a nejrychlejší. První cesta je ukotvení značky na pevné fázi pro syntézu ON, které je však omezeno pouze na umístění na 3'-konec řetězce. Výrazná většina modifikací je vyžadována a provádí se na 5'-konci ON, proto je komerčně dostupná řada fosforamiditových derivátů modifikujících molekul jako stavebních jednotek pro syntézu ON. Použitím fosforamiditu lze konjugované molekuly umístit na 5'-konec nebo jakoukoli jinou pozici ON kromě 3'-konce. Modifikované fosforamidity však mohou být velmi nestabilní a není zcela snadné je získat v čisté formě. Oproti jiným metodám modifikace ON je nevýhodou využití fosforamiditu jeho poměrně velká spotřeba. Navíc po rozpuštění pro syntézu je roztok použitelný pouze krátkou dobu (maximálně několik

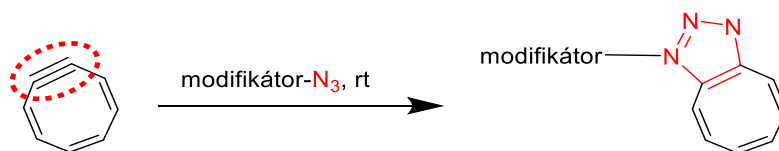
dní) kvůli nízké stabilitě. Oba výše uvedené přístupy tedy předpokládají dostatečnou stabilitu konjugované molekuly ve všech činidlech a podmínkách syntézy ON.

Post-syntetické značení lze provádět buď ještě na pevné fázi, nebo po odštěpení a deprotekcí ON.¹¹² Oba přístupy mají opět své výhody i nevýhody. Stručně řečeno, v případě značení na pevném nosiči by konjugovaná molekula měla být stabilní v podmínkách odštěpení z pevné fáze a deprotekcí. Problémem může být její potenciální reaktivita. V případě značení v roztoku je limitem rozpustnost značky v reakčním rozpouštědle, a to z důvodu vysoce polárního charakteru ON a použití reakčního prostředí obsahujícího vodu.¹¹³ Významnou výhodou post-syntetického značení na pevné fázi je snadná purifikace pomocí dekantace a promytí. Další výhodou je možnost použití lipofilních modifikátorů, jelikož lze využít i méně polární rozpouštědla, než je voda, např. acetonitril, methanol a tetrahydrofuran. Všechny modifikace post-synteticky na pevné fázi vyžadují stabilitu konjugované molekuly pouze v deprotekcích činidlech. Běžně používanými jsou 32% roztok amoniaku ve vodě, směs 40% methyamin / 32% roztok amoniaku ve vodě (1:1) a 0,05M roztok uhličitanu draselného v methanolu.¹¹⁰ Pokud jde o mechanismy konjugace funkčních molekul s ON, je známo a používáno několik přístupů, včetně aktivních esterů,^{114, 115} thiol-thiolových nebo thiol-maleimidových interakcí,¹¹⁶ thiol-reaktivní akrylové skupiny¹¹⁷ a několika typů "click" metod. Konjugace na pevnou fázi má často nízkou reakční rychlost,¹¹⁸⁻¹²⁰ možná právě proto se účinností této reakce zabývá pouze několik studií.¹²¹

3.5 Click chemie

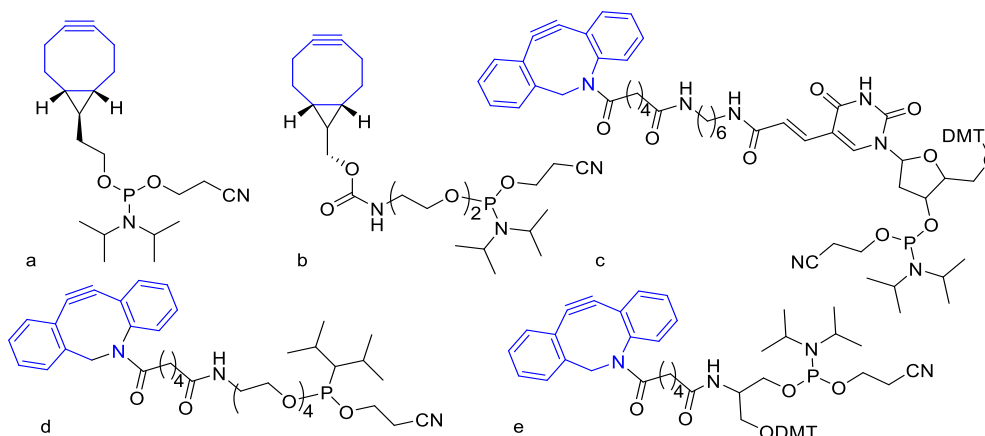
Azid alkynová cykloadice (AAC) patří obecně k neúčinnějším reakcím.¹²² Patří do koncepce "click chemistry", kterou zavedl K. B. Sharpless.^{123, 124} Pro značení ON ji lze použít v několika variantách, AAC katalyzovaná mědnými kationty (CuAAC, z angl. Copper-catalyzed azide-alkyne cycloaddition), ruthnatými kationty (RuAAC, z angl. Ruthenium-catalyzed azide-alkyne cycloaddition), nebo AAC podporované vnitřním pnutím (SPAAC, z angl. Strain promoted azide-alkyne cycloaddition).^{125, 126} Ačkoli jsou všechny tyto reakce dobře zavedené a na pevné fázi již popsány,^{121, 127} CuAAC a RuAAC nejsou zcela bezproblémové a vyžadují zkušenosti s chemickými reakcemi nebo speciální podmínky. V případě CuAAC je k udržení mědi v aktivní formě Cu^+ nutné bezkyslíkaté prostředí, redukční činidlo nebo komplexotvorný ligand. RuAAC vyžaduje homogenní

aprotické podmínky a vyšší teplotu, aby bylo dosaženo vysokých výtěžků konjugace.^{128,}
¹²⁹ V porovnání s nimi je SPAAC (obr. 15), o níž poprvé informovali Blomquist a Liu¹³⁰
a kterou pro biomolekuly poprvé použili Bertozzi a spol.¹³¹, plně bioortogonální, snadno
proveditelná ve vodě i v organických rozpouštědlech, není náchylná na přítomnost
kyslíku a nevyžaduje jiná činidla kromě vhodně modifikovaného ON a konjugované
molekuly (modifikátoru).¹²⁷



Obrázek 15 Obecné schéma SPAAC reakce – vznik triazolového můstku červeně.

Velmi příznivá termodynamika je založena na cyklooktynovém cyklu, který je za
běžných podmínek dostatečně stabilní. Ovšem vysoké napětí vazby, způsobené
uzavřením cyklu trojnou vazbou, snižuje aktivační energii a zvyšuje reaktivitu
cykloadiční reakce do té míry, že k aktivaci není nutná přítomnost katalyzátoru a probíhá
za pokojové teploty (rt, z angl. Room temperature).^{112 131-134}



Obrázek 16 Fosforamiditové bloky pro (aza)cyclooktynovou modifikaci ON.

Vzhledem ke komerčně dostupné modifikaci ON pro reakce SPAAC je možné použít dva
typy cyklooktynových fosforamiditových modifikátorů. Prvním z nich je jednoduchý
cyklooktyn (se dvěma různými linkery k fosforamiditové části, obr. 16a, b). Druhým
typem modifikace je dibenzoazacyklooctyn (DBCO), pro značení 5'-konce připojený
přímo k fosforamiditové části alifatickým řetězcem triethylenglykolu (obr. 16d). Pro
vnitřní značení sekvence jsou k dispozici dvě stavební jednotky: nenukleosidový
monomer na bázi serinolu a monomer na bázi nukleosidu nesoucí dibenzoazacyklooctyn
na dT fosforamiditu (obr. 16c, e).

4 Cíl disertační práce

Cílem mé disertační práce bylo studium několika klíčových otázek významně a dlouhodobě ovlivňujících praktické využití Pc a TPyzPz jako jsou vysoká míra agregace a nízká rozpustnost v polárním (biologickém) prostředí, schopnost interakce s biologickými molekulami, nízká výtěžnost cyklotetramerizace asymetrických makrocyclů a stabilita centrálního kationtu v kyselém prostředí. Z tohoto důvodu je práce členěna na několik dílčích cílů.

První část pojednává o problematice syntézy symetrických křemičitých komplexů TPyzPz s různou periferní substitucí. Cílem bylo studium vlivu charakteru této substituce na reaktivitu za využití klasické templátové i inzerční metody a možnostech a limitech axiální substituce tohoto typu komplexu.

Druhá část této práce se zabývá komplexním studiem stability centrálních atomů makrocyclů Pc a TPyzPz v kyselém prostředí se zaměřením na hořečnaté komplexy. Cílem bylo porozuměním mechanismům a vlivu podmínek prostředí na demetalační proces a studium možných způsobů jeho omezení.

Třetí část zkoumá asymetrické amfifilní Pc jako možné Ps pro světlem indukované uvolňování léčiv z jejich lipozomální formy. Cílem této studie bylo najít optimální složení a vlastnosti lipozomů jako nosičů, zjistit strukturální předpoklady Ps pro efektivní inkorporaci do lipidové dvojvrstvy lipozomů a nakonec najít podmínky pro jejich fotoaktivaci a tím uvolnění modelové a aktivní cytotoxické molekuly obsažené v kavitě lipozomů.

Předmětem poslední části disertační práce bylo studium podmínek značení ON pomocí SPAAC reakce na pevné fázi. Cílem bylo detailně prozkoumat vliv charakteru a koncentrace konjugované molekuly, polohy modifikace na řetězci ON, vliv typu pevné fáze, na které byl ON zakotven, doby průběhu reakce a možnosti využití získaných výsledků pro značení v praktickém provozu na DNA syntetizéru.

5 Experimentální část

Všechna organická rozpouštědla použitá pro syntézu a spektrální měření byla v analytické kvalitě (p.a.). Bezvodý butanol byl vysušen pomocí hořčíku a předestilován v čase potřeby. Všechny chemikálie použité pro syntézu byly získány u certifikovaných prodejců (Penta, TCI Europe, Merck, Fluorochem, Glen Research) a bez dalších úprav použity. TLC byla prováděna na hliníkových deskách Merck potažených silikagelem 60 F₂₅₄. Pro sloupcovou chromatografii byl použit Merck Kieselgel 60 (0,040 – 0,063 mm) a pro gelovou chromatografii (SEC, z angl. Size exclusion chromatography,) Bio-Beads SX-1. Infračervená spektra (IR) byla měřena pomocí spektrofotometru Nicolet 6700 v režimu ATR. TLC-MS spektra byla zaznamenána na hmotnostním spektrometru Expression[®] Compact (Advion, USA) s jednokvadrátovým detektorem a APCI jako zdrojem ionizace.

¹H a ¹³C NMR spektra byla změřena pomocí NMR spektrometru Varian VNMR S500 (Varian, Palo Alto, CA, USA) nebo spektrometru Jeol JNM-ECZ600R (Jeol, Peabody, MA, USA). Chemické posuny jsou uváděny jako hodnoty δ v ppm a jsou nepřímo vztaženy k tetramethylsilanu prostřednictvím signálu z rozpouštědla. Hodnoty J jsou uvedeny v Hz. NMR data byla zpracována v programu MestReNova 14.3.0-30573.

UV/vis spektra byla zaznamenána pomocí spektrofotometru Shimadzu UV-2600 (Kjóto, Japonsko) při 20 °C nebo 25 °C (zabezpečeno držákem na kyvety chlazeným Peltierovým článkem). Všechna data byla zpracována pomocí softwaru UV Probe 2.42.

Fluorescenční spektra byla měřena pomocí spektrofluorimetru FLS1000 (Edinburgh Instruments, Livingston, Spojené království) a zpracována v softwaru Fluoracle V2.11.101. Kvantové výtěžky fluorescence Φ_F byly stanoveny v tetrahydrofuranu (THF) referenční metodou s použitím nesubstituovaného zinečnatého ftalocyaninu (ZnPc) jako referenční sloučeniny ($\Phi_F = 0,32$ v THF⁴¹,) metodou popsanou v literatuře¹³⁵ s $\lambda_{exc} = 593$ nm.

5.1 Studium syntézy periferně substituovaných křemičitých komplexů tetrapyrazinoporfyrinů

Bezkovové TPyzPz **1bN**, ⁴³ **1bS**, ¹³⁶ **1bO**, ¹³⁷ a **1bC**²⁴ byly připraveny podle publikovaných postupů (obr. 19, viz 6.1.2).

HRMS spektra byla zaznamenána pomocí UHPLC systému Acquity UPLC I. třídy (Waters, Milford, MA) spojeného s hmotnostním spektrometrem s vysokým rozlišením (Synapt G2Si, Waters, Manchester, U.K.) na bázi Q-TOF. Chromatografie pro HRMS byla provedena pomocí kolony Acquity UPLC Protein BEH C4 (2,1 mm × 50 mm, 1,7 μm, 300 Å) za použití gradientové eluce s acetonitrilem a 0,1% kyselinou mravenčí při průtoku 0,4 ml/min. Ionizace elektrosprejem byla provedena v režimu pozitivních iontů. Roztoky pro HR MS analýzu byly připraveny v 15% roztoku tetrahydrofuranu (THF) v acetonitrilu a před měřením byla přidána kyselina mravenčí pro podporu ionizace. MS spektra byla zaznamenána na hmotnostním spektrometru MALDI-TOF Shimadzu Biotech Axima Confidence.

5.1.1 Metoda inzerce

Postup byl převzat a poupraven z literatury.¹³⁸ Výchozí makrocykl bez centrálního atomu kovu TPyzPz **1bN**, **1bS**, **1bO** nebo **1bC** (50 μmol) byl rozpuštěn v bezvodém dichlormethanu (DCM) (12 ml) s tributylaminem (1,2 ml, 5 mmol). Směs byla zahřáta na 30 °C v atmosféře argonu a byl přidán trichlorsilan v odpovídajícím množství (viz níže). Reakční směs byla míchána při 30 °C dalších 30-300 min. Poté byla zakoncentrována za sníženého tlaku, rozpuštěna v ethylacetátu (50 ml), sonikována po dobu 10 minut a filtrována přes celit. Filtrát byl třepán s 1M roztokem HCl (50 ml) a poté vodou (50 ml). Organická vrstva byla vysušena pomocí bezvodého síranu sodného, zfiltrována a odpařena do sucha na vodní lázni za sníženého tlaku. Produkt byl přečištěn pomocí gelové chromatografie (SEC) (Bio-Beads SX-1, 23 g) za použití toluenu jako mobilní fáze. Sloučeniny během zpracování hydrolyzovaly, proto byly shromážděny údaje pro odpovídající dihydroxy Si(IV)TPyzPz **5N**, **5S**, **5O** a **5C** a nikoli pro vznikající dichlorderiváty.

Data pro **sloučeninu 5N**: Připraveno s 48 ekv. trichlorsilanu, reakční doba: 240 min; výtěžek 22,4 mg (37 %) ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 4,07 (q, $J = 7,0$ Hz, 32H, CH_2), 1,35 (t, $J = 7,0$ Hz, 48H, CH_3); ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ 151,18; 145,18; 139,46; 43,11; 13,16 ppm; IR (ATR): 3420, 2962, 2933, 2873, 2629 cm^{-1} ; HR MS vypočteno $[\text{M-OH}]^+$ 1133,6789; změřeno 1133,6771; MS (MALDI) nalezeno 1134,9 $[\text{M-OH}]^+$; UV/vis (THF): λ_{max} (ϵ) 655 (317 910), 596 (61 860), 512 (87 340), 376 nm (247 450 $\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$).

Data pro **sloučeninu 5S**: Připraveno s 12 ekv. trichlorsilanu, reakční doba: 90 min; výtěžek 13 mg (21 %) ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ 2,14 ppm (s, 72H, CH_3); ^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3) δ 161,07; 146,06; 141,98; 52,11; 30,60; 30,56; 30,53 ppm; IR (ATR): 2963, 2928, 2870 cm^{-1} ; UV/vis (THF): λ_{max} (ϵ) 649 (341 350), 622 (45 990), 587 (43 510), 474 (51 110), 379 nm (194 340 $\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$), $\Phi_{\text{F}} = 0,37$.

Data pro **sloučeninu 5O**: Připraveno s 24 ekv. trichlorsilanu, reakční doba: 120 min; výtěžek 15 mg (14 %) ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 7,55 (t, $J = 7,8$ Hz, 8H, ArH), 7,43 (d, $J = 7,8$ Hz, 16H, ArH), 3,32 (hept, $J = 6,9$ Hz, 16H, CH), 1,28 ppm (d, $J = 6,1$ Hz, 96H, CH_3); ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ 151,39; 149,81; 147,98; 142,50; 141,11; 126,52; 124,36; 28,14; 23,49 ppm; IR (ATR): 2957, 2925, 2857 cm^{-1} ; UV/vis (THF): λ_{max} (ϵ) 619 (81 860), 563 (13 960), 431 (32 240), 356 nm (54 970 $\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$), $\Phi_{\text{F}} = 0,32$.

Data pro **sloučeninu 5C**: Připraveno s 12 ekv. trichlorsilanu, reakční doba: 30 min; výtěžek 14 mg (29 %) ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ 7,58 (t, $J = 7,9$ Hz, 8H, ArH), 7,45 (d, $J = 7,9$ Hz, 16H, ArH), 3,33 (hept, $J = 6,8$ Hz, 16H, CH), 1,31 (d, $J = 6,4$ Hz, 96H, CH_3), 0,90 – 0,85 (m, 12H, CH_2), 0,72 (h, $J = 7,4$ Hz, 12H, CH_2), 0,54 (t, $J = 7,4$ Hz, 18H, CH_2), 0,30 (p, $J = 7,5$ Hz, 12H, CH_2), -0,13 (p, $J = 7,5$ Hz, 12H, CH_2), -1,42 – 1,49 ppm (m, 12H, CH_2). ^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3) δ 152,52; 147,74; 144,21; 141,04; 140,32; 126,67; 124,47; 33,26; 31,89; 31,55; 30,61; 29,69; 28,20; 23,52; 23,03; 22,58; 21,98; 20,86; 15,06; 14,12; 13,76; 11,77 ppm; IR (ATR): 2930, 2870, 1092 and 1065 (Si-O-Si) cm^{-1} ; UV/vis (THF): λ_{max} (ϵ) 617 (110 300), 593 (12 030), 562 (12 910), 417 (11 470) 358 nm (39 100 $\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$), $\Phi_{\text{F}} = 0,44$.

5.1.2 Axiální modifikace

Si(IV)TPyzPz 50 (169 mg, 88 nmol) byl rozpuštěn v suchém toluenu (20 ml) s pyridinem (5 ml) spolu s trihexylsilanolem (159 mg, 0,53 mmol) a zahříván pod zpětným chladičem na bod varu v atmosféře argonu po dobu 3 h. Reakční směs byla sledována pomocí TLC s použitím mobilní fáze hexan/ethylacetát 15:1. Poté byla reakční směs třikrát třepána s 1M HCl (25 ml) a vodou (25 ml). Organická vrstva byla odpařena za sníženého tlaku a přečištěna sloupcovou chromatografií s mobilní fází hexan/ethylacetát 15:1. Pro konečné čištění byla použita SEC chromatografie (Bio-Beads SX-1, 23 g) s toluenem jako mobilní fází, čímž bylo získáno 179 mg tmavě zeleného prášku (79 %). ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ 7,58 (t, $J = 7,9$ Hz, 8H, ArH), 7,45 (d, $J = 7,9$ Hz, 16H, ArH), 3,33 (hept, $J = 6,8$ Hz, 16H, CH), 1,31 (d, $J = 6,4$ Hz, 96H, CH_3), 0,90 – 0,85 (m, 12H, CH_2), 0,72 (h, $J = 7,4$ Hz, 12H, CH_2), 0,54 (t, $J = 7,4$ Hz, 18H, CH_2), 0,30 (p, $J = 7,5$ Hz, 12H, CH_2), -0,13 (p, $J = 7,5$ Hz, 12H, CH_2), -1,42 – 1,49 ppm (m, 12H, CH_2). ^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3) δ 152.52, 147.74, 144.21, 141.04, 140.32, 126.67, 124.47, 33.26, 31.89, 31.55, 30.61, 29.69, 28.20, 23.52, 23.03, 22.58, 21.98, 20.86, 15.06, 14.12, 13.76, 11.77 ppm; IR (ATR): 2930, 2870, 1092 and 1065 (Si-O-Si) cm^{-1} ; UV-vis (THF): λ_{max} (ϵ) 617 (110 300), 593 (12 030), 562 (12 910), 417 (11 470) 358 nm (39 100 $\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$), $\Phi_{\text{F}} = 0,39$.

5.1.3 Fotofyzikální monitoring inzerčních reakcí

V daných intervalech (10-60 minut) bylo odebráno 10 μl reakční směsi z komplexace Si(IV) do nekovových TPyzPz (postup viz výše). Vzorek byl zředěn v 2,5 ml bezvodého DCM a sonikován po dobu jedné minuty. Poté bylo 200 μl tohoto zásobního roztoku přeneseno do křemenné kyvety s 2,45 ml bezvodého DCM a okamžitě bylo změřeno jeho absorpční a fluorescenčně emisní spektrum ($\lambda_{\text{exc}} = 375$ nm pro **3S**, $\lambda_{\text{exc}} = 348$ nm pro **3O**, $\lambda_{\text{exc}} = 343$ nm pro **3C**).

5.2 Studium stability hořčnatých komplexů ftalocyaninů a tetrapyrazinoporfyrinů v kyselém prostředí

Látky studované v této části (obr. 26, viz kap. 6.2) byly připraveny podle publikací naší vědecké skupiny.^{41, 139, 140}

5.2.1 Příprava pufrů ve vodě rozpustných vzorků a hodnocení stability komplexů

Brittonův-Robinsonův pufr (obsahující 0,04 M H₃BO₃, 0,04 M H₃PO₄, 0,04 M CH₃COOH v celkovém objemu 120 ml) byl upraven na požadované hodnoty pH (7,4; 4,0; 3,0; 2,0) smícháním s příslušným objemem 0,2M NaOH (66; 23; 20; 6 ml). Pro pufr o pH 1,0 byl použit přídatek H₃PO₄ a 98% kyseliny octové. pH bylo měřeno pomocí pH metru pH 8+ DHS (XS Instruments), který byl před použitím kalibrován dvoubodově (pH 7,00 a 4,00). Pro přípravu zkoumaného roztoku o koncentraci 1 μM bylo přidáno 25 μl zásobního vodného roztoku (100 μM) hydrofilních sloučenin (**ws-TPyzPzMg**, **ws-TPyzPzZn**, **ws-PcMg** a **ws-PcZn**) k 2,48 ml testovaného pufru v křemenné kyvetě. Absorpční spektra byla zaznamenána bezprostředně po rozpuštění. A poté ve zvolených časových intervalech (30 s až 30 min) v závislosti na rychlosti procesu demetalace, obvykle až do 24 h.

5.2.2 Spektrální měření v organickém rozpouštědle, příprava vzorků a hodnocení stability komplexů

Zásobní roztok (2 ml, 1 μM) lipofilních sloučenin (**TPyzPzMg**, **TPyzPzZn**, **PcMg**, **PcZn**, **TPyzPzH₂** a **PcH₂**) v bezvodém benzenu (Sigma-Aldrich, voda <0,001 %) byl přenesen do křemenné kyvety. Pro titrační experimenty byl použit specifický objem trifluoroctové kyseliny nebo roztoky kyseliny dichloroctové (Carlo-Erba) v bezvodém benzenu. Absorpční spektra byla zaznamenána bezprostředně po každém přidavku činidla.

Pro stanovení k_{eff} bylo použito 2,49 ml připraveného zásobního roztoku zkoumané sloučeniny v benzenu (1 μM) v křemenné kyvetě s 10 μl připraveného roztoku kyseliny dichloroctové v bezvodém benzenu (konečná koncentrace v kyvetě byla 7,17 mM; 9,56 mM; 11,95 mM; 14,34 mM a 16,73 mM). Absorpční spektra byla zaznamenána během 24 h s časovým intervalem 1 h v kyvetovém držáku temperovaném na 20 °C. Rychlostní konstanta k_{eff} pro demetalaci mgTPyzPzH^+ na **TPyzPzH₂** v prostředí benzenu/ kyseliny dichloroctové byla určena z lineární závislosti $\log(c_0/c)$ na čase t , kde c_0 a c jsou koncentrace protonizovaného mgTPyzPzH^+ v roztoku na začátku a v čase t . Všechna spektra uvedená v článku byla korigována na zředění.

5.2.3 Příprava mikroemulzí a hodnocení stability komplexů

Zásobní roztok lipofilních sloučenin **TPyzPzMg** nebo **PcMg** v THF (100 μM) o objemu 1,25 ml byl přidán k 72 mg směsi polyethoxylovaného hydrogenovaného ricinového oleje (PEG-35 Hydrogenated Castor Oil, Cremophor[®] EL, BASF, Ludwigshafen, Německo) a 29 mg triacylglyceridů se středně dlouhým řetězcem (Ecogreen oleochemicals, splňující specifikace Ph. Eur.) rozpuštěných ve 4 ml chloroformu. Rozpouštědlo bylo odpařeno ve vodní lázni temperované na 40 °C a za sníženého tlaku udržované pod 5 mbar 30 min. Následně byly přidány 4 ml Britton-Robinsonova pufru o pH 7,40 a směs byla 5 min vortexována. Po homogenizaci, byl objem upraven na 5 ml v odměrné baňce. Připravená mikroemulze obsahovala barvivo o koncentraci 25 μM zapracované do olejových částic. Mikroemulze s tímto složením již byla charakterizována pomocí dynamického rozptylu světla s přibližnou velikostí částic přibližně 300 nm.⁷ Během následujících experimentů byla zásobní mikroemulze (100 μl) přidána do křemenné kyvety s pufrům o daném pH (2,4 ml), přičemž vznikla směs o konečné koncentraci testované sloučeniny 1 μM . Absorpční spektra byla zaznamenána ihned po smíchání a poté během 24 h ve vhodných časových intervalech (2-30 min) v závislosti na rychlosti demetalačního procesu.

5.2.4 Příprava lipozomů a hodnocení stability komplexů

Velké unilamelární vezikuly (LUVET, z angl. Large unilamellar vesicles extrusion technique) byly připraveny technikou vytlačování ze suspenze multilamelárních vezikul (MLV) následujícím postupem. Dioleoylfosfatidylcholin (DOPC, 19,7 mg, 25 mol) (Lipoid GmbH, Německo) byl rozpuštěn v chloroformu a k němu přidán zásobní roztok **TPyzPzMg** nebo **PcMg** (0,25 ml, 100 μM) v THF. Rozpouštědla byla odpařena ve 100 ml destilační baňce na vodní lázni temperované na 37 °C po dobu 30 min pod tlakem 5 mbar. Následně byl přidán 1 ml Britton-Robinsonova pufru o pH 7,4 a lipidy s barvivem byly převedeny do pufru ze stěn baňky jemným krouživým pohybem. Připravená suspenze byla 5 min vortexována, aby se vytvořily multilamelární vezikuly (MLV, z angl. Multilamellar vesicles), a ponechána 24 h při rt a za nepřístupu světla. Poté byla při rt suspenze 21 \times protlačena tam a zpět skrze dva nad sebou umístěné polykarbonátové filtry (velikost pórů 100 nm) pomocí malého ručního extrudéru (LipozoFast Basic, Avestin). Připravená suspenze lipozomů obsahovala sloučeninu v koncentraci 25 μM

inkorporovanou v LUVET s koncentrací lipidů DOPC 25 mM, tedy v poměru sloučenina:lipidy 1:1000. Lipozomy s tímto složením již byly v naší laboratoři charakterizovány pomocí dynamického rozptylu světla s přibližnou hodnotou velikostí přibližně 128 nm.¹⁴¹ Následně byla do 2,4 ml testovaného pufru v křemenné kyvetě přidáno 100 µl zásobní lipozomální suspenze, čímž se připravila testovaná směs o konečné koncentraci barviva 1 µM. Absorpční spektra byla zaznamenána vzápětí v průběhu 24 h s časovými intervaly 2-30 min.

5.3 Studium vlastností ftalocyaninových fotosenzitizérů při světlem indukovaném uvolňování lipozomálního obsahu

5.3.1 Fotosenzitizéry

Ps1 byl zakoupen od společnosti Frontier Scientific (Newark, DE, USA); **Ps2-4** byly připraveny již dříve publikovanými metodami.¹⁴²⁻¹⁴⁴ Zásobní roztoky použité ve většině experimentů byly připraveny ve fosfátovém pufovaném roztoku (PBS, z angl. phosphate buffer saline) v 100µM koncentraci a byly skladovány ve tmě při laboratorní teplotě bez změn koncentrace po dobu několika týdnů. Vzhledem k nižší rozpustnosti **Ps3** v PBS byl zásobní roztok připraven v dimethylsulfoxidu (DMSO) o 10mM koncentraci a před experimenty vždy čerstvě naředěn do PBS na 1µM koncentraci (obsah DMSO tedy činil 0,01 %) nebo na jinou požadovanou koncentraci.

Kvantové výtěžky fluorescence (Φ_F) v DMSO byly stanoveny absolutní metodou s použitím integrační sféry ve spektrofluorimetru FLS 1000 (Edinburgh Instruments) s absorbcí vzorku v Q-pásmu s $\lambda_{\max} \leq 0,1$, aby se zabránilo efektu vnitřního filtru. Všechna stanovení jsou průměrem tří samostatných stanovení.

Kvantové výtěžky produkce singletového kyslíku (Φ_Δ) byly stanoveny v DMSO podle dříve publikovaného postupu.¹³⁵ Ten používá ke kvantifikaci zhášec singletového kyslíku 1,3-difenyliisobenzofuran (DPBF) a nesubstituovaný zinečnatý ftalocyanin (ZnPc) jako referenční sloučeninu ($\Phi_\Delta = 0,40$ v DMSO)¹⁴⁵.

Pro stanovení log P byl smíchán zásobní roztok (20 µl, 100 µM) Ps s PBS (380 µl) a n-oktanol (400 µl), 5 minut vortexován a poté 10 minut odstředován při 10 000 otáčkách za minutu. Do kyvety s 2 ml DMSO bylo přidáno 20 µl oktanolové vrstvy a

bylo zaznamenáno fluorescenční emisní spektrum ($\lambda_{\text{exc}} = 360 \text{ nm}$). Střední část mezi vrstvami byla odstraněna a poté do kyvety s 2 ml DMSO přidáno 20 μl PBS vrstvy a za stejných podmínek změřeno fluorescenční emisní spektrum. v případě **Ps3** bylo 400 μl zásobního roztoku o koncentraci 1 μM v PBS smíchali se 400 μl n-oktanolu. Hodnota $\log P$ byla vypočítána pomocí následující rovnice:

$$\log P = \log \frac{F_{(n\text{-oktanol})}}{F_{(PBS)}},$$

kde $F_{(n\text{-oktanol})}$ a $F_{(PBS)}$ jsou intenzity fluorescence v λ_{max} spektra vzorku v oktanolu a PBS.

5.3.2 Lipozomy

Dva typy lipozomů byly připraveny v celkové koncentraci lipidů 20 mg/ml v dávkách 10 ml podle publikovaného postupu.¹⁴⁶ **EYPC** lipozomy byly připraveny z L- α -fosfatidylcholinu vaječného žloutku (EYPC, Sigma-Aldrich) a cholesterolu (Chol, Sigma-Aldrich) v molárním poměru 55:45 (EYPC:Chol). **DOPC** lipozomy byly připraveny z 1,2-dioleoyl-sn-glycerol-3-fosfatidylcholinu (DOPC, Lipoid) a Chol v molárním poměru 60:40 (DOPC:Chol). Směs lipidů (200 mg) byla rozpuštěna ve 2 ml absolutního ethanolu při 60 °C. Následně byl k roztoku lipidů přidán přehřátý pufr síranu amonného (8 ml, 250 mM, pH 5,5, 60 °C) za vzniku bílé neprůhledné lipidové emulze. Tato emulze byla desetkrát extrudována přes dvě na sobě položené polykarbonátové membrány (velikost pórů 100 nm a 80 nm, Genizer, Irvine, CA, USA) pomocí plášťového extrudéru poháněného stlačeným dusíkem (Genizer, Irvine, CA, USA) při 60 °C. Zbytek síranu amonného byl odstraněn dialýzou pomocí 800 ml dialyzačního roztoku (10 mM HEPES v 10% sacharóze) s použitím dialyzační trubičky s celulóзовou membránou (Sigma-Aldrich) s dvěma dalšími výměnami pufru. Dialýza byla prováděna při 8 °C.

Sloučeniny použité jako kargo lipozomů - basic orange 14 (**BO14**, Carl Roth) doxorubicin hydrochlorid (**DOX**; referenční standard Evropského lékopisu, Sigma-Aldrich) byly zpracovány tak, aby byl získán konečný molární poměr 10:1 (lipidy:kargo). Proces inkorporace byl proveden smícháním připravených lipozomů s příslušným zásobním roztokem karga (20 mg/ml nebo 10 mg/ml pro **BO14** a **DOX**) při rt a následném zahřátí na 60 °C po dobu 30 min. Připravené lipozomy byly dialyzovány, jak

je popsáno výše, a úplný transfer látek do kavity byl potvrzen tím, že po každém kroku dialýzy nebyly v dialyzačním pufru zjištěny žádné zbytky karga.

Velikost a index polydisperzity (PDI) lipozomů byly stanoveny pomocí přístroje Zetasizer Nano-ZS (Malvern, UK) prázdné lipozomy, lipozomy s oběma látkami jednotlivě a pro lipozomy s obsahem látek a s interkalovaným **Ps** (poměr lipidů a **Ps** 50:1) před a po ozáření laserem (685 nm, 400 mW·cm⁻², 600 s).

5.3.3 Studium inkorporace fotosenzitizerů do lipozomů

Byl připraven roztok **Ps** v pufru PBS (1 μM) a 2 ml byly přeneseny do křemenné kyvety. Následně byl objem titrován zásobním roztokem lipozomů **EYPC** (33,47 mM). Po každém přidavku byl roztok míchán po dobu 2 minut a ihned poté bylo zaznamenáno absorpční a emisní fluorescenční spektrum **Ps** ($\lambda_{ex} = 608$ nm).

5.3.4 Uvolnění lipozomálního obsahu světelnou indukci

PBS pufru (2 ml) **EYPC** nebo **DOPC** lipozomů obsahujících **BO14** nebo **DOX** ($c_{lipozomy} = 62,5$ μM) byl smíchán s 25 μl 100μM roztoku **Ps1-2** a **Ps4** a míchán po dobu 2 minut (resp. 10 min) v křemenné kyvetě, což vedlo ke konečnému $c_{Ps} = 1,25$ μM, $c_{lipozomy} = 60$ μM a poměru lipidů a **Ps** 50:1. v případě **Ps3** byly 2 ml jeho 1,25μM roztoku v PBS pufru smíchány se zásobním roztokem lipozomů (4 μl), aby se získal poměr lipid:Ps 50:1, a míchán po dobu 2 minut. Připravené vzorky byly kontinuálně ozařovány skrze horní část kyvety výkonově nastavitelnou laserovou diodou (685 nm, 400 mW·cm⁻²) za současného míchání po dobu 10 minut v tepelném držáku fluorimetru nastaveném na 23 °C. Emise fluorescence byla měřena pro **BO14** ($\lambda_{em} = 533$ nm, $\lambda_{ex} = 485$ nm) nebo **DOX** ($\lambda_{em} = 585$ nm, $\lambda_{ex} = 480$ nm) každých 8,6 sekundy po celou dobu ozařování. Nakonec bylo do směsi přidáno 210 μl 10% Tritonu X-100 ve vodě, aby se lipozomy rozpadly, a opět byla zaznamenána emisní fluorescenční spektra karga. Jako referenční vzorek pro stanovení 100 % obsahu karga byly použity lipozomy obsahující odpovídající kargo, ale bez **Ps** inkorporovaných do lipozomální stěny, ty byly bez ozařování ihned ošetřené Tritonem X-100. Procento uvolněného karga po ukončení ozařování bylo vypočteno pomocí následující rovnice:

$$\text{maximální uvolnění (\%)} = 100 \times \frac{F}{F_0},$$

kde F a F_0 jsou intenzity fluorescence vzorků po závěrečném ošetření Tritonem X-100 studovaného vzorku (F) a referenčních lipozomů s kargem, ale bez Ps a neozářených (F_0). Procento uvolnění v každém čase ozařování bylo extrapolováno z této hodnoty, protože fluorescence karga v PBS se liší od jeho fluorescence v PBS s Tritonem-X 100.

5.3.5 Fotodegradace fotosenzitizérů inkorporovaných do lipozomů

Vzorek EYPC nebo DOPC lipozomů nesoucích **BO14** nebo **DOX** ($c_{\text{lipid}} = 62,5 \mu\text{M}$) v PBS pufru (2 ml) byl smíchán s 25 μl 100 μM roztoku **Ps1-2** a míchán po dobu 2 minut v křemenné kyvetě, což vedlo ke konečné koncentraci $c_{\text{Ps}} = 1,25 \mu\text{M}$, $c_{\text{lipid}} = 60 \mu\text{M}$ a poměru lipidů a barviva 50:1. Pro **Ps3** byl jeho 1,25 μM roztok v PBS pufru (2 ml) smíchán se základním roztokem lipozomů (4 μl), aby se získal poměr lipid:fotosenzitizér 50:1, a míchán po dobu 2 minut. v případě **Ps4** byla doba míchání prodloužena na 10 minut. Poté bylo zaznamenáno absorpční spektrum a vzorek byl po danou dobu ozařován laserovou diodou s nastavitelným výkonem (685 nm, 400 mW cm⁻²). Absorpční spektrum bylo zaznamenáno po každé době ozařování.

5.4 Studium efektivity azid-alkynové cykloadice při modifikaci oligonukleotidů

Cyanine5 azid (**Cy5**, kat. č. D3030) byl zakoupen u společnosti Lumiprobe (Hannover, Německo). Ostatní sloučeniny byly připraveny podle publikovaných metod (**ACR**¹⁴⁷, **BDP**,¹⁴⁸ **TPyzPz**¹⁴⁹) (obr. 49, viz kap. 6.4.1). Oligodeoxynukleotidové sekvence na pevné fázi byly zakoupeny u společnosti Generi Biotech (Hradec Králové, Česká republika). Hmotnostní spektra MALDI-TOF byla změřena v negativním reflektorném módu pomocí MALDI Autoflex II (Bruker Daltonics, Německo) využívajícím jako matrici kyselinu α -kyano-4-hydroxyskořicovou s přidavkem HCl. Pro přípravu pufrů byl použit pH meter Druopta (Praha, Československo).

5.4.1 Syntéza oligonukleotidů

ON byly syntetizovány na syntetizérech DNA/RNA Perkin Elmer Applied Biosystem 392/394 v počátečním množství 1 mmol za použití standardní purifikace s použitím buď FAST chráněných (pro značení **AzaPc** a **BDP**), nebo UltraMILD chráněných nukleosid fosforamiditových monomerů (pro značení **ACR** a **Cy5**), kterou provedla firma Generi

Biotech (Hradec Králové, Česká republika). Syntéza probíhala na skleněných nosičích s definovanou velikostí pórů (500 Å, 1000 Å, 2000 Å) zakoupených od firmy Merck (Schnelldorf, Německo) a na polystyrenových nosičích zakoupených od firmy Glen Research Inc. (Sterling, VA, USA). Dibenzoazacyklooktynem modifikované fosforamiditové stavební bloky byly zakoupeny od společnosti Glen Research Inc. (Sterling, VA, USA); 5'-DBCO-TEG Phosphoramidite kat. č. 10-1941 a DBCO-dT-CE Phosphoramidite kat. č. 10-1539 pro pozice 2 a 10. Část každé šarže odpovídající 30 nmol ON modifikovaného pomocí DBCO (**ON-DBCO**) byla izolována pomocí HPLC a analyzována na MALDI-TOF MS k prokázání totožnosti. **ON-DBCO 3'** MS (MALDI) vypočteno $[M]^+$ 7572,2 nalezeno 7574,550 $[M]^+$; **ON-DBCO X** MS (MALDI) vypočteno $[M]^+$ 7572,2 nalezeno 7573,923 $[M]^+$; **ON-DBCO 5'** MS (MALDI) vypočteno $[M]^+$ 7671,7 nalezeno 7674,354 $[M]^+$;

5.4.2 Značení a deprotektce

Azidové deriváty značících molekul byly rozpuštěny v MeOH (**ACR**) nebo THF (**AzaPc**, **BDP**, **Cy5**) pro přípravu 0,1mM; 1mM; 10mM a 100mM zásobních roztoků. Reakce probíhala s množstvím pevné fáze odpovídající 30 nmol navázaného ON. Po přidání zásobního roztoku značek (200 μ l, resp. 400 μ l v případě 0,1mM roztoku) byla reakční směs třepána ve skleněné vialce o objemu 1,5 ml po dobu 24 h při 23 °C. Poté byl značící roztok odstraněn odpipetováním, pevná fáze 3x promyta příslušným rozpouštědlem a následně vysušena za atmosférického tlaku. Meziprodukt byl zpracován následným třepáním buď pomocí 500 μ l 32% roztoku amoniaku ve vodě (Merck, Schnelldorf, Německo) po dobu 24 h (**AzaPc-ON**, **BDP-ON**), nebo pomocí 0,05M K_2CO_3 v MeOH po dobu 8 h (**Ac-ON**), resp. 2 h (**Cy5-ON**). Výsledná směs byla přefiltrována přes gelovou filtrační kolonu (CentriPure N10 Zetadex Gel Filtration columns, Emp Biotech GmbH, Berlin, Německo). Odebraná frakce 1-2 ml byla odpařena do sucha ve vysokém vakuu (4 mbar) pomocí SpeedVac 2030 (ThermoFisher, USA). Nakonec byly všechny vzorky rekonstituovány v 60 μ l čištěné vody, důkladně vortexovány a převedeny do vialek s inzerty.

5.4.3 Chromatografické podmínky

Chromatografická analýza a separace byly provedeny pomocí chromatografu Shimadzu LC20 Prominence (Kjóto, Japonsko), který se skládá z odplyňovače mobilní fáze DGU-20A3, dvou binárních gradientových čerpadel LC-20 AD, autosampleru SIL-20 AC se smyčkou na 100 μ l vzorku, kolonového prostoru CTO-20 AC, detektoru SPD-M20A s fotodiodovým polem (PDA) a komunikačního modulu CBM-20 AC.

Acetonitril a methanol (MeOH) v gradientové kvalitě pro HPLC byly zakoupeny od společnosti VWR (Praha, Česká republika). Kyselina octová (Ph. Eur. reagent) byla získána od firmy Merck (Schnellendorf, Německo). Triethylamin (TEA) byl zakoupen od společnosti Fluorochem (Hadfield, Velká Británie). Voda Milli-Q byla vyrobena pomocí purifikačního systému Millipore (Schwalbach, Německo). 50mM pufr TEAA byl připraven vždy v čase potřeby z 2M zásobního roztoku upraveného na pH 7 a filtrován na nylonové membráně 0,22 μ m, 47 mm (GVS North America, USA).

Byla použita kolona Clarity Oligo-RP™, 3 μ m, 4,6 x 100 mm (Phenomenex, USA) založená na technologii Gemini Two-In-One Technology™ s jádrem z oxidu křemičitého (IV) s původní křemičito-organickou vrstvou.

Stabilita této kolony je v rozmezí pH 0-12 a teploty do 60 °C a je vhodná pro analýzu a čištění barvivem značených a modifikovaných syntetických ON do délky 60 merů. Termostat byl nastaven na 40 °C a průtok mobilní fáze byl nepřetržitě 1 ml/min; vstříkovaný objem vzorku byl 1 μ l. Mobilní fáze byla připravena smícháním iontově párovacího rozpouštědla (50 mM TEAA) a acetonitrilu v gradientové metodě od 10 % organické fáze až po 46 % (**ACR-ON**) nebo 85 % (**AzaPc-ON**, **BDP-ON** a **Cy5-ON**) během 10 min a poté isokraticky eluována po dobu 3 min a 2 min v případě **ACR-ON**. v obou metodách pak během 5 minut proběhla ekvilibrace.

Všechny chromatogramy byly zaznamenány při vlnových délkách odpovídajících absorpčním maximům jednotlivých analytů (**Cy5-ON** – 260 a 650 nm; **ACR-ON** – 260 a 450 nm, **BDP-ON** – 260 a 500 nm, **AzaPc-ON** – 260 a 650 nm). Všechna získaná data byla zpracována pomocí softwaru LabSolution, verze 5.3 (Shimadzu, Kyoto, Japonsko). Každý typ modifikovaného ON byl izolován pomocí HPLC a analyzován na MALDI-TOF MS k prokázání totožnosti.

AzaPc-ON 3' MS (MALDI) vypočteno $[M]^+$ 9164,99 nalezeno 9166,893 $[M]^+$;
AzaPc-ON X MS (MALDI) vypočteno $[M]^+$ 9164,99 nalezeno 9166,313 $[M]^+$;
AzaPc-ON 5' MS (MALDI) vypočteno $[M]^+$ 9265,49 nalezeno 9267,032 $[M]^+$;

Cy5-ON 3' MS (MALDI) vypočteno $[M]^+$ 8136,56 nalezeno 8144,349 $[M]^+$; **Cy5-ON X**
MS (MALDI) vypočteno $[M]^+$ 8136,56 nalezeno 8150,510 $[M]^+$; **Cy5-ON 5'** MS
(MALDI) vypočteno $[M]^+$ 8237,06 nalezeno 8239,665 $[M]^+$;

BDP-ON 3' MS (MALDI) vypočteno $[M]^+$ 7981,4 nalezeno 7972,090 $[M]^+$; **BDP-ON X**
MS (MALDI) vypočteno $[M]^+$ 7981,4 nalezeno 7973,92 $[M]^+$; **BDP-ON 5'** MS (MALDI)
vypočteno $[M]^+$ 8081,9 nalezeno 8093,920 $[M]^+$;

ACR-ON 3' MS (MALDI) vypočteno $[M]^+$ 8004,46 nalezeno 8005,233 $[M]^+$; **ACR-ON**
X MS (MALDI) vypočteno $[M]^+$ 8004,46 nalezeno 8005,745 $[M]^+$; **ACR-ON 5'** MS
(MALDI) vypočteno $[M]^+$ 8104,96 nalezeno 8106,281 $[M]^+$;

6 Výsledky a diskuze

Ve své disertační práci jsem se zabývala několika různými tématy, která jsou však propojena jedním společným jmenovatelem a tou je praktické využití Pc a TPyzPz v oblasti molekulárně biologické a biochemické diagnostiky, a potenciálně i terapie nádorových onemocnění. Naše výzkumná skupina AzaPc group se již celou řadu let věnuje výzkumu těchto látek s velkým a rozmanitým potenciálem v lékařských vědách ať už v přímé terapii prostřednictvím PDT nebo v diagnostice díky fluorescenci a schopnosti zhášení excitovaných stavů pomocí ICT. Nicméně během této doby opakovaně naráží na limity v jejich praktickém využití zapříčiněné jejich nízkou polaritou a výraznou agregací. I když od objevení Pc v roce 1907 uplynulo už více než 100 let, jsou zde stále neobjasněné aspekty těchto struktur, což skýtá velký prostor pro další výzkum. Tato práce je proto přehledem několika samostatných projektů zabývajících se různými problémy, na které nejen naše skupina při svém výzkumu narážela. Mým úkolem bylo posunout znalosti v těchto oblastech dále a přispět tak k lepšímu pochopení jejich chování.

6.1 Studium syntézy periferně substituovaných křemičitých komplexů tetrapyrazinoporfyrinů

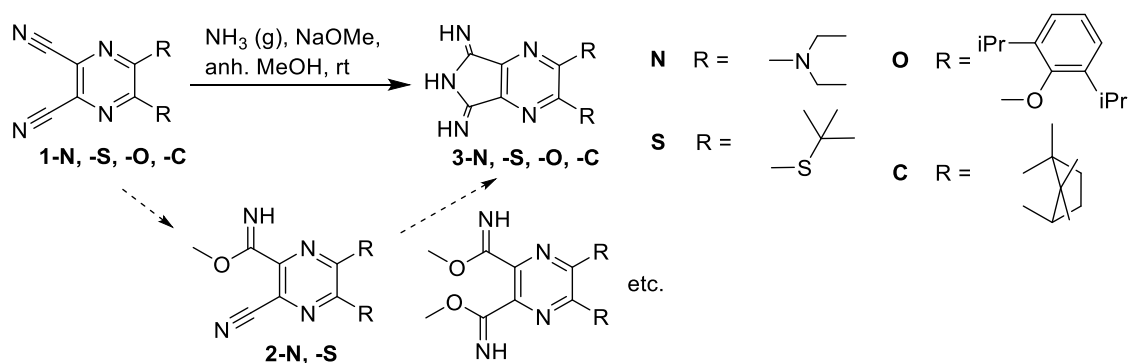
První část této disertační práce pojednává o problematice přípravy symetrických křemičitých komplexů TPyzPz s různou periferní substitucí a studiem vlivu charakteru této substituce na jejich reaktivitu. Zkoumá využití dvou syntetických postupů – klasické templátové i modernější inzerční metody. Dále se zabývá možnostmi a limitacemi axiální substituce křemičitého TPyzPz komplexu. Do této doby se veškerá literatura zabývala pouze přípravou křemičitých Pc komplexů¹⁵⁰⁻¹⁵², ale zmínky o křemičitých komplexech TPyzPz se objevovaly pouze sporadicky.¹⁵³⁻¹⁵⁶

Výsledkem tohoto projektu byla publikace **P1**.¹⁵⁷ Na tomto článku jsem se podílela vývojem syntéz, monitoringem reakcí, zpracováním dat a spoluprací na manuskriptu. Veronika Nováková se podílela finálním zpracováním dat a tvorbou manuskriptu. Petr Zimčík a Světlana Ivanova se podíleli editací manuskriptu, Miroslav Miletín návrhem koncepce projektu, metodik reakcí a na přípravě manuskriptu.

Původním záměrem tohoto projektu byla příprava periferně i axiálně modifikovaných křemičitých komplexů TPyzPz, které by sloužily k fluorescenčnímu, potenciálně až teranostickému značení ON podobně jako Pc.^{150, 158} Tedy TPyzPz s periferní substitucí vhodnou pro vysoké výtěžky fluorescence nebo singletového kyslíku a zároveň skupinou vhodnou pro konjugaci s ON (azidová skupina) nesenou na axiální pozici.

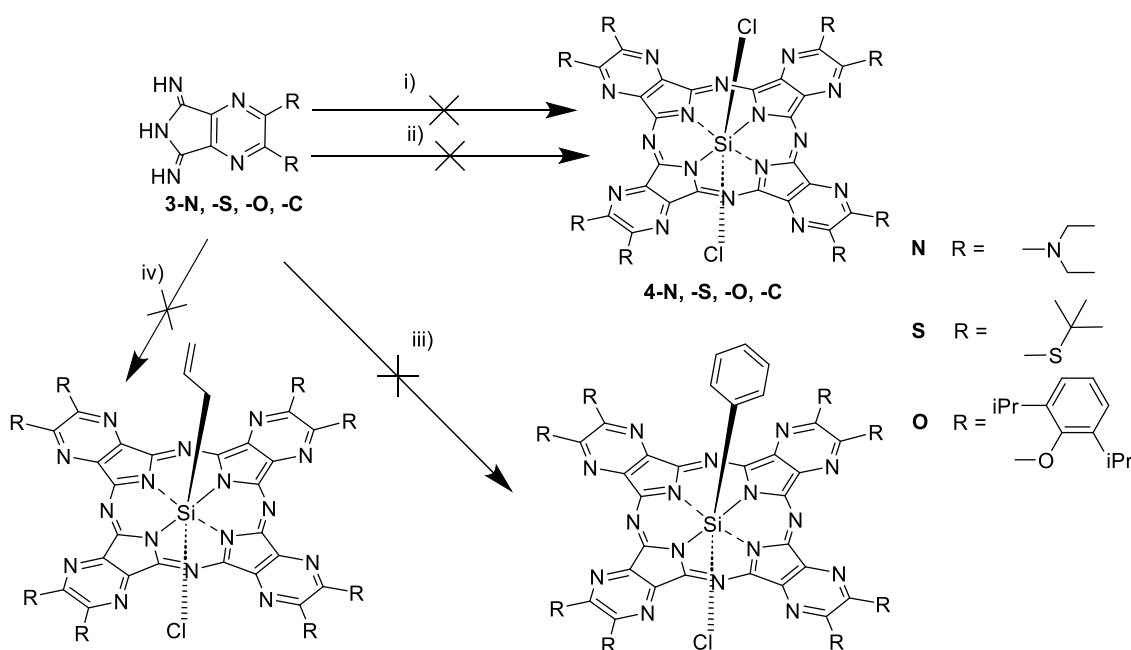
6.1.1 Templátová metoda

Nejprve byl pro přípravu cílových TPyzPz použit postup založený na konverzi 5,6-disubstituovaných pyrazin-2,3-dikarbonitrilů na příslušné diiminoisindoly probubláváním amoniakem v přítomnosti methoxidu sodného jako báze (obr. 17). Tyto reaktivnější meziproducty by v následném kroku měly ochotněji poskytnout cílový cyklotetramer. V rámci série byly pozorovány významné rozdíly při přípravě zmíněných diiminoisindolinů. Prekurzor **1-C** byl téměř úplně převeden na **3-C** (ověřeno pomocí TLC-MS) během 45 minut už při pokojové teplotě. Mírné zvýšení teploty, ať už během reakce nebo během následného zpracování, vyústilo v okamžitou a plnou cyklotetramerizaci na příslušný bezkovový TPyzPz. Naopak sloučeniny **1-S** a **1-N** vyžadovaly zvýšenou teplotu 60 °C a reakční dobu 3,5, resp. 60 h. V souladu s podobným pozorováním v literatuře¹⁸ substituce alkylsulfanylovou a alkylaminoskupinou zlepšila stabilitu vznikajících intermediátů **2-S** a **2-N** natolik, že tyto deriváty byly pozorovány během reakce pomocí TLC. Zatímco meziproduct **2-S** se okamžitě přeměnil na konečný **3-S**, přeměna meziproductu **2-N** na **3-N** byla výrazně pomalejší, takže jej bylo možné pozorovat i po 12 hodinách reakce, kdy jsme jej vyizolovali ve výtěžku 20 %. Dodatečné množství methoxidu sodného nebo charakter rozpouštědla (bezvodý methanol nebo butanol) neměly na průběh reakce žádný vliv. Prekurzor **1-N** byl termolabilní, takže zahříváním docházelo k výraznému rozkladu.



Obrázek 17 Schéma syntézy reaktivnějších meziproductů templátovou metodou pro přípravu TPyzPz.

Po zahřátí příslušných diiminoisoindolů (**3-N**, **-S**, **-O**) v pyridinu v přítomnosti templátu SiCl₄ se reakční směs zbarvila do tmavě zelené barvy, což svědčí o vzniku cyklotetrameru. Přítomnost velkého množství amorfni hmoty, však značně komplikovalo uspokojivé zpracování této reakce. Ke značným ztrátám produktu docházelo i při purifikaci produktu pomocí sloupcové chromatografie. Při různých obměnách a kombinací různých postupů^{151, 153, 159-161} (obr. 18) jsme naráželi na stále stejné problémy při zpracování a komplikace analýz všudypřítomnými siloxanovými nečistotami, které byly ve značné míře patrné na NMR spektru produktu i po mnohonásobném čištění. Z důvodu popsaných komplikací jsme se rozhodli zaměřit na druhou metodu přípravy makrocyklu, a to inzerci křemičitého kationtu do bezkovového TPyzPz.

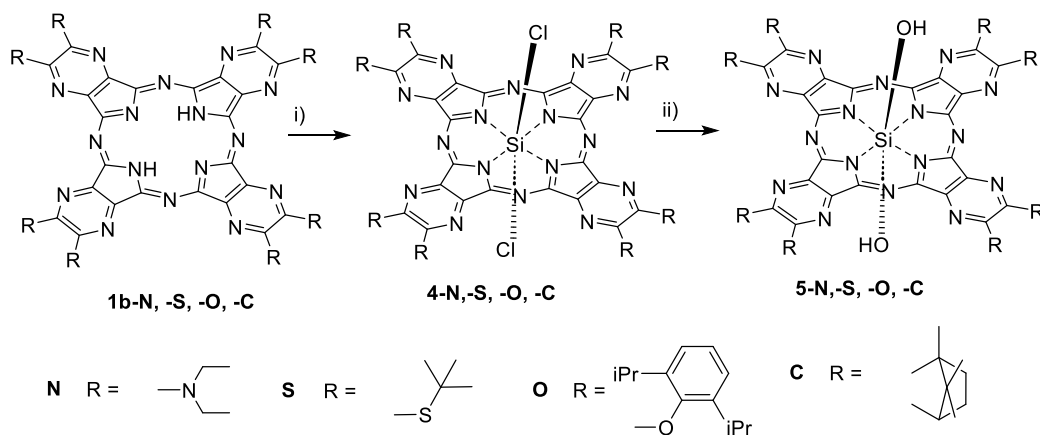


Obrázek 18 Pokusy o přípravu křemičitého TPyzPz pomocí templátové metody i) chinolin/pyridin, tetrachlorsilan, ii) pyridin, trichlorsilan, iii) tetralin, tributylamin, urea, trichlorfenylsilan, 120 °C, iv) DCM, tributylamin, allyldichlorsilan, v) toluen, pyridin, allyldichlorsilan, 110 °C.

6.1.2 Inzerce křemičitých kationtů do bezkovových tetrapyrazinoporfyrinů

Teorie této metody byla popsána výše (viz kap. 3.1.1), nicméně pro syntézu křemíkových Pc byla v praxi popsána jen výjimečně^{138, 162} a pro TPyzPz zatím vůbec ne. Vzhledem k podobnosti struktury těchto makrocyklů jsme tedy výchozí podmínky pro přípravu křemičitých TPyzPz převzali podle přípravy křemičitých komplexů Pc. Jako výchozí látky byly použity bezkovové TPyzPz **1bN**, **1bS**, **1bO** a **1bC** (obr 19). Ty byly připravené

Lindsteadovou cyklotetramerizací prostřednictvím butanolátu hořečnatého, po které následovala demetalace příslušných hořečnatých komplexů pomocí kyseliny *p*-toluensulfonové (viz kap. 3.1.1).^{38, 136, 163} Bezkovové TPyzPz byly podrobeny reakci s trichlorsilanem v prostředí dichlormethanu s tributylaminem.

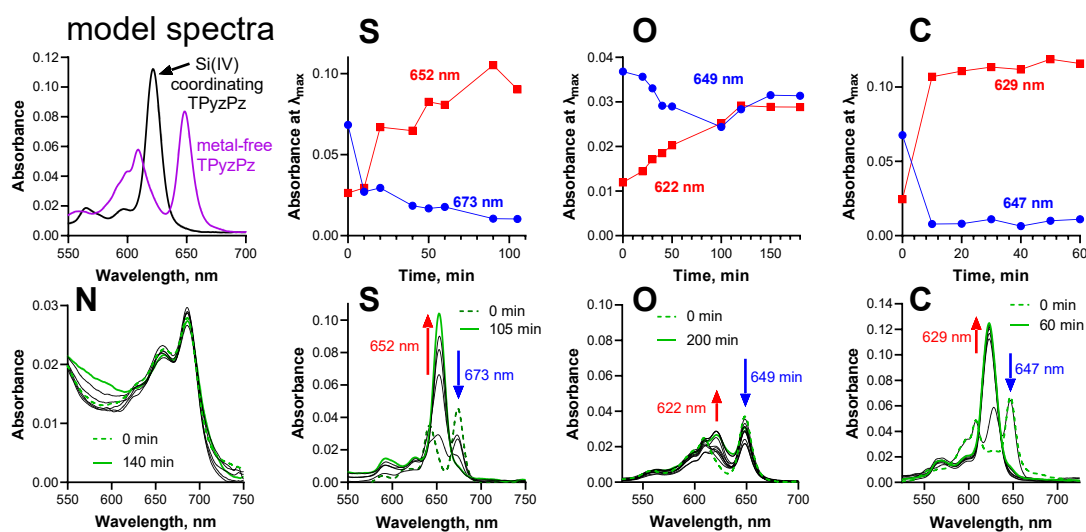


Obrázek 19 Syntéza křemičitých TPyzPz i) trichlorsilan, tributylamin, bezvodý DCM, Ar, 30 °C; ii) H₂O. Celkové výtěžky 14-37 %.

Sledování inserce pomocí TLC bylo zkomplikováno hned několika překážkami z důvodu silného chvostování produktů reakce. Vznikající dichlor-deriváty navíc samovolně hydrolyzovaly na dihydroxy deriváty působením vzdušné vlhkosti. Jednoznačný důkaz o inkorporaci křemičitého kationtu nám dala pouze UV/vis spektroskopie na základě rozdílů v Q-pásmu (obr.19, modelová spektra) (viz kap. 3.1.2).^{40, 164} Tato skutečnost a zkušenosti z templátové metody nás přiměly prozkoumat rozdíly reaktivity makrocyclů s různou periferní substitucí a porovnat jejich reaktivitu.

Úvodem každého experimentu jsme ověřili, zda přítomnost tributylaminu nezpůsobuje deprotonaci centrálních atomů dusíku makrocyclu. Ta by mohla mít velmi podobný vliv na absorpční spektra komplexů jako inserce centrálního atomu. Následně byl průběh reakce sledován poklesem pásů s nižší energií v rozštěpeném Q-pásmu a současným vznikem nového nerozštěpeného Q-pásmu odpovídajícího křemičitému komplexu TPyzPz (obr. 20). V literatuře se pro přípravu SiPc touto metodou používá nadstandardní přebytek trichlorsilanu (obvykle 24 ekv.),¹³⁸ my jsme však jeho množství snížili pouze na 12 ekvivalentů. Výsledkem bylo zpomalení reakční rychlosti a lepší monitoring průběhu reakce a rozdíly v rámci studované série. Kromě toho poloviční množství reagujícího trichlorsilanu výrazně snížilo množství vznikajících polymerujících siloxanů

z nezreagovaného silanu a tím výrazně zjednodušilo postup čištění. Zjistili jsme, že periferní skupiny významně ovlivňují průběh reakce (obr. 20).

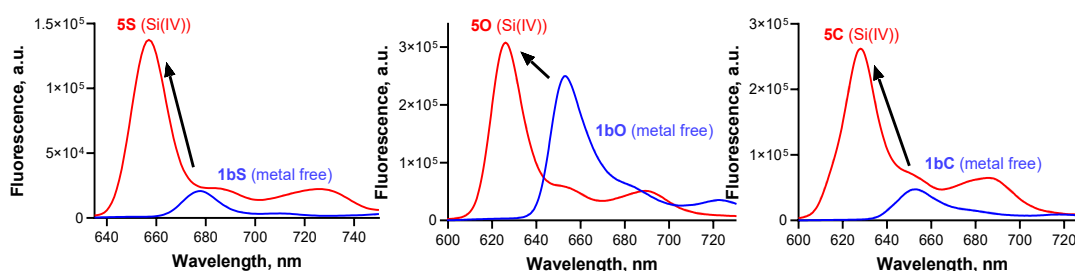


Obrázek 20 Graf vlevo nahoře: bezkovový (fialová) a křemičitý TPzPz 5O (černá) v DCM. Horní řada kromě prvního grafu: Změny absorpčních maxim odpovídajících bezkovovým formám (modré tečky) a křemičitým komplexům (červený čtverec) zkoumaných TPzPz v čase během inzerční reakce. Spodní řada: Změny absorpčních spekter (v DCM) během inzerční reakce v čase. Reakční podmínky: TPzPz bez kovu (1 ekv.), trichlorsilan (12 ekv.), tributylamin, DCM, Ar, 30 °C.

Podobně jako u templátové metody TPzPz **1bC** projevil zvýšenou ochotu reagovat a koordinoval centrální atom téměř okamžitě – viditelná změna typického spektra ligandu byla patrná již během prvního odběru vzorku z reakční směsi po deseti minutách od přidání trichlorsilanu. Během 20. – 60. minuty už nebyly pozorovány výraznější změny při vzniku Q-pásu a reakce byla ukončena. TPzPz **1bS** reagoval velmi podobně s viditelným postupným nárůstem v absorpčním maximu vznikajícího Q-pásu 652 nm. Naopak u **1bN** nebyly pozorovány žádné změny v absorpčních spektrech po dobu 2 h reakce a **1bO** reagoval jen velmi neochotně, jak je viditelné na spektru s minimálním nárůstem ve vlnové délce 622 nm během tří hodin (obr. 20 O). Tento jev připisujeme silně elektron-donorovým alkylaminovým (**1bN**) a aryloxy (**1bO**) skupinám na periférii TPzPz.

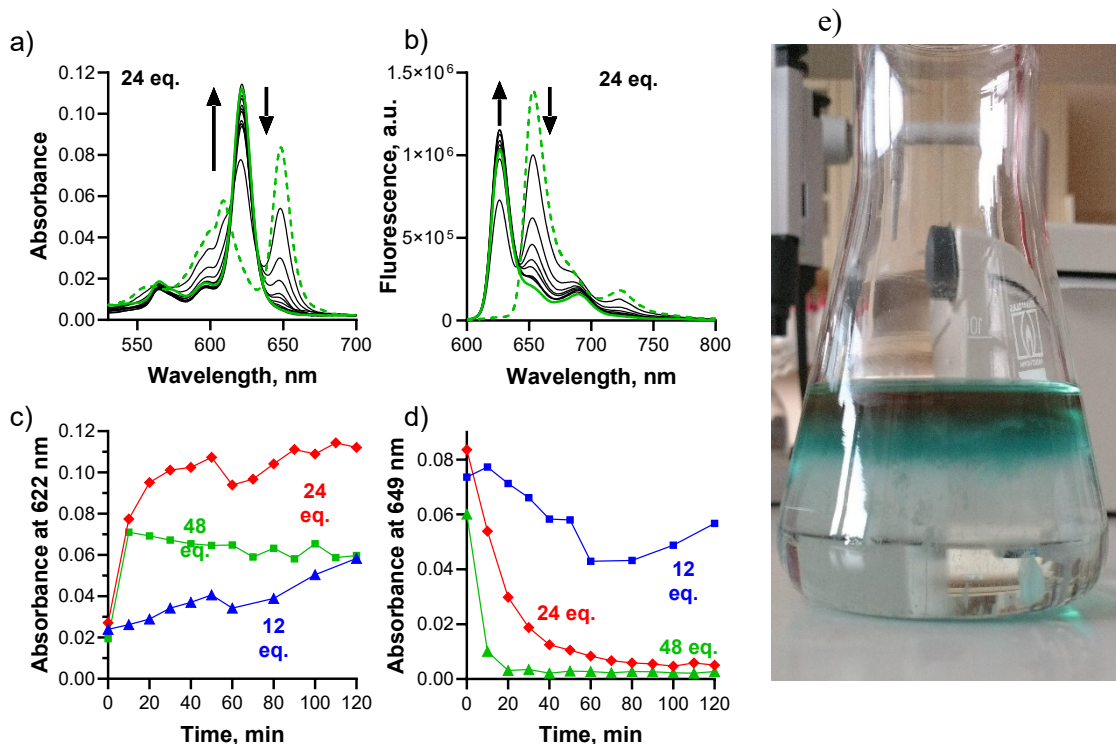
Inzerce křemičitého kationtu do TPzPz byla pro dvojí kontrolu pozorována i pomocí fluorescenční spektroskopie (obr. 21). Pro bezkovové TPzPz ligandy je typická slabá fluorescenční emise s Q-pásem ve vyšších vlnových délkách.⁴⁰ Naše závěry podpořil pokles emisního pásu při 679 nm, 658 nm a 656 nm pro **1bS**, **1bO**, resp. **1bC** (obr. 21,

modrá) při současném nárůstu silnějšího hypsochromně posunutého emisního pásu křemičitých TPyzPz komplexů (obr. 21, červená) pozorovaný během reakce. Alkylaminosubstituovaný derivát **1bN** byl z těchto experimentů vyloučen, protože jeho excitované stavy jsou účinně zhašeny pomocí ICT^{39, 40} bez ohledu na centrální atom, a proto nelze pozorovat emisi fotonů.



Obrázek 21 Změny fluorescenčních emisních spekter (v DCM) během inserce křemičitých kationtů. Jsou zobrazena pouze počáteční a konečná fluorescenční emisní spektra odpovídající TPyzPz bez kovu (modrá) a TPyzPz s Si(IV) (červená) ($\lambda_{exc} = 375$ nm pro S, $\lambda_{exc} = 348$ nm pro O, $\lambda_{exc} = 343$ nm pro C).

Role přebytku trichlorsilanu byla zkoumána ještě podrobněji. Jelikož 12 ekv. nevedlo k plné koordinaci křemičitých kationtů do centra **1bO**, byl podobný experiment proveden s použitím 24 a 48 ekv. (obr. 22c, d). Zvýšení přebytku trichlorsilanu na 24 ekv. bylo v případě **1bO** dostačující, což je zřejmé z průběhu absorpčního maxima $\lambda_{max} = 622$ nm vznikajícího komplexu (obr. 22a, c). Použití 24 ekv. se v tomto případě jeví jako optimální, protože větší přebytek trichlorsilanu sice ještě urychlil úbytek bezkovového ligandu (obr. 22d), ovšem nevedl k nárůstu absorbance odpovídajícímu absorpčnímu maximu produktu (obr. 22c, zelená). Tuto ostrou hranici stagnace až mírného poklesu si vysvětlujeme zvýšenou koncentrací vedlejšího polymerního produktu, který do své struktury navázal vznikající komplexy. Tuto teorii potvrdil i samotný vizuální průběh reakce, kde se v čase vytváří barevná kašovitá hmota, ze které nelze komplex – polymer žádným způsobem vymýt či rekrystalizovat (obr. 22e). Neochota **1bN** koordinovat Si(IV) byla ještě výraznější a pouze další zdvojnásobení přebytku trichlorsilanu (48 ekv.) umožnilo získat požadovaný produkt **5N** v rozumném výtěžku 37 %.



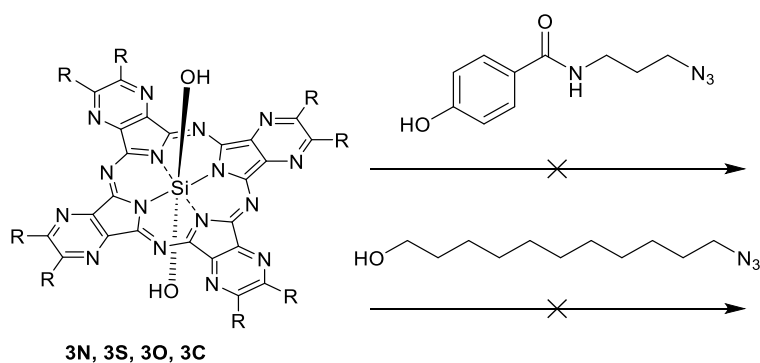
Obrázek 22 Vliv množství trichlorsilanu v inzerční metodě s použitím **1bO**: Změny absorpčních (a) a emisních fluorescenčních (b) spekter s 24 ekv. trichlorsilanu (spektra pořizena v DCM). Nárůst absorpčního maxima odpovídajícího Si(IV) TPyzPz **5O** (c) a pokles absorpčního maxima odpovídajícího bezkovovému ligandu **1bO** v čase (d). Reakční podmínky: **1bO** (1 ekv.), trichlorsilan (12, 24 nebo 48 ekv.), DCM, tributylamin, Ar, 30 °C. Vznikající nerozpustný vedlejší produkt (e)

Po optimalizaci podmínek reakce byly nakonec izolovány a plně charakterizovány křemičité komplexy TPyzPz (viz kap. 5.1.1). MS analýza potvrdila, že axiální chlorskupiny se během zpracování rychle hydrolyzovaly na dihydroxyskupiny. Při této analýze byl vždy detekován pouze fragment $[M-OH]^+$, který ztratil jednu axiální hydroxylovou skupinu. Tyto fragmenty byly detekovány bez ohledu na typ periferní substituce a byly potvrzeny dvěma způsoby ionizace (MALDI, ESI). V 1H NMR spektrech po inzerci zmizel ze záznamů signál centrálních NH vodíků objevující se v záporných hodnotách ppm u bezkovových derivátů. Axiální hydroxylové skupiny však pozorovány nebyly.

6.1.3 Axiální modifikace

Hlavní výhodou křemičitých komplexů je jejich schopnost vázat axiální ligandy. Toho jsme chtěli původně využít pro zavedení azidové funkční skupiny, která by umožnila post-syntetickou modifikaci ON pomocí SPAAC reakce. Při použití postupů publikovaných u křemičitých Pc^{165} byl pozorován v případě křemičitých TPyzPz vznik

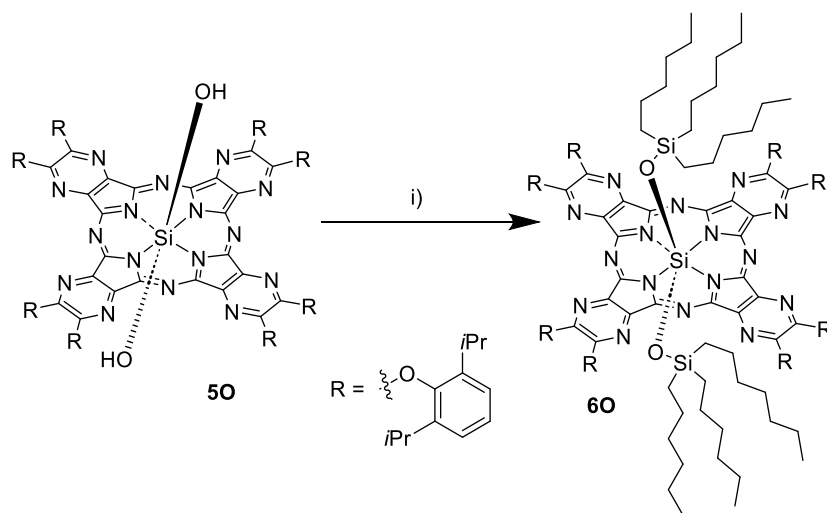
převážně disubstituovaného produktu oproti monosubstituovanému. Ovšem po zpracování reakce se opakovaně pomocí MS analýzy potvrdila pouze struktura výchozího dihydroxylového komplexu, nebylo však jednoznačné, zda reakce neprobíhá nebo zda dochází ke štěpení při MS analýze. Nakonec při snaze axiální pozici substituovat alifatickými alkoholem či fenolem (obr. 23), jsme došli k závěru, že vznikající produkty s vazbou axiálního ligandu charakteru Si-O-C mají velmi nízkou stabilitu bez ohledu na periferní substituci makrocyclu a již během purifikace pomocí sloupcové chromatografie se produkty zpětně hydrolyzují na výchozí dihydroxylový derivát křemičitých TPyzPz.



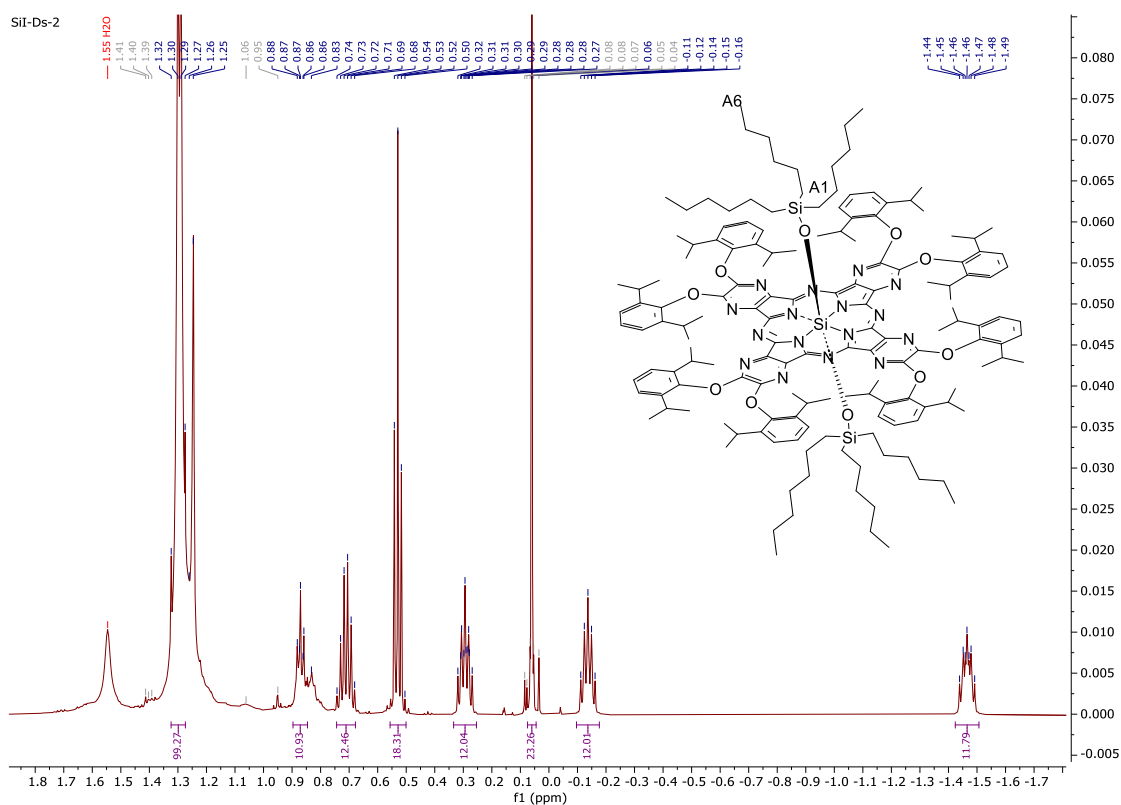
Obrázek 23 Nepovedené axiální substituce v toluenu s pyridinem.

Následně jsme tedy zkusili k substituci použít trihexylchlorosilan, neboť jsme předpokládali vyšší stabilitu produktu díky vzniku vazby Si-O-Si mezi centrálním kationtem a axiálním ligandem (obr. 24). Pro tuto reakci byly aplikovány podmínky používané v literatuře pro podobné křemičité Pc,¹⁶⁶ ale s pyridinem jako rozpouštědlem místo 3-pikolinu. Zahřívání dihydroxy křemičité TPyzPz ve směsi toluen:pyridin v poměru 4:1 s trihexylchlorosilanem tak vedlo k vazbám Si-O-Si obsahujícím **60** v dobrém výtěžku 79 %. Analogické výsledky poskytly i produkty s triisopropylchlorosilanem a tributylsilanolem.

Ověření struktury připravené sloučeniny **60** pomocí HRMS nebylo možné vzhledem k nemožnosti tuto sloučeninu ionizovat. Struktura však byla jednoznačně prokázána NMR analýzou. Axiální ligandy křemičitých komplexů se totiž vyznačují vysoce stíněnými signály v záporné části spektra magnetického posunu (obr. 25), přičemž lze přiřadit jasně patrné signály nejvíce stíněných vodíků ethylylových skupin v poloze A1 (-1,5 ppm, obr. 25), A5 (0,71 ppm) a A6 (0,53 ppm). Siloxanová vazba byla potvrzena i přítomností charakteristických píků v IR spektrech (1065 cm⁻¹).



Obrázek 24 Axiální substituce **50**: i) toluen, pyridin, trihexylchlorosilan, reflux, 3 h, 79 %.



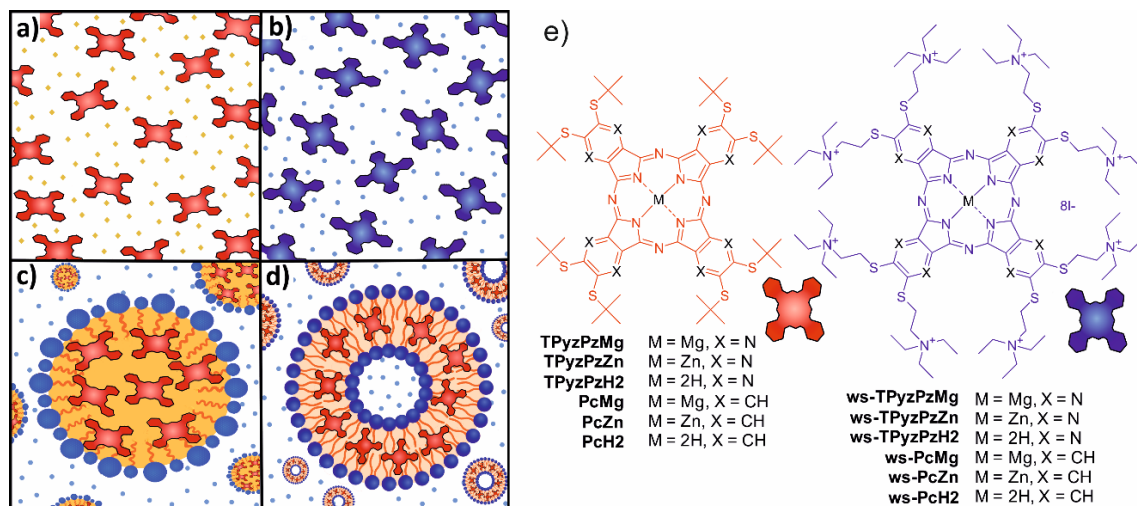
Obrázek 25 Přibližná část ¹H NMR spektrum axiálně substituovaného křemičitého TPyzPz.

6.2 Studium stability hořčnatých komplexů ftalocyaninů a tetrapyrazinoporfyrazinů v kyselém prostředí

Druhá část mé disertační práce se zabývá komplexním studiem stability centrálních kationtů cyklotetramerů Pc a TPyzPz v kyselém prostředí, se zaměřením na hořčnaté

komplexy; porozumění mechanismů a vlivu podmínek prostředí na demetalační proces a možných způsobů jeho omezení. Demetalaci rozumíme disociaci centrálního kationtu kovu z kavity tetrapyrrolového jádra. A ačkoliv je jev demetalace u hořečnatých komplexů dlouhodobě známý²² a v syntetických postupech i hojně využíváný,¹⁶⁷ nikdo jej detailněji v případě Pc a TPyzPz nestudoval. Přitom se mírně až středně kyselé prostředí běžně vyskytuje v živých systémech (lysozomy) nebo právě v nádorových tkáních či oblastech zánětu, což může mít přímý vliv na využitelnost těchto komplexů v praxi. Proto jsme se v této práci zaměřili na ucelené zhodnocení procesu demetalace lipofilních i hydrofilních hořečnatých komplexů **PcMg** a **TPyzPzMg** na jejich bezkovové analogy **PcH₂** a **TPyzPzH₂**.

Výsledkem bylo publikování výsledků v článku **P2**.¹⁶⁸ Na tomto článku jsem se podílela přípravou struktur a formulací, provedením fotofyzikálních experimentů, formální analýzou a vizualizací získaných dat, podílem na přípravě originálního textu publikace a jeho recenze a editace. Petr Zimčík přispěl koncepcí a metodikou experimentů, formální analýzou dat, zajištěním zdrojů a sepsáním původního textu práce. Miroslav Miletín a Veronika Nováková přispěli validací dat, recenzí a editací manuskriptu. Anita Mulaku se podílela na fotofyzikálních experimentech s DSS k získání preliminary dat.



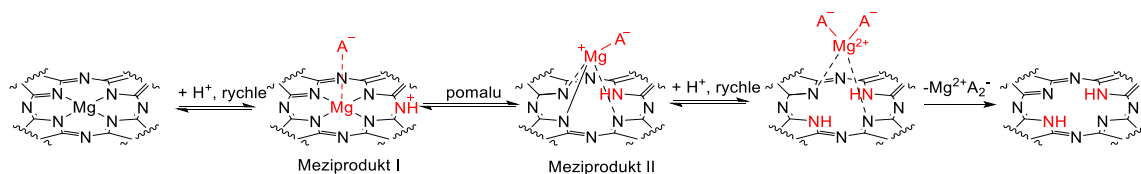
Obrázek 26 Schematické znázornění studovaných systémů: (a) organické rozpouštědlo (bezvodý benzen) s rozpuštěnými lipofilními barvivy; (b) vodné prostředí (pufr) s rozpuštěnými hydrofilními barvivy; (c) mikroemulze s lipofilními barvivy inkorporovanými do olejových částic; (d) lipozomy s lipofilními barvivy inkorporovanými do lipidové dvojvrstvy; a (e) struktury příslušných sloučenin znázorněné vpravo.

Pro studium lipofilního prostředí byly vybrány látky s objemnou nepolární *tert*-butylsulfanylovou substitucí na periferii, která efektivně brání agregaci (viz

kap.3.1.2). Lipofilní komplexy byly dále zkoumány ve dvou dalších formách, zabudovány do mikroemulzí a lipozomů pro ověření zda je tyto systémy mohou chránit proti demetalaci ve vodném prostředí (obr. 26a,c,d). Pro srovnání získaných dat z vodného prostředí jsme vybrali ve vodě snadno rozpustné Pc a TPyzPz s kationicky nabitými triethylamoniumethylsulfanylovými skupinami (obr. 26b). Díky výraznému rozdílu absorpčních spekter kovových komplexů oproti bezkovovým ligandům, bylo možné proces demetalace sledovat spektroskopicky prostřednictvím změn v Q-pásu (obr. 10a, viz kap. 3.1.2).

6.2.1 Demetalace v organickém rozpouštědle

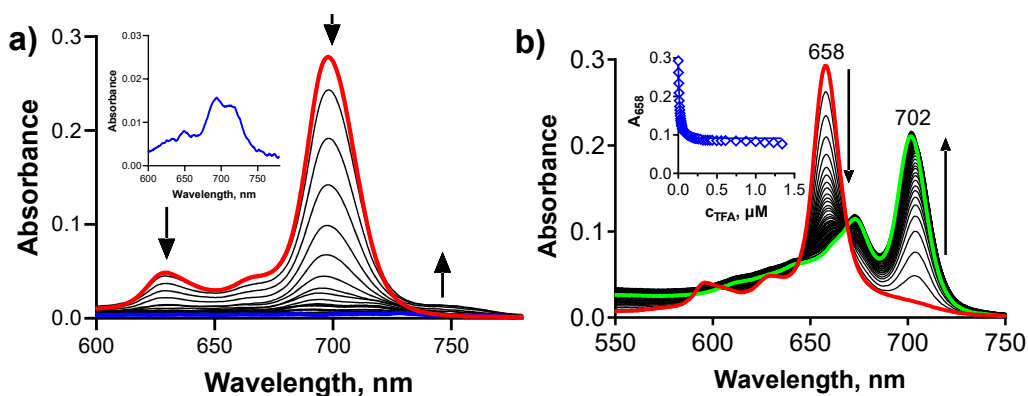
Již dříve byly publikovány práce týkající se nižších analogů Pc, které navrhly v procesu demetalace hořčíku několik meziproductů, i když je jejich výskyt velmi krátký, v závislosti na typu organického rozpouštědla. V případě aprotických rozpouštědel autoři navrhli acidoprotolytický mechanismus, kdy kyselina působí jako donor protonu a zároveň jako aniont.^{169, 170} Jako první charakteristický krok tohoto mechanismu navrhli protonaci azomethinového dusíku (obr. 27, meziproduct I) s koordinací aniontu s centrálním hořčíkem.



Obrázek 27 Acidoprotolytický mechanismus demetalace hořečnatých komplexů v organickém rozpouštědle v přítomnosti kyseliny. Převzato z¹⁶⁹

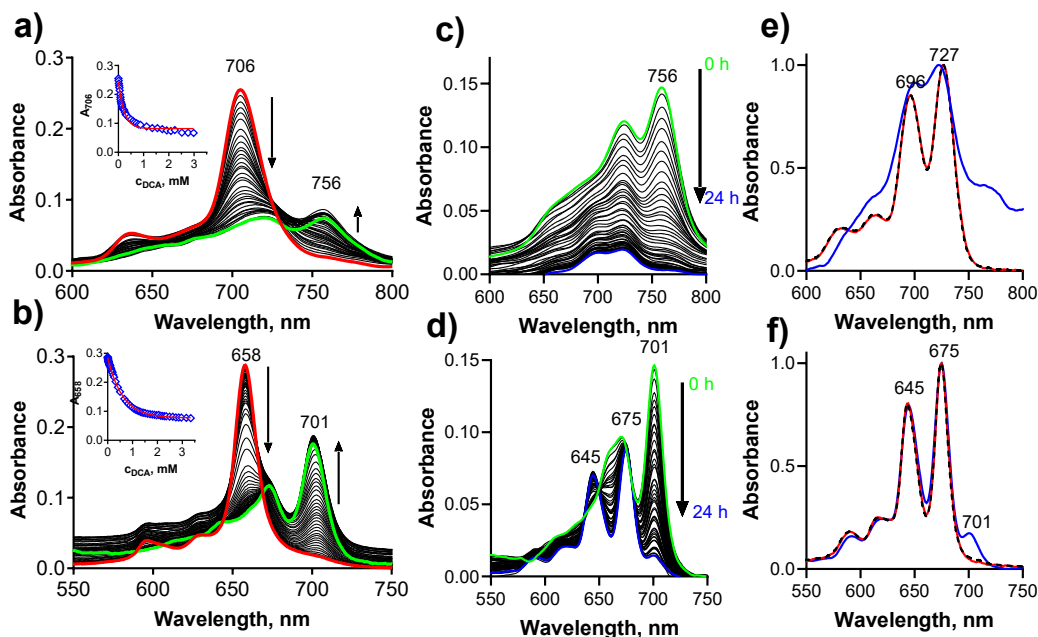
Abychom tento mechanismus potvrdili, zkusili jsme nejprve monitorovat proces u komplexů v prostředí bezvodného THF pomocí titrace kyselinou trifluoroctovou (TFA, z angl. trifluoric acid, obr. 28a). Ta sice ukázala mírné změny spektra ve vyšších vlnových délkách kolem 750 nm, avšak celkové změny spektra ukázaly, že rozklad makrocyklu probíhá rychleji než proces demetalace i při nízkých přídavicích TFA. Ani změna kyseliny za slabší kyseliny trichloroctovou a dichloroctovou (TCA a DCA) proces rozkladu nezpomalila, proto jsme se rozhodli pro použití rozpouštědla s nižším indexem polarity, které by mohlo proces demetalace výrazně zpomalit a mohlo by zaznamenat jednotlivé fáze procesu. Přidávání TCA do roztoku **TPyzPzMg** v bezvodném benzenu vedlo k postupnému poklesu intenzity Q-pásu (658 nm) a k výskytu nového bathochromně

posunutého pásu v přibližně 702 nm. Na základě dostupné literatury lze tento pás připisat vzniku monoprotované formy makrocyklu (**TPyzPzMgH⁺**) na azamethinovém dusíku (obr. 27, meziprodukt I).^{43, 171-173} Ze závislosti poklesu absorbance v λ_{\max} na koncentraci TCA (obr. 28b, inset) byla stanovena příslušná asociační konstanta v benzenu $K_a = 4,24 \pm 0,20 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$. Titrace **PcMg** vedla opět k rozkladu, což naznačilo vyšší bazicitu Pc komplexu.



Obrázek 28 a) Změny absorpčních spekter **PcMg** v THF během titrace s TFA (do 10 % (v/v)), inset: Absorpční spektrum **PcMg** v THF s 2,5 % TFA (v/v), b) Protonace **TPyzPzMg** v benzenu ($c_{\text{barivivo}} = 1 \mu\text{M}$) po přidání TFA, inset: Pokles absorbance při vlnové délce maxima Q-pásu neprotionizované formy, modrá čára = nelineární regrese získaných dat vypočtená pomocí programu GraphPad Prism. Všechny údaje byly korigovány na zředění.

Při titraci roztoku **PcMg** a **TPyzPzMg** v benzenu pomocí DCA už docházelo u obou komplexů k pomalejšímu poklesu intenzity Q-pásu (706 resp. 658 nm, obr. 29 a, b) za současné protonace azamethinových dusíků (vznik a nárůst pásu 756 resp. 701 nm). Pomalejší proces protonace v prostředí slabší kyseliny byl potvrzen i nižšími hodnotami asociačních konstant $K_a = 4,33 \pm 0,31 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$ pro **PcMg** a $1,67 \pm 0,026 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$ pro **TPyzPzMg**. Navíc tak byla i potvrzena nižší bazicita druhého makrocyklu v důsledku přítomnosti elektron-odtahujících pyrazinových kruhů. Další přídatky DCA kvalitativní charakteristiku spekter již neměnily a docházelo pouze k naředění roztoku, což je patrné z plató fáze závislostních křivek (obr. 29a, b insety).

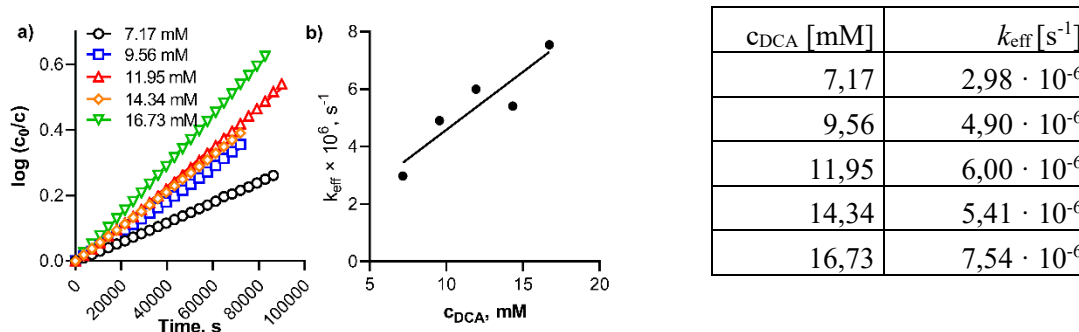


Obrázek 29 Změny absorpčních spekter při protonaci (a) **PcMg** a (b) **TPyzPzMg** v benzenu ($C_{\text{barvivo}} = 1 \mu\text{M}$) po přidavku DCA; insety: Pokles absorbance při vlnové délce maxima Q-pásu neprotonizované formy, červená čára = nelineární regrese získaných dat vypočtená pomocí programu GraphPad Prism. Všechna data byla korigována na zředění. Změny absorpčních spekter protonovaných komplexů (zelená čára) c) **PcMgH⁺** a d) **TPyzPzMgH⁺** ($C_{\text{barvivo}} = 1 \mu\text{M}$) během 24 h v roztoku DCA ($C_{\text{DCA}} = 4,75 \text{ mM}$) v bezvodém benzenu při 25 °C. Normalizovaná absorpční spektra (e) **PcMg**, (f) **TPyzPzMg** demetalovaného pomocí DCA (modrá čára) v benzenu ($C_{\text{DCA}} = 4,75 \text{ mM}$, 24 h působení, data z grafů (c,d)). Pro srovnání jsou rovněž zobrazena spektra (b) **PcH₂** a (d) **TPyzPzH₂** v benzenu (červená čára) a benzenu s DCA ($C_{\text{DCA}} = 4,75 \text{ mM}$, černá čárkovaná čára).

Na druhou stranu se u takto protonovaných hořčnatých komplexů projevil vliv času změnou charakteru spekter (obr. 29c, d, zelená). Lépe byly změny pozorovatelné u TPyzPz komplexu. Pás protonizovaného **TPyzPzMgH⁺** (meziprodukt I) při 701 nm postupně klesal, zatímco se objevily dva nové pásy s hypsochromě posunutými maximy v 675 nm a 645 nm (obr. 29d). Tato změna byla nevratná. Na tvaru spektra po 24 h působení 4,75mM DCA lze pozorovat ještě malý zbytek nedemetalovaného **TPyzPzMgH⁺** (malé rameno při 701 nm), jinak se ale celé spektrum dokonale překrývalo se spektrem bezkovového ligandu **TPyzPzH₂** (obr. 29f, červená). Toto zjištění bylo v naprostém souladu s navrženým mechanismem (obr. 27). Přítomnost jasných isosbestických bodů v průběhu přechodu spekter (obr. 29d) naznačuje transformaci jedné formy na druhou, což jen dále podpořilo správnost navrženého mechanismu. Vysoká bazicita **PcMgH⁺** (obr. 29c) ovlivnila pozorované změny spektra v čase, jelikož demetalace byla provázena i postupnou dekompozicí celého komplexu. Přesto byly trendy v kvalitativních změnách podobné těm u TPyzPz komplexu a konečný produkt se

po 24 h vyznačoval absorpčními maximy ve stejných polohách jako u bezkovového **PcH₂** (obr. 29c, e modrá)

Tabulka 1 Hodnoty efektivní disociační konstanty a koncentrace DCA



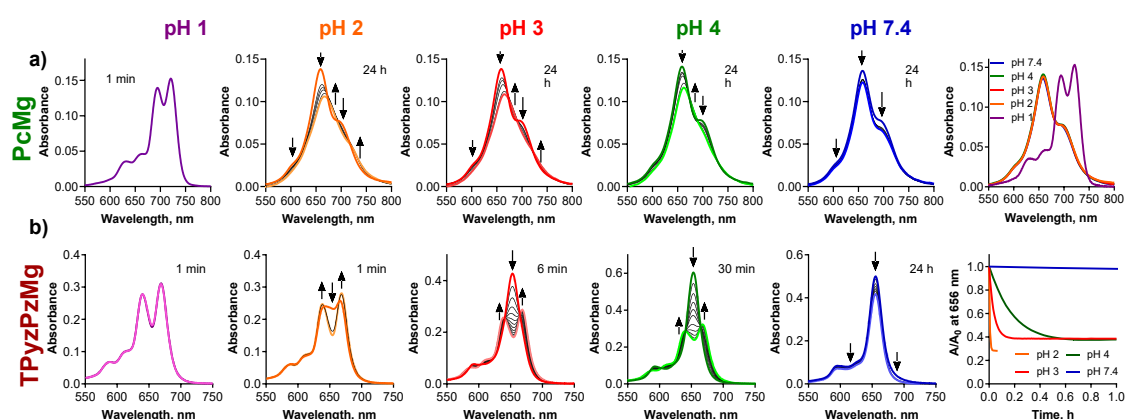
Obrázek 30 a) Graf závislosti $\log(c_0/c)$ na čase pro disociaci **TPyzPzMgH⁺** v benzenu při různých koncentracích DCA při 20 °C a b) Graf závislosti efektivní rychlostní konstanty k_{eff} (vypočtené z údajů v grafu (a)) na koncentraci DCA.

Kinetická data z obrázku 29d byla použita k výpočtu rychlosti demetalace **TPyzPzMgH⁺** v benzenu s DCA. Ta se řídila kinetikou prvního řádu (obr. 30a). Rychlostní konstanty demetalace k_{eff} lineárně rostly se zvyšující se koncentrací DCA (obr. 30b, Tab. 1). z těchto údajů byla vypočtena skutečná rychlostní konstanta $k_v = k_{eff}/c_{DCA}$, přičemž $k_v = 4,52 \pm 0,57 \cdot 10^{-4} s^{-1} \cdot M^{-1}$. Tyto údaje s konečnou platností podpořily navrhovaný acidoprotolytický mechanismus pro tento typ disociace.¹⁷⁰ Analýza disociace **PcMgH⁺** byla znemožněna z důvodu jeho probíhající dekompozice.

6.2.2 Demetalace v polárním prostředí a nosičových systémech

Pro pozorování procesu demetalace v polárním prostředí jsme zvolili Britton-Robinsonovy pufrы v kyselých hodnotách pH (1-4) a při fyziologickém pH = 7,4. Zkoumání analogů Pc **ws-PcMg** bylo ztíženo jejich zřetelnou agregací v pufru při pH vyšším než 2 (obr. 31a). I tak byly ale v čase vidět zřetelné kvalitativní změny absorpčních spekter při pH 2-4. Naopak při pH 1 byl **ws-PcMg** monomerní a došlo k jeho okamžité (1 min) demetalaci. V případě TPyzPz komplexu **ws-TPyzPzMg** byla spektra s nižší aciditou od pH 7,4 až do pH 3 buď úplně nebo alespoň částečně monomerní (obr. 31b). Také zde byl na první pohled patrný trend zrychlujícího se procesu disociace hořčičku v závislosti na nižším pH prostředí díky vzniku typicky rozštěpeného Q-pásu **ws-TPyzPzH₂**. Demetalace byla dokončena za 30 min při pH 4 a za 10 min při pH 3. Ihned po přidání vzorku do roztoku o pH 2 byly pozorovány už pouze zbytky hořčičnatého

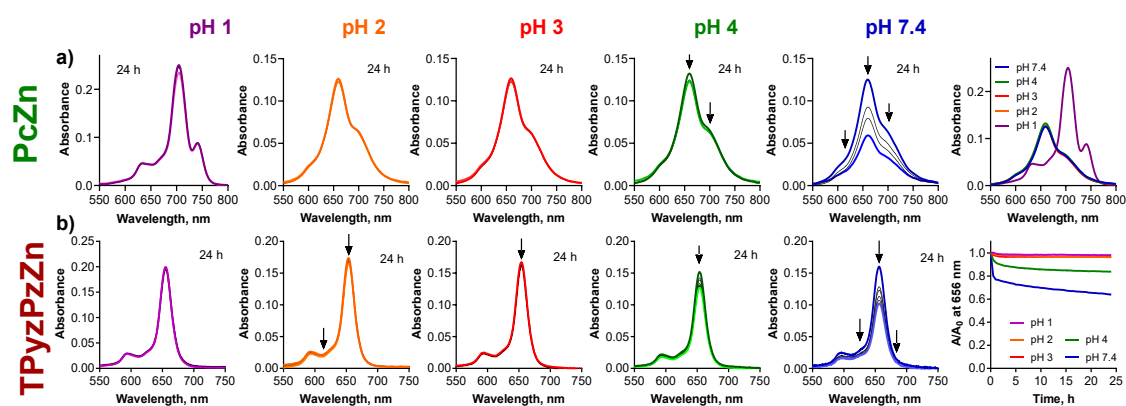
komplexu a proces disociace byl do minuty kompletní. Při pH 1 byla demetalace dokončena téměř okamžitě po přidání vzorku do pufru bez jakýchkoliv reziduí hořečnatého komplexu. Data **ws-PcMg** naznačovala pomalejší průběh demetalace ve srovnání s odpovídajícím TPyzPz (např. při pH 3 demetalace **ws-TPyzPzMg** trvala 10 min, zatímco u **ws-PcMg** byl průběh pozorovatelný i po 24 h). Pravděpodobným vysvětlením by mohlo být, že agregované molekuly jsou méně náchylné k protonaci kyselinou v důsledku omezeného přístupu protonů k agregátům.



Obrázek 31 Změny absorpčních spekter (a) **ws-PcMg** a (b) **ws-TPyzPzMg** v pufrách o různých hodnotách pH ($C_{\text{charvivo}} = 1 \mu\text{M}$). Graf napravo nahoře ukazuje absorpční spektra těsně po přidání zásobního roztoku komplexů do pufru pro porovnání výchozích stavů. Graf napravo dole ukazuje normalizovaný pokles absorbance v λ_{max} původních komplexů v čase.

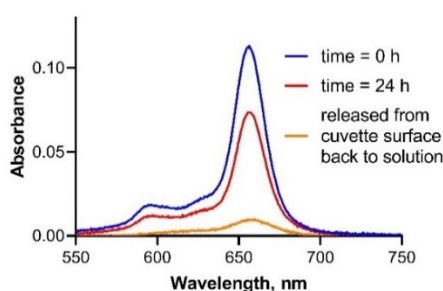
Během experimentů v polárním prostředí nebylo možné, na rozdíl od výše uvedených pozorování v organických rozpouštědlech, pozorovat protonizovanou formu makrocyklů **ws-PcMgH⁺** a hlavně pak **ws-TPyzPzMgH⁺**. To naznačuje, že mechanismus demetalace může být ve vodě odlišný, nejspíše solvoprotolytický.¹⁶⁹ V tomto mechanismu je komplex hořčíku přímo převeden na ligand bez kovu bez jakýchkoli meziproductů podobně, jako bylo pozorováno v našich experimentech. V neutrálním pH 7,4 byl pozorován jak v případě hořečnatých komplexů Pc, tak i TPyzPz mírný pokles intenzity spektra bez jakékoliv kvalitativní změny absorpčního spektra. Rozhodli jsme se tento jev blíže prozkoumat, i když naznačuje plnou stabilitu makrocyklu během studovaných 24 h (obr. 31). Jako standardy k porovnání jsme se rozhodli využít zinečnaté analogy studovaných makrocyklů **PcZn** a **TPyzPzZn**, jakožto stabilnější komplexy těžšího kovu.^{174, 175} Ty jsou obecně v případě Pc a AzaPc vůči kyselému prostředí netečné a jsou tedy vhodným prostředkem k odhalení případných doprovodných procesů. U **ws-PcZn** byla také pozorována silná agregace (obr. 32a). I tak byl dokumentován proces snižování

intenzity absorpce, a to především při pH 7,4. Naopak pod pH 4 nebyly zjištěny téměř žádné změny. A při pH 1 bylo dokonce pozorováno zřetelně monomerní spektrum s výskytem typického, červeně posunutého pásu odpovídajícího malému množství azamethin-protonované formy 750 nm. U **ws-TPyzPzZn**, který je v tomto pufru plně monomerní, nebyly při pH < 3 během 24 h pozorovány žádné změny, zatímco při pH 4 a ještě výrazněji při pH 7,4 byl zjištěn opět výrazný pokles absorpance při všech vlnových délkách, aniž by se změnil tvar spekter (obr. 32b, modrá).



Obrázek 32 Změny absorpčních spekter (a) **ws-PcZn** a (b) **ws-TPyzPzZn** v pufrch o různých hodnotách pH ($C_{\text{barvivo}} = 1 \mu\text{M}$). Graf napravo nahoře ukazuje absorpční spektra těsně po přidání zásobního roztoku komplexů do pufru pro porovnání výchozích stavů. Grafy napravo dole ukazují normalizovaný pokles absorpance v λ_{max} původních komplexů v čase.

Naše podezření na adsorpci na povrch skleněné kyvety jsme ověřili jednoduchým experimentem. Zinečnatý komplex **ws-TPyzPzZn** byl ponechán v kyvetě po dobu 24 h v pufru o pH = 7,4; kyveta byla poté vyprázdněna; třikrát promyta vodou a naplněna destilovanou vodou do stejného objemu, jaký byl použit během experimentů.

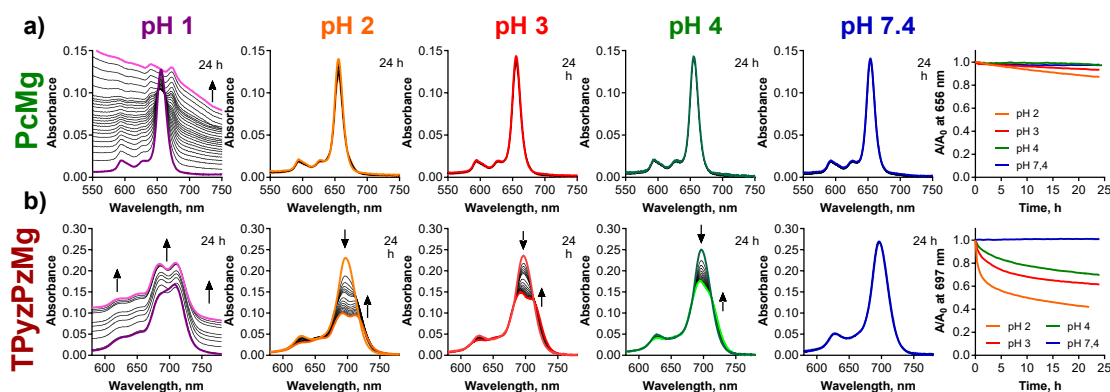


Obrázek 33 10 Absorpční spektrum **ws-TPyzPzZn** v pufru o pH 7,4 těsně po smíchání roztoků (modrá), po 24 h (červená) a po promytí (kyveta byla třikrát promyta destilovanou vodou a doplněna destilovanou vodou do původního objemu – oranžová).

Absorpční spektrum ukázalo, že kationtová sloučenina adsorbovaná na povrchu skla se uvolnila zpět do roztoku (obr. 33). Toto chování lze vysvětlit fenoménem adsorpce kationtových sloučenin na záporně nabitou povrchovou plochu skla díky kyselým silanolovým skupinám ($pK_a = 4,8$),¹⁷⁶⁻¹⁷⁸ které jsou při $pH < 4$ téměř zcela protonované, tudíž k adsorpci nedochází.¹⁷⁹

Aktivní molekuly je možné před podobnými vlivy prostředí ochránit nosičovými systémy (DDS, z angl. drug delivery systém). Mikroemulze jsou čiré, termodynamicky stabilní systémy tvořené obvykle částicemi oleje stabilizovanými ve vodě přídavkem vhodné povrchově aktivní látky (obr. 26c). Částice mají hydrofobní jádro, které může rozpouštět lipofilní molekuly, v našem případě lipofilní komplexy makrocyclů **PcMg** a **TPyzPzMg**. Lipozomy jsou vezikuly sférického tvaru tvořené lipidovou dvojrůstvou s hydrofilní vnitřním prostorem (obr. 26d). Lipofilní dvojrůstva může hostit lipofilní sloučeniny a může také sloužit jako jednoduchý model biomembrán.^{180, 181}

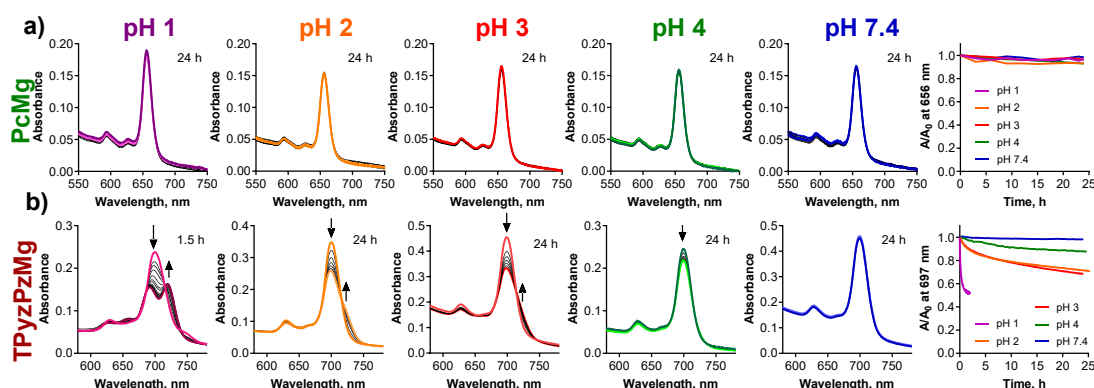
Hořečnaté komplexy **TPyzPz** se jeví plně stabilní v mikroemulzích nad $pH > 4$ a při $pH 3$ a 2 byl pozorován pouze malý pokles absorbance Q-pásu v důsledku demetalace (obr. 34a). Data získaná při $pH 1$ nemohla být řádně analyzována, protože toto pH zřejmě vedlo k destrukci aplikační formy, jak naznačuje zvyšující se pozadí během měření.



Obrázek 34 Změny absorpčních spekter (a) **TPyzPzMg** a (b) **PcMg** v mikroemulzi ($c_{\text{barvivo}} = 1 \mu\text{M}$) při různých hodnotách pH pufru. Rostoucí hodnoty pozadí při $pH = 1$ jsou způsobena nestabilitou mikroemulze v silně kyselém pH . Grafy napravo ukazují normalizovaný pokles absorbance v λ_{max} původních hořečnatých komplexů v čase.

V případě **PcMg** (obr. 34b) je situace téměř opačná a stabilní komplex je v tomto DDS pouze při $pH 7,4$. v nižším pH změny v absorpčních spektrech naznačovaly proces demetalace na bezkovový ligand s rychlostí závislou na pH . Při $pH 1$ rovněž došlo k destrukci mikroemulze, ale **PcMg** se téměř okamžitě viditelně demetaloval.

Na rozdíl od mikroemulze byly lipozomy jako DSS stabilní i při pH 1. Pozorování absorpčních spekter **TPyzPzMg** v lipozomech nenaznačovalo žádnou změnu absorpčního spektra a sloučenina byla tedy plně chráněna před atakem kyselého prostředí (obr. 35a). Pokles absorpce v Q-pásmu **PcMg** při pH 4 a typický nárůst absorpce **PcH₂** při delších vlnových délkách při pH 2 a pH 3 během 24 h naznačovaly, že došlo k procesu demetalace. To bylo potvrzeno úplnou demetalací při pH 1 během 1,5 h po ošetření. **Pc** komplex byl tak plně stabilní pouze při fyziologickém pH 7,4.



Obrázek 35 Změny absorpčních spekter (a) **TPyzPzMg** a (b) **PcMg** v lipozomech ($c_{dye} = 1 \mu\text{M}$) při různých hodnotách pH pufru. Zvýšené hodnoty pozadí jsou způsobeny rozptylem světla v lipozomální suspenzi. Grafy napravo ukazují normalizovaný pokles absorpce v λ_{max} původních hořečnatých komplexů s časem.

Přímé srovnání obou makrocyclů (**PcMg** a **TPyzPzMg**) v mikroemulzích také jasně ukázalo mnohem nižší stabilitu **PcMg**. To koresponduje s vyšší bazicitou těchto analogů (viz výše). Ovšem celkově lze konstatovat, že zřetelně lepší ochranu inkorporovaných lipofilních sloučenin před kyselým prostředím poskytují lipozomy oproti mikroemulzím a to v případě obou typů komplexů.

6.3 Studium vlastností fotosenzitizérů při světlem indukovaném uvolňování lipozomálního obsahu

Třetí část disertační práce se zaměřuje na potenciální využití látek v biologických aplikacích. Všechny testované látky byly připraveny naší skupinou nebo partnerskými pracovišti. Konkrétněji zkoumáme asymetrické amfifilní **Pc** jako možné **Ps** pro světlem indukované uvolňování léčiv z jejich lipozomální formy; hledáme jejich optimální vlastnosti a zabýváme se jejich vlivem na lipozomální obsah neboli kargo (viz kap. 3.3) stejně jako na lipozomy samotné.

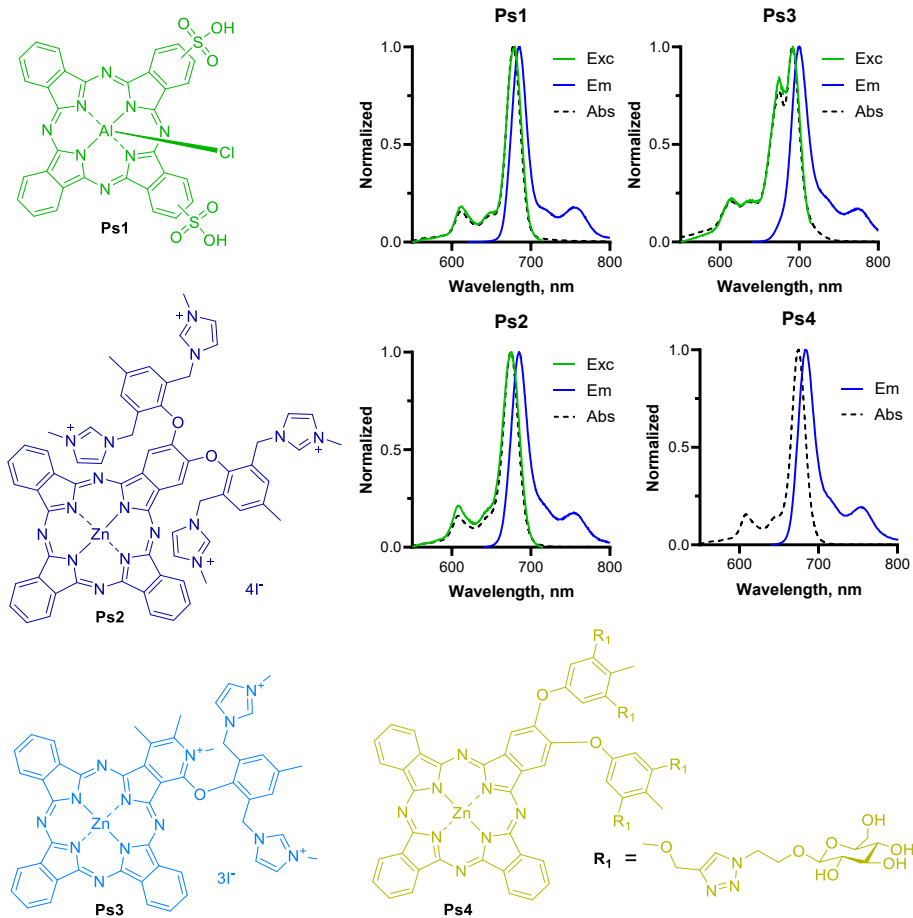
Získaná data byla shrnuta v připravované publikaci, která je výstupem grantu Univerzity Karlovy a Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy – START, jehož jsem byla hlavní řešitelkou. Mým podílem byla koordinace a administrativní záštita celého projektu, plánování všech fotofyzikálních experimentů s kolegy, vyhodnocení experimentů po jejich provedení a finální analýza dat z nich plynoucích. Dále jsem se podílela na textu originálního draftu článku včetně všech grafů. Jan Kollár charakterizoval všechny látky, včetně jejich inkorporace do lipozomální stěny a provedl pilotní experimenty světlem indukovaného uvolnění lipozomálního karga a podílel se na experimentech sledování uvolňování lipozomálního karga v reálném čase. Lucie Rychvalská prováděla měření velikosti a zeta potenciálu lipozomů, stanovení $\log P$, fotodegradaci Ps působením světla, peroxidaci lipidů, podílela se na experimentech sledování uvolňování lipozomálního karga v reálném čase a formální úpravě dat. Příprava lipozomů s kargem i bez něj byla prováděna kolegy na Katedře biochemických věd Monikou Rohličkovou, Magdalénou Kozlíkovou a Marií Halaškovou a v této práci nebude blíže diskutována. Filip Kostelanský přispěl přípravou zkoumané látky **Ps3**. Miroslav Miletín a Veronika Nováková přispěli revizí a editací manuskriptu. Miloslav Macháček přispěl konceptem a metodikou experimentů, odborným dohledem, revizí a editací manuskriptu. Petr Zimčík přispěl konceptem a metodikou experimentů, odborným dohledem, validací dat, tvorbou originálního textu, revizí a editací manuskriptu.

6.3.1 Fotosenzitizéry

Zkoumané struktury Ps byly zastoupeny asymetrickými amfifilními Ps obsahujícími jednu vysoce hydrofilní jednotku (maximálně však dvě jednotky). Zkoumané sloučeniny se skládaly z látek periferně substituovaných kationickými funkčními skupinami, nebo hydrofilními skupinami. Druhá část struktury makrocyklu byla zastoupena třemi planárními hydrofobními isoindolovými jednotkami bez jakékoliv substituce (obr. 36).

Již dříve bylo prokázáno, že vysoce hydrofilní Ps (nesoucí hydrofilní periferní substituci na všech čtyřech isoindolových jednotkách) neinteragovaly s biomembránami, a tudíž byly při indukci uvolňování karga z lipozomů neúčinné. Je tomu tak kvůli extrémně krátké době života singletového stavu kyslíku ve vodném prostředí. Singletový kyslík jednoduše nestihne interagovat s lipozomem, a tedy pouze Ps inkorporovaný do lipozomální dvojvrstvy může způsobit lýzu lipidové dvojvrstvy a uvolnit lipozomální

kargo.¹⁴² Hydrofilní jednotka umožňuje částečnou rozpustnost v hydrofilním prostředí a účinnou interakci s lipozomálním povrchem. Díky lipofilní části je pak možné makrocyklus do lipozomální lipidové dvojvrstvy ukotvit, a to do předem připravených, kargem naložených lipozomů. Inkorporace byla provedena jednoduchým smísením jednotlivých složek (lipozomů s kargem a Ps), což je výrazný technologický posun oproti fotosenzitivním strukturálním modifikacím fosfolipidů před samotnou přípravou lipozomů.⁹⁰



Obrázek 36 Struktura zkoumaných Ps a jejich normalizovaná absorpční (černá čárkovaná), emisní (modrá) a excitační (zelená) fluorescenční v DMSO.

Pro účely této práce se zaměřím na čtyři nejzajímavější zkoumané sloučeniny (obr. 36). **Ps2** a **Ps3** jsou makrocykly nesoucí kladný náboj a byly již dříve připravené naší výzkumnou skupinou.^{143, 182} Pozoruhodné je rozvrstvení nábojů, kterým se tyto zástupci liší mezi sebou, kationtový **Ps3** obsahuje pouze tři náboje místo čtyř nábojů obsažených ve struktuře symetrické periferie **Ps2**. Naopak jeden z nábojů makrocyklu **Ps3** patří pyridinu v jádře asymetrického Pc, což činí sloučeninu **Ps3** unikátní. Dalším specifickým

zástupcem byl komerčně dostupný a k účelům PDT již široce využívaný chlorohlinitý Pc komplex **Ps1**. Ten je substituován vysoce hydrofilními sulfonátovými funkčními skupinami a to na dvou isoindolinových podjednotkách.¹⁸³ Poslední zkoumaný **Ps4** byl substituován čtyřmi objemnými a silně hydrofilními skupinami glukózy nedávno publikovaný ve spolupráci naší skupiny s výzkumnou skupinou profesora Makhseeda.¹⁴⁴

Všechny Ps byly plně fotofyzikálně charakterizovány a prokázaly intenzivní absorpci v žádané červené části viditelného spektra s maximy v Q-pásu kolem 678 nm v DMSO (obr. 36 a tab. 2, $\epsilon > 150\,000\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$). Tvar spekter všech sloučenin naznačoval přítomnost čistě monomerních forem v roztoku, což bylo potvrzeno jejich shodou s fluorescenčními excitačními spektry (obr. 36). Viditelné atypické rozštěpení Q-pásu **Ps3** se přisuzuje asymetrickému charakteru jádra způsobenému kvarternizovaným dusíkem v pyridinovém kruhu.¹⁴³

Tabulka 2 Fotofyzikální data studovaných Ps v DMSO.^{a, b}

Ps	λ_{max} (nm)	λ_{F} (nm)	Φ_{F}	Φ_{Δ}	log P
Ps1	678	679	0,62	0,20	-0,49
Ps2	675	685	0,26	0,38	-0,90
Ps3	692	697	0,23	0,44	1,45
Ps4	675	684	0,20	0,51	-1,21

^aAbsorpční maximum, λ_{max} , emisní maximum fluorescence, λ_{F} , kvantový výtěžek fluorescence, Φ_{F} , kvantový výtěžek singletového kyslíku, Φ_{Δ} , dekadický logaritmus rozdělovacího koeficientu (n-oktanol / PBS), log P. ^b Φ_{F} stanoven absolutní metodou pomocí integrační sféry, Φ_{Δ} stanoven rozkladem DPBF s ZnPc jako referenční látkou ($\Phi_{\Delta(\text{DMSO})} = 0,40$).

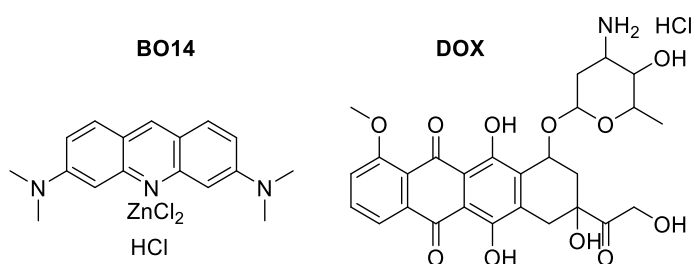
Všechny sloučeniny se vyznačovaly vysokými fluorescenčními kvantovými výtěžky (Φ_{F}) 0,62 pro **Ps1** a mezi 0,20 – 0,30 pro **Ps2-4**. Singletový kyslík ($^1\text{O}_2$) produkovaný Ps po ozáření je nejdůležitější formou kyslíku zodpovědnou za peroxidaci fosfolipidů v lipozomech a tím i jejich následný rozpad. Kationické zinečnaté komplexy **Ps2** a **Ps3** byly schopny silně produkovat $^1\text{O}_2$ s kvantovými výtěžky (Φ_{Δ}) kolem 0,40 (tab. 2), hlinitý komplex **Ps1** pak vykázal zhruba poloviční hodnotu ($\Phi_{\Delta} = 0,20$) v souladu s efektem těžkého atomu, kdy koordinace těžších kationtů zvyšuje ISC na úkor fluorescence a naopak.³⁸ Nejvyšší hodnotu přes 0,50 vykázal zinečnatý **Ps4**, což naznačovalo vysoký potenciál pro aplikaci světlem indukovaného uvolnění lipozomálního karga. Ochota inkorporace Ps do lipidové dvojvrstvy byla odhadnuta stanovením lipofility pomocí rozdělovacího koeficientu log P mezi PBS a n-oktanolem. Získané hodnoty (tab. 2) potvrdily vysokou hydrofilitu kationického **Ps2**, disulfonovaného **Ps1** a **Ps4** s periferní

substitucí nesoucí glukózu ($\log P = -1,21$). Nižší počet nabitých hydrofilních částí v trikationickém **Ps3** z něj činily nejlipofilnější makrocycl.

6.3.2 Lipozomy a kargo

Pro studii byly vybrány dva typy složení lipozomů, jelikož několik prací poukázalo na význam zvýšeného počtu dvojných vazeb v acylových řetězcích lipidů pro lepší uvolňování.^{90,91} První z nich představuje autoritami schválený lipozomální preparát pro podání doxorubicinu (Myocet®),^{184, 185} který již byl zkoumán z hlediska světlem indukovaného uvolnění karga pomocí různých Ps a sloužil pro nás jako standard.^{90, 186} Skládá se ze dvou klíčových komponent; z fosfatidylcholinu vaječného žloutku (EYPC) a cholesterolu v poměru 55:45 (dále jen **EYPC** lipozomy). Druhé lipozomy byly obohaceny o acylové řetězce s dvojnými vazbami ve složení 1,2-dioleoyl-sn-glycerol-3-fosfatidylcholin (DOPC) s cholesterolem v poměru 60:40 (dále jen **DOPC** lipozomy). EYPC obsahuje ve své struktuře acyly více než deseti různých mastných kyselin v různém poměru s průměrným nižším zastoupením nenasycené vazby na jednu molekulu fosfatidylcholinu¹⁸⁷ než DOPC, které má v každé molekule dvě nenasycené vazby. Přítomnost cholesterolu ve složení lipozomů je nezbytná, protože přímo umožňuje aktivní inkorporaci doxorubicinu do lipozomální dutiny.¹⁴⁶

Pro sledování uvolňování karga pomocí světelné indukce byly použity dva typy sloučenin. Doxorubicin (**DOX**) jakožto zástupce protinádorového léčiva¹⁴⁶ a jako netoxický fluorescenční standard k přípravě všech experimentů byla kvůli bezpečnosti použita akridinová oranž zásaditá⁹⁴ (**BO14**, z angl. Basic orange 14) (obr. 37).



Obrázek 37 Struktury sloučenin použitých jako karga.

U obou lipozomálních formulací s oběma zkoumanými látkami (**BO14** a **DOX**) byla stanovena velikost a index polydisperzity (PdI). Ve všech případech byly parametry sledovány před a po ozařování laserovou diodou (685 nm, 400 mW·cm⁻², 600 s). Velikost extrudovaných lipozomů bez karga byla velmi podobná (přibližně 95 nm) s nízkým

PdI ~ 0,07. Po inkorporaci karga do kavity lipozomů¹⁴⁶ nebyly zjištěny žádné významné změny PdI u žádné kombinace a bylo pozorováno pouze malé zvětšení obou typů lipozomů s inkorporovaným **BO14** a naopak zmenšení těch, které obsahovaly **DOX** (tab. 3). Rozdíl těchto trendů je dán krystalickou formou sloučenin, jelikož u **DOX** byla pozorována tvorba monokrystalu v každém jednotlivém lipozomu.¹⁴⁶ Zakotvení jednotlivých Ps do stěny lipozomů nezměnilo žádný parametr a hodnoty zůstaly nezměněny i po 10 minutách ozáření, které plně uvolnilo obsažené kargo. Lipozomální částice zůstaly oddělené a organizované stejným způsobem jako před ozářením, což potvrdilo stabilitu lipozomální formulace i po fotoperoxidaci lipidů a uvolnění karga.

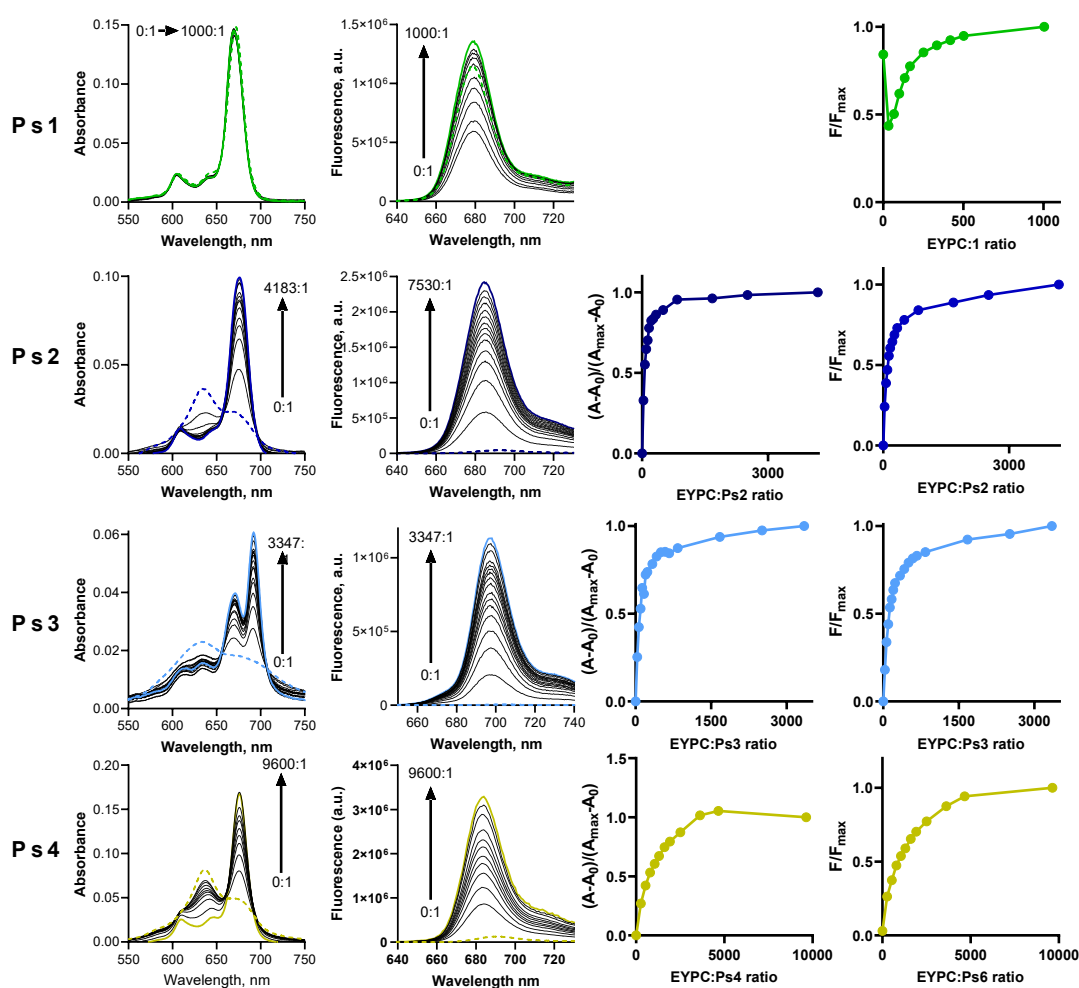
Tabulka 3 Velikost a index polydisperzity (PdI) lipozomů s různým kargem, před a po ozáření laserem (685 nm, 400 mW·cm⁻², 10 minut)

Ps	Kargo	Lipozomy	Velikost / nm, (PdI)		Zeta (mV)	
			Neozářené	Ozářené	Neozářené	Ozářené
		EYPC	98,82 (0,071)		-16,07	
		DOPC	94,22 (0,065)		-11,50	
	BO14	EYPC	100,73 (0,059)	102,33 (0,082)	-10,97	-11,00
		DOPC	110,16 (0,101)	106,93 (0,089)	-10,25	-8,89
	DOX	EYPC	85,43 (0,055)	85,58 (0,049)	-19,17	-19,70
		DOPC	93,29 (0,045)	92,82 (0,071)	-14,37	-15,40
Ps1	BO14	EYPC	87,31 (0,063)	88,73 (0,051)	-14,37	-14,57
		DOPC	84,53 (0,073)	84,71 (0,092)	-8,02	-8,48
	DOX	EYPC	86,93 (0,057)	85,78 (0,072)	-18,57	-16,77
		DOPC	82,24 (0,073)	82,49 (0,077)	-9,72	-9,22
Ps2	BO14	EYPC	102,16 (0,074)	105,20 (0,094)	-5,86	-6,95
		DOPC	110,56 (0,071)	108,13 (0,105)	-6,10	-7,81
	DOX	EYPC	86,95 (0,075)	87,78 (0,065)	-15,77	-15,07
		DOPC	93,34 (0,056)	94,61 (0,061)	-10,34	-12,90
Ps3	BO14	EYPC	102,73 (0,067)	101,70 (0,076)	-8,77	-8,89
		DOPC	115,53 (0,070)	109,63 (0,041)	-10,12	-11,53
	DOX	EYPC	86,96 (0,112)	87,51 (0,113)	-21,13	-20,70
		DOPC	94,81 (0,056)	94,33 (0,040)	-14,13	-13,47
Ps4	BO14	EYPC	122,73 (0,1413)	120,23 (0,1093)	-3,62	-3,69
		DOPC	119,07 (0,1903)	122,97 (0,1467)	-13,70	-7,33
	DOX	EYPC	87,98 (0,0873)	87,16 (0,058)	-18,83	-18,67
		DOPC	99,71 (0,0513)	100,66 (0,075)	-5,28	-5,35

6.3.3 Interakce fotosenzitizérů s lipozomy

Přestože všechny Ps mají ve své struktuře hydrofilní části, jejich rozpuštění v PBS způsobilo silnou agregaci **Ps2-4**, což bylo jasně prokázáno typickými změnami

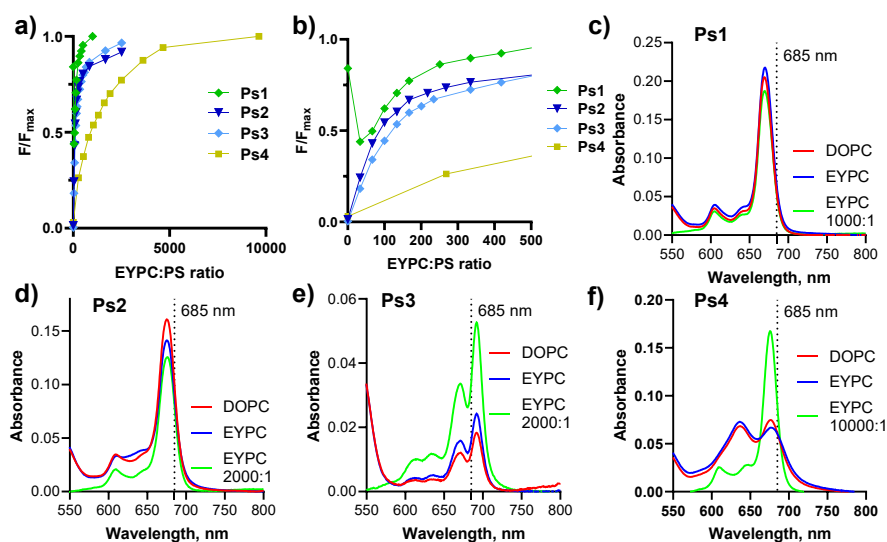
absorpčních spekter a eliminovanou fluorescenční emisí (obr. 38, čárkovaně). Obecně se uvádí, že interakce lipofilních Ps s lipidovou dvojrůstvou způsobuje jejich monomerizaci a činí je fotochemicky aktivními.^{188, 189} To bylo ověřeno titrací roztoku agregovaných Ps v PBS roztokem EYPC lipozomů, přičemž byly pozorovány typické změny v absorpčních spektrech s opětovným vznikem ostrého Q-pásu u **Ps2** a **Ps3** (obr. 38, první sloupec grafů) spolu s jasným nárůstem fluorescenční emise, což svědčí o monomerizaci Ps a tedy interakci, přesněji interkalaci Ps do lipidové dvojrůstvy (obr. 38, druhý a čtvrtý sloupec grafů).



Obrázek 38 Změny absorpčních spekter při různých poměrech lipidů a Ps (první sloupec); změny intenzity emise fluorescence v PBS ($c = 1 \mu\text{M}$, $\lambda_{\text{ex}} = 608 \text{ nm}$) po přidání EYPC lipozomů při různých poměrech lipidů a Ps (druhý sloupec); závislosti absorbance v pásu Q λ_{max} při různých poměrech lipidů a Ps (třetí sloupec); a závislosti fluorescenčního maxima na poměru lipidů a Ps (čtvrtý sloupec).

U **Ps4** byla vidět pouze částečná monomerizace Q-pásu, což se odrazilo i na intenzitě fluorescenčních emisních spekter, která jsou o dva řády nižší. Celkově byla interakce s **Ps4** podstatně pomalejší a pro úplnou inkorporaci se směs musela míchat 6 min místo

standardních 2 min po každém přidavku lipozomů. Odlišné chování bylo pozorováno i u **Ps1**, neboť ten měl ostrý Q-pás a vysokou fluorescenci již v čistém PBS, což ukazuje na přítomnost pouze monomerní formy v roztoku (obr. 38). Přídavek lipozomů sice nezměnil tvar absorpčního spektra, ale interakci **Ps1** s lipozomy bylo možné sledovat pomocí intenzity fluorescenčních emisních spekter podobně jako bylo nedávno publikováno ve studii o stabilizaci lipidové dvojvrstvy pomocí chlorohlinitého komplexu **Ps1**.¹⁸³ Intenzita fluorescence **Ps1** se po prvním přidavku snížila přibližně na polovinu, zatímco s rostoucí koncentrací lipidů byl pozorován následný nárůst, což potvrzuje interkalaci do lipidové dvojvrstvy. Vazebné izotermy byly podobné pro všechny studované deriváty. **Ps1-3** s malými rozdíly dosáhly fáze plateau přibližně při poměru lipid:Ps 500:1 (obr. 39b). Což neplatilo pro **Ps4**, kde se látka interkalovala se znatelným zpožděním a fáze plateau bylo dosaženo až při desetinásobném poměru lipid:Ps 5000:1 (obr. 39a). U studovaných Ps nebyly pozorovány žádné jasné vztahy mezi strukturou a hodnotou log *P*. Tento experiment potvrdil očekávané trendy dobré inkorporace všech amfifilních Ps do lipidové dvojvrstvy bez ohledu na centrální kationty a počtu náboje či charakteru v hydrofilní části struktury. Výrazným, i když ne překvapivým limitujícím parametrem se ukázala velikost makrocyclu, která omezila schopnost **Ps4** ukotvit se do lipidové dvojvrstvy.

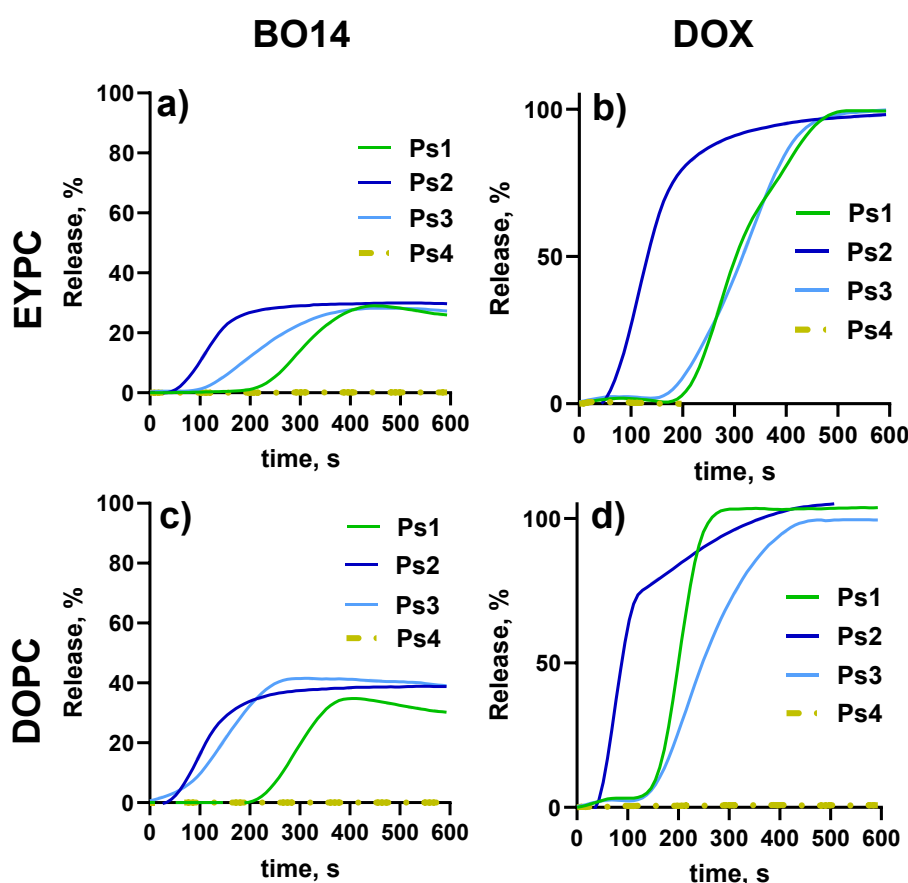


Obrázek 39 a) Interkalace studovaných Ps v PBS ($1 \mu\text{M}$) do EYPC lipozomů studovaná pomocí změny intenzity jejich fluorescence po přidání lipozomů. b) Zvětšená část a) až do poměru lipid:Ps 500:1. c-f) Absorpční spektra zkoumaných sloučenin v PBS ($c = 1,25 \mu\text{M}$) s přidávanými DOPC (červená) nebo EYPC (modrá) lipozomy v poměru 50:1 lipid: Ps. Zeleně jsou znázorněna spektra Ps po úplném navázání na EYPC (při poměru lipid:Ps 1000:1 pro **Ps1**, 2000:1 pro **Ps2** a **Ps3**, a 10 000:1 pro **Ps4**).

Pro další studie byl zvolen poměr lipidů a Ps 50:1 z důvodu nejkratšího poločasu světlem indukovaného uvolnění karga v návaznosti na předchozí studii se samotnou látkou **Ps2**.¹⁸² Pro přehlednost jsou v tomto poměru zobrazena absorpční spektra na obrázku 39 c-f pro oba typy lipozomů a pro porovnání ještě spektrum v poměru, při němž byl Ps monomerní.

6.3.4 Uvolňování indukované světlem

Uvolňování karga indukované světlem bylo prováděno pozorováním změn v emisním maximu fluorescence (**BO14** – 533 nm; **DOX** – 585 nm) v reálném čase každých 8,6 s při kontinuálním ozařování laserovou diodou (685 nm). Obě karga se uvolňovala ze dvou různých typů lipozomů s poměrem lipidů a Ps 50:1 (obr. 40). Ze závislostních křivek uvolňování byl vypočten poločas uvolňování karg pro jednotlivé kombinace Ps : lipozom : kargo (tab. 4).



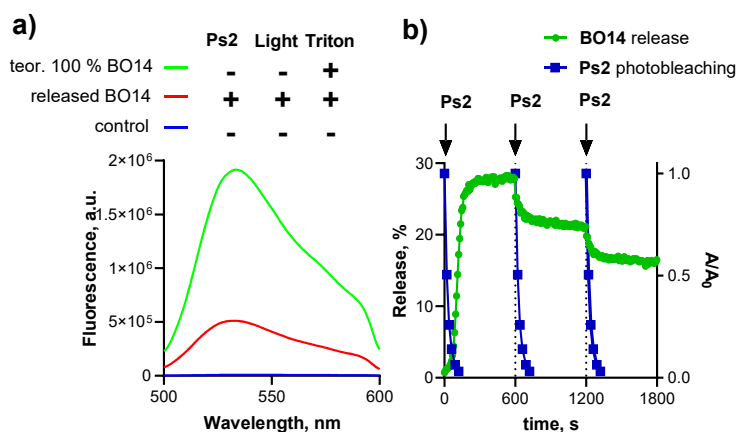
Obrázek 40 Světlem indukované uvolňování **BO14** (a, c) nebo **DOX** (b, d) z **EYPC** (a, b) nebo **DOPC** (c, d) lipozomů s interkalací různých Ps. Podmínky ozařování: 685 nm, 400 mW cm⁻².

Tabulka 4 Poločas^a uvolňování karga z lipozomů za použití různých Ps.

Ps	BO		DOX	
	EYPC	DOPC	EYPC	DOPC
Ps1	300,6	292	299,1	199,9
Ps2	112,8	108,3	127,4	84
Ps3	209,1	147	301,2	230,8
Ps4	-	-	-	-

^a Poločas představuje čas v sekundách, kdy je uvolněna polovina z maximálně uvolněného lipozomálního obsahu.

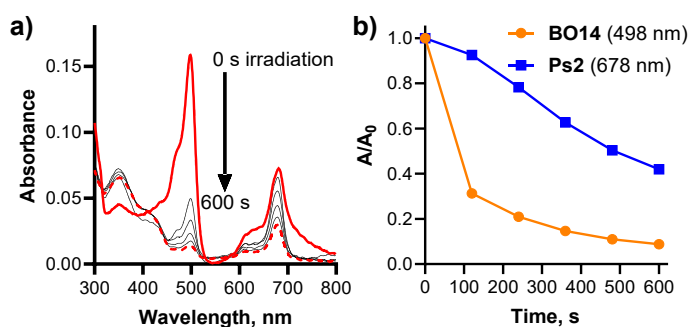
Poločasy uvolňování pro **DOX** nastínili následující účinnosti jednotlivých Ps v pořadí: **Ps2** > **Ps3** ~ **Ps1** >> **Ps4** v **EYPC** lipozomech (obr. 40b). Co se **DOPC** lipozomů týče, projevil se rychlejší poločas uvolnění u **Ps1** a **Ps3** (Obr. 40c, d). Tento trend byl v méně znatelné míře zaznamenán i u **BO14** (tab. 4). Tato pozorování byla v souladu s literaturou i našimi očekáváními v souvislosti s větším počtem dvojných vazeb v alkylových řetězcích **DOPC** lipozomů (viz výše). Vzhledem k tomu, že u **Ps2** ke snížení poločasu nedošlo ani v případě **BO14** ani **DOX**, je možné, že jsme nenarazili na limit tohoto procesu a není jisté, zda by další násobné vazby pomohly proces světlem indukovaného uvolnění lipozomálního karga urychlit. Naopak **Ps4** neprokázal v tomto směru žádnou aktivitu. Ačkoliv trendy u obou karg lipozomů byly podobné, v případě **DOX** bylo po dosažení fáze plateau dosaženo i úplného uvolnění karga, zatímco při procesu uvolňování **BO14** z lipozomů bylo při dosažení fáze plateau uvolněno mnohem nižší procento tohoto karga bez ohledu na typ lipozomů (obr. 40a, b).



Obrázek 41 a) Změny fluorescence **BO14** během experimentů uvolňování z **EYPC** lipozomů s **Ps2**. Neozářené lipozomy pouze s kargem (modrá), lipozomy s **Ps2** a ozářené po dobu 600 s a po působení Tritonu X-100 (červená), neozářené referenční lipozomy s kargem, bez **Ps2** a po působení Tritonu X-100 (zelená). b) Světlem spouštěné uvolňování **BO14** z **EYPC** lipozomů (zelená, levá osa y) s interkalovaným **Ps2** (poměr lipidů a Ps 50:1). Další dávka sloučeniny **Ps2** (stejně množství jako na začátku) byla přidána po 600 s a 1200 s (označeno šipkami). Pro srovnání je přidána fotodegradace **Ps2** (modře) (pravá osa y). Podmínky ozařování v obou případech: 685 nm, 400 mW cm⁻².

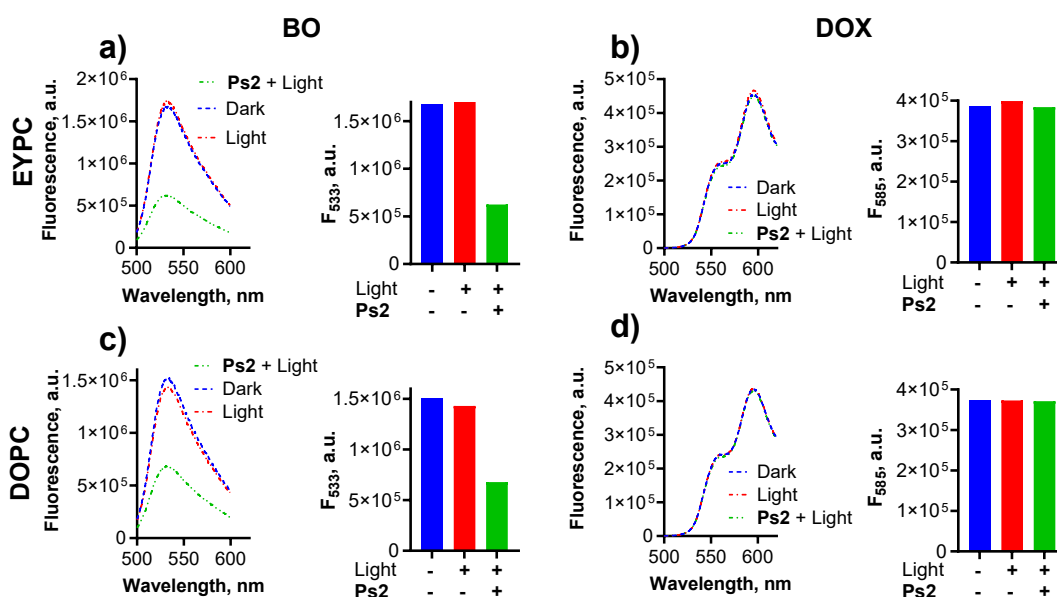
Rozhodli jsme se tento neočekávaný výsledek prozkoumat blíže. Pro vyhodnocení celkového množství uvolněného karga po skončení experimentu byly lipozomy narušeny přidáním Tritonu X-100, aby se uvolnil veškerý zbytkový obsah **BO14** (obr. 41a, červená). Ovšem už během prvních pokusů se nám úplného uvolnění nedařilo dosáhnout a konečná fluorescence například s **Ps2** dosáhla méně než 30 % očekávané hodnoty. Teoretická hodnota maximálního uvolnění karga byla naměřena jako intenzita fluorescence **BO14** uvolněného po působení Tritonu X-100 na lipozomy obsahující **BO14** bez jakéhokoliv Ps a bez ozáření (obr. 41a, zelená). Vzhledem k vysokému výtěžku singletového kyslíku **Ps2** v lipozomech (tab.2) se nabízelo vysvětlení úplného rozkladu **Ps2** předtím, než byl schopen uvolnit celý obsah karga z kavity lipozomů. Proto jsme přistoupili k opakovaným přídávům **Ps2** k již ozářeným lipozomům. Uvolněné množství **BO14** se však nezvýšilo, ale naopak snížilo (obr. 41b). To poukázalo spíše na rozklad **BO14** vyprodukovaným singletovým kyslíkem než na nedokončený proces uvolňování karga z lipozomů. Naše teorie byla potvrzena literárními zdroji, ve kterých se uvádí, že **BO14** je dealkylována ROS, což v první řadě vede k malému hypsochromnímu posunu absorpčního spektra (a tedy poklesu absorpce v místě excitace a nižší emisi fluorescence), ale navíc se také rozkládá na menší molekulární produkty bez jakékoliv absorpce ve viditelné oblasti.¹⁹⁰

Finální experiment stability **BO14** s **Ps2** po ozáření v roztoku chloroformu potvrdil jeho rychlý rozklad (obr. 42). Chloroform byl zvolen z toho důvodu, že **Ps2** je v něm monomerní a doba života singletového kyslíku je mnohem delší než v PBS ($\tau = 2-5 \cdot 10^{-4}$ s v chloroformu¹⁹¹), takže se celý proces mohl lépe monitorovat.



Obrázek 42 a) Spektrální změny během fotodegradace sloučeniny **Ps2** a **BO14** v chloroformu po ozáření laserovou diodou (685 nm, 400 mW cm⁻²). b) Fotodegradace **BO14** (oranžová, 498 nm) a **Ps2** (modrá, 678 nm) v závislosti na době ozářování.

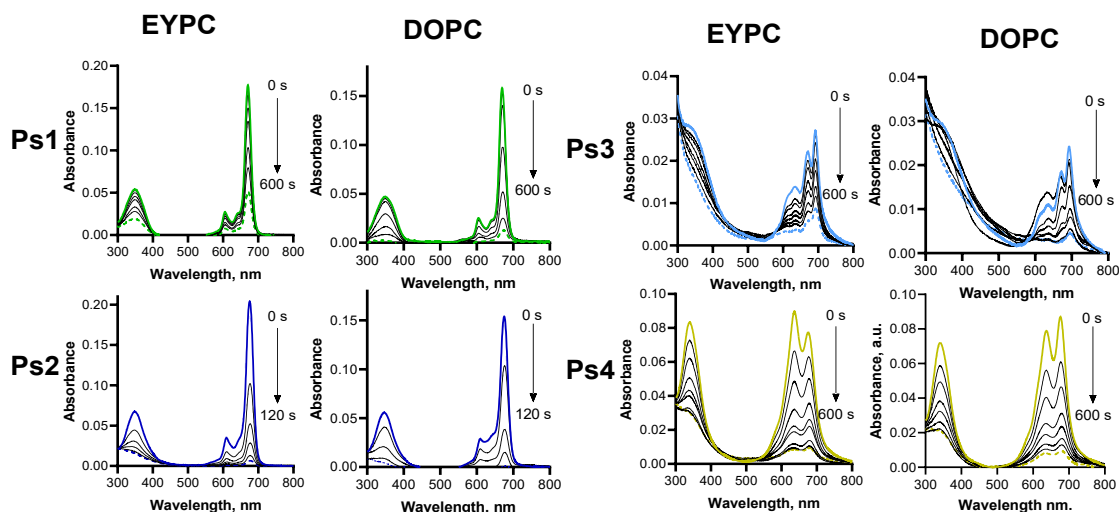
V dalším experimentu jsme se rozhodli studovat stabilitu lipozomů s oběma kargy. Proto jsme porovnali emisní spektra lipozomů po rozrušení Tritonem X-100 ve třech různých případech – po inkorporaci **Ps2** a ozáření (obr. 43, zelená); pouze po ozáření (bez **Ps2**) (obr. 43, červená); a bez ozáření i inkorporace **Ps2** (obr. 43, modrá). Kromě dříve komentované nestability **BO14** bylo nutné zjistit stabilitu **DOX** v totožných podmínkách. v kontrolních experimentech nebyly zjištěny žádné významné rozdíly mezi fluorescencí **DOX** uvolněného z ozářených lipozomů s **Ps2** a těmi, které ozářeny nebyly, což naznačuje úplné uvolnění z obou typů lipozomů bez jakéhokoli rozkladu (obr. 43b, d). Jako důležitý závěr z těchto experimentů se jeví, že **BO14** není vhodnou modelovou sloučeninou pro sledování uvolňování karga indukovaného světlem z důvodu své citlivosti na singletový kyslík a ROS, které jej rozkládají.



Obrázek 43 Fluorescence **BO14** (a, c) nebo **DOX** (b, d) naložených v lipozomech **EYPC** (a, b) nebo **DOPC** (c, d) ($c = 62,5 \mu\text{M}$) ve tmě bez **Ps** (modrá), ozářených bez **Ps** (červená) nebo ozářených v přítomnosti interkalovaného **Ps2** (zelená, $c = 1,25 \mu\text{M}$, poměr lipidů a barviva 50:1). Vzorky byly nakonec narušeny Tritonem X-100 (1 %). Podmínky ozařování: 685 nm, 400 mW cm⁻², 600 s.

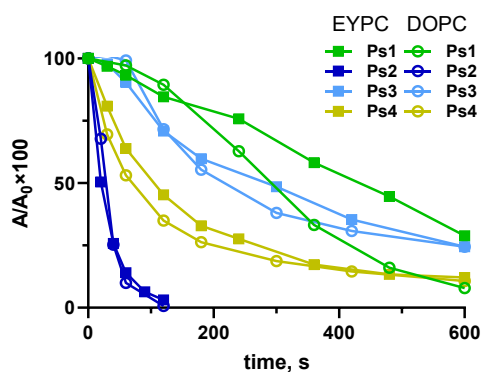
Tyto stabilitní experimenty navíc odhalily další klíčový faktor ovlivňující rychlost světlem indukovaného uvolňování lipozomálního karga. Naším původním předpokladem byl jasný vliv produkce singletového kyslíku, a tedy jasný vliv periferní substituce makrocycly **Pc**. Data ale takhle jednoduché teorii neodpovídala. Hlinitý komplex **Ps1** byl sice ve všech kombinacích obecně nejpomalejším **Ps** se svou téměř dvakrát nižší

hodnotou Φ_{Δ} (tab.2), ale hodnoty poločasu uvolňování u **Ps3** a jeho minimálního zrychlení v případě **DOPC** lipozomů, tomuto vysvětlení odporovaly.



Obrázek 44 Fotodegradace sloučenin **Ps1-4** ($c = 1,25 \mu\text{M}$) v PBS v přítomnosti **EYPC** anebo **DOPC** lipozomů (poměr lipidů a barviva 50:1) po ozáření laserovou diodou (685 nm, 400 mW cm^{-2}).

Během experimentu s opakovaným uvolňováním karga (obr 41b) se ukázal opomentý vliv fotodegradace Ps. Pro kompletní přehled byl její vliv testován u obou lipozomálních formulací v poměru lipidů a Ps 50:1 po ozáření laserovou diodou (685 nm, $400 \text{ mW} \cdot \text{cm}^{-2}$), tj. za stejných experimentálních podmínek, jaké byly použity pro uvolňování karga (obr. 44). Experimenty potvrdily úplný rozklad makrocyclů Ps. Množství Ps v lipozomech bylo zkoumáno v závislosti na době ozařování a odhalilo, že nejrychlejší rozklad byl pozorován u **Ps2** spolu s **Ps4**, přičemž rychlost byla téměř stejná bez ohledu na složení lipozomů. Nejstabilnějším se ukázal **Ps1**(obr. 45).



Obrázek 45 Fotodegradace studovaných Ps ($c = 1,25 \mu\text{M}$) v PBS v přítomnosti lipozomů (poměr lipidů a Ps 50:1) v závislosti na době ozáření. Zbytkové nerozložené množství je vypočteno z údajů o absorbanci. Otevřené symboly = **DOPC**, plné symboly = **EYPC**.

Fotodegradace Pc je způsobena generovaným singletovým kyslíkem¹⁹² (stejně jako fotooxidace lipidů a uvolňování karga), a proto je kromě chemické stability makrocyklu řízena především schopností Pc produkovat singletový kyslík. Tato schopnost makrocyklu je ovlivněna kvantovým výtěžkem singletového kyslíku dané struktury (Φ_{Δ}), úrovní její momentální agregace (agregáty singletový kyslík neprodukují) a počtem absorbovaných fotonů v dané chvíli (tj. absorpance při dané excitační vlnové délce). Všechny tyto faktory ovlivnily i námi získaná data světlem indukovaného uvolňovaného lipozomálního karga.

Jak již bylo zmíněno, zinečnaté komplexy **Ps2-4** v monomerní formě v DMSO jsou silnými producenty singletového kyslíku (tab. 2) V důsledku efektu těžkých atomů centrálního zinečnatého kationtu, jelikož tyto komplexy však mohou v PBS agregovat, jejich produkce $^1\text{O}_2$ (a tedy i fotodegradace) byla podstatně nižší. z toho důvodu byl jako nejefektivnější Ps vyhodnocen **Ps2**, který byl v obou lipozomálních formulacích převážně monomerní. Naopak druhý kationických **Ps3** byl převážně monomerní, ale díky jeho rozštěpenému absorpčnímu spektru v Q-pásmu (obr. 36), absorboval mnohem méně fotonů při použité excitační vlnové délce 685 nm, což vyústilo v nižší produkci $^1\text{O}_2$, jeho pomalejšímu rozkladu a nižšímu uvolňování karga bez ohledu na typ lipozomů. Sulfonovaný **Ps1** je při poměru lipidů a Ps 50:1 monomerní, ale díky své přirozeně nižší hodnotě Φ_{Δ} je rychlost jeho fotodegradace i rychlost jeho světlem indukovaného uvolňování lipozomálního karga také nižší. Objemný **Ps4** byl navzdory nejvyšší produkci singletového kyslíku nepoužitelný pro účely uvolňování lipozomálního karga díky své nízké interakci s lipozomy, a silné agregaci při použitém poměru lipidy:Ps 50:1. Z toho vyplývá, jak komplexním jevem je světlem indukované uvolňování a že je potřeba navrhovat struktury s vyváženými fyzikálněchemickými charakteristikami.

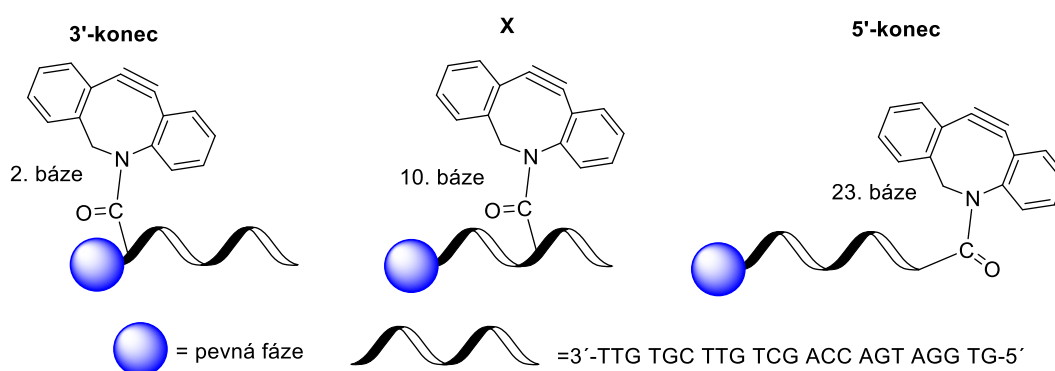
6.4 Studium efektivity azid-alkynové cykloadice při modifikaci oligonukleotidů

Finální část disertační práce porovnává vliv strukturního charakteru potenciálních, nebo již prakticky využívaných ON modifikátorů (TPyzPz, BODIPY, akridin, indocyanin) na konjugační reakci. Zaměřili jsme se na využití potenciálu termodynamicky výhodné strukturním pnutím podporované azid-alkyn cykloadice (SPAAC), patřící mezi tzv. click

reakce, které umožňují vysoce selektivní a efektivní post-syntetické značení ON vláknů na pevné fázi. Možnost zvýšené výtěžnosti konjugace ON řetězců pomocí SPAAC reakce s jakýmkoliv molekulami nesoucí ve své struktuře snadno inkorporovatelnou azidovou funkční skupinu významně rozšiřuje potenciál těchto látek. Přes velký potenciál nebyly dosud podrobněji studovány možnosti a limity SPAAC reakce v oblasti konjugace ON s organickými molekulami. V naší studii jsme proto optimalizovali reakční podmínky a zkoumali vliv velikosti, charakteru a koncentrace čtyř konjugovaných molekul, dále vliv typu pevné fáze použité pro syntézu ON, polohy modifikace v řetězci ON vůči pevné fázi a času průběhu reakce. Tato data byla částečně prezentována na konferencích a v současné době jsou podkladem pro přípravu manuskriptu.

6.4.1 Značení oligonukleotidů

Zkoumaná nescifická sekvence 5'-GTG GAT GAC CAG CTG TTC GTG TT-3' představuje ON vlákno bez silně konformních sekundárních struktur s délkou obvyklou pro molekulárně biologické sondy v rozmezí 20–25 bází. V případě značení na pevné fázi může hrát velkou roli vzdálenost místa značení od 3'-konce ON, který je vázán na pevnou fázi, a to z důvodu možných sterických překážek, hydrofilních/hydrofobních interakcí a podobných vlivů. Proto jsme pro zkoumání vlivu polohy místa značení zvolili vždy jednu ze tří možností – 2. (dále **3'**), 10. (dále **X**) a na 23. bázi (dále **5'**) (obr. 46). Toto označení bylo zvoleno na základě směru syntézy ON, tedy od 3'-konce a poslední zmiňovaná poloha se opravdu nachází na 5'-konci.

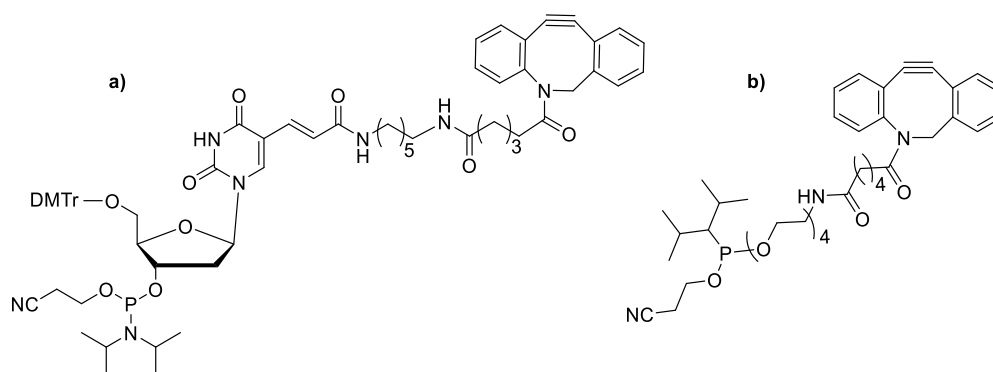


Obrázek 46 Schéma modifikovaných pozic ON od 3'-konce.

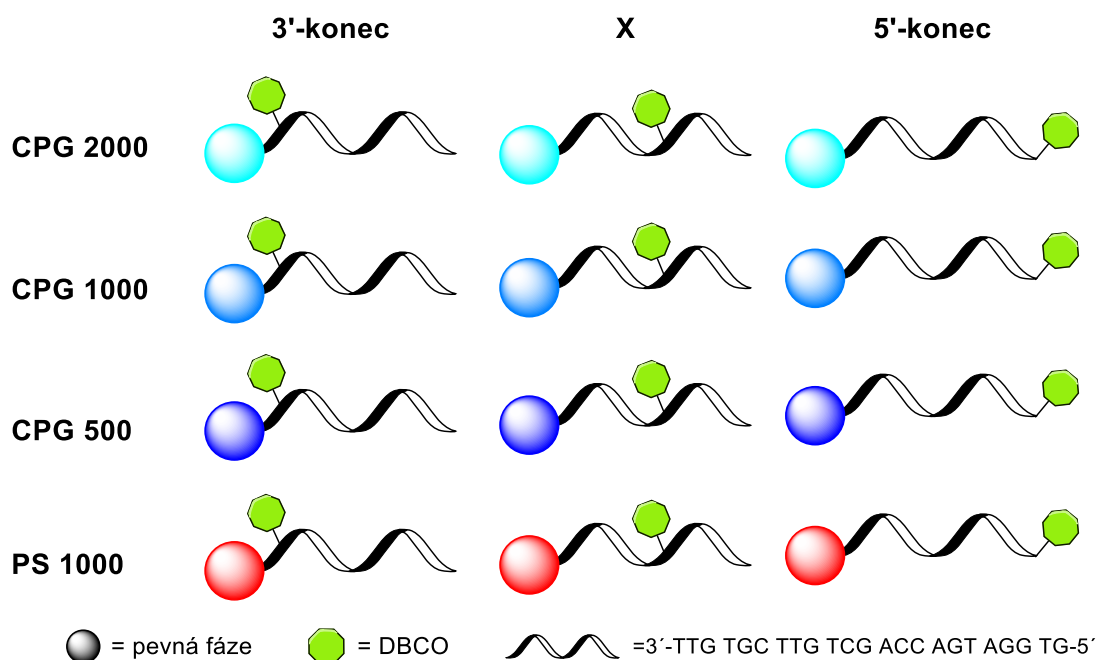
Naše skupina již v minulosti pomocí SPAAC reakce připravila funkční ON konjugáty.¹⁴⁹ Jelikož jak komerčně dostupná barviva, tak i vlastní laboratorně připravené molekuly jsou velmi nákladné, je žádoucí, aby jejich spotřeba při značení byla co nejmenší. Naším

hlavním cílem bylo proto najít optimální podmínky pro co nejlepší výtěžnost značení ON řetězce různými malými organickými molekulami s ohledem na jejich velikost, koncentraci, polohu v řetězci, a typ pevného nosiče použitého při syntéze. Jakmile byly tyto vlivy podrobně prozkoumány, byla sledována role času značení a bylo provedeno i značení na syntetizéru za využití standardního značícího programu z reálného provozu.

Řetězec ON byl upraven pomocí molekuly dibenzoazacyklooktynu (DBCO), vhodného pro reakce SPAAC. Ten je komerčně dostupný jako substituovaný nukleosidový monomer dT fosforamidit užívaný pro interní modifikace (obr. 47a) i jako samotný fosforamidit pro značení 5'-konce při syntéze ON (obr. 47b).

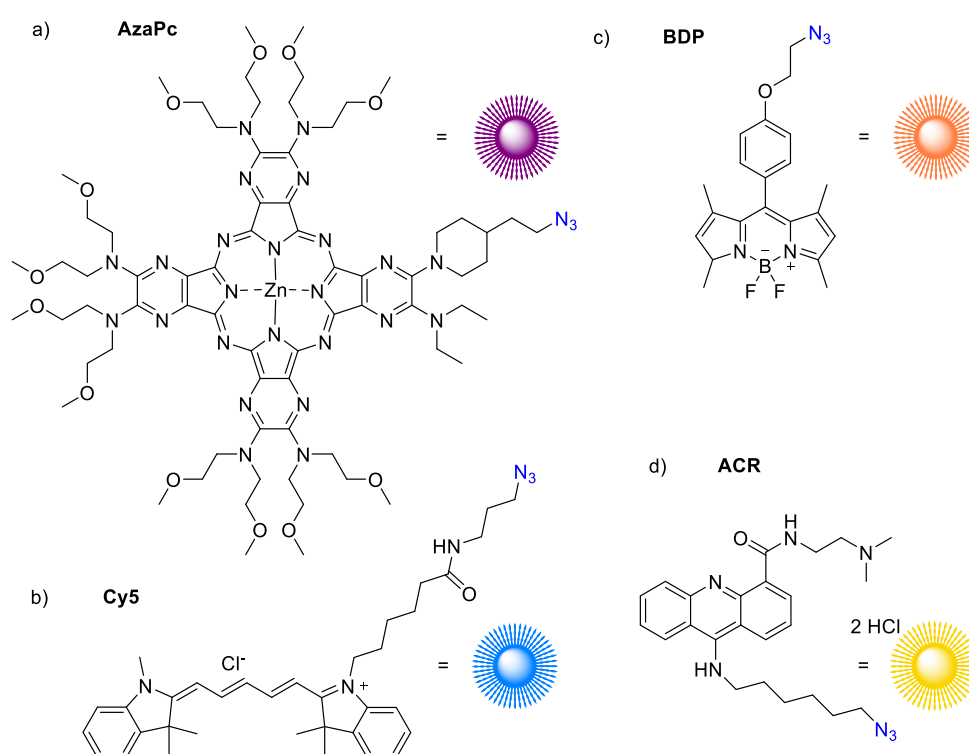


Obrázek 47 Použité fosforamiditové stavební jednotky pro syntézu azacyklooktynem modifikovaných ON
a) dT fosforamidit, b) fosforamidit.



Obrázek 48 Přehled všech kombinací poloh modifikace pomocí DBCO a použité pevné fáze.

Jelikož značící SPAAC reakce probíhala s ON před odštěpením z pevné fáze, bylo nutné porovnat vliv materiálů použitých pro syntézu ON. Sekvence byla připravena na dvou různých typech nosičů – na polystyrenové pevné fázi složené z vysoce zesíťovaného aminomethylpolystyrenu (PS) a na skle s definovanou velikostí pórů modifikovaném dlouhým aminoalkylovým řetězcem (CPG). Pevná fáze CPG se pro běžnou syntézu 23merové sekvence používá v provedení s velikostí pórů 500 Å, my jsme však použili ještě další dostupné velikosti, 1000 Å a 2000 Å, kvůli ověření vlivu možného sterického bránění pórů při značení. V experimentech tak bylo zkoumáno celkem 12 různých vzorků na pevné fázi vázaných ON řetězců (obr. 48)



Obrázek 49 Struktury modifikátorů a) AzaPc, b) Cy5, c) BDP, d) ACR.

Existuje mnoho typů funkčních molekul konjugovaných se syntetickými ON. Mezi nejčastěji používané patří fluorescenční značky, zhášedce fluorescence, specifické vazebné ligandy a stabilizátory duplexů. Proto jsme do naší studie vybrali zástupce některých těchto skupin s různou velikostí a polaritou. Použili jsme poměrně velkou, vysoce lipofilní fluorescenci zhášející molekulu struktury azaftalocyaninu (**AzaPc**, MW = 1596,19; obr. 49a),¹⁹³ komerčně dostupný fluorofor indocyaninového typu známý jako Cyanine 5 (**Cy5**, MW = 601,24; obr. 49b), fluorofor typu BODIPY (**BDP**,

MW = 409,25; obr. 249c)¹⁴⁸ a interkalující derivát akridinu (**ACR**, MW = 433,56; obr. 49d).¹⁴⁷

Při standardní syntéze ON pomocí fosforamiditové chemie se koncentrace stavebních jednotek pohybuje v rozmezí 0,07 – 0,1 M. Pro post-syntetické značení ON se koncentrace značících činidel v různých postupech liší v rozmezí jednotek až stovek mM, ale vždy se zachováním molárního poměru značení ke značenému ON alespoň 2:1.¹¹⁰ Velká většina publikovaných protokolů je určena pro reakce v roztoku. Údaje o post-syntetickém značení kliknutím na pevné fázi jsou k dispozici jen zřídka,¹⁹⁴ přičemž pouze jedna studie hlouběji zkoumá využití chemie měďnými ionty katalyzované azid-alkynové cykloadice (CuAAC).¹²¹ Abychom prozkoumali vliv koncentrace, provedli jsme naši studii se čtyřmi koncentracemi vybraných modifikátorů 0,1 mM, 1 mM, 10 mM a 100 mM. Celkově byly tedy od každé kombinace pevné fáze a polohy modifikace ON řetězce (obr. 48) provedeny konjugace se čtyřmi různými molekulami, s každou ve čtyřech koncentracích. Každá ze 192 reakcí (4 pevné fáze × 3 pozice modifikace × 4 modifikátory × 4 koncentrace modifikátorů, tab. 5) byla provedena v trojím opakování pro zajištění robustnosti výsledků.

Tabulka 5 Přehled zohledněných charakteristik a parametrů.

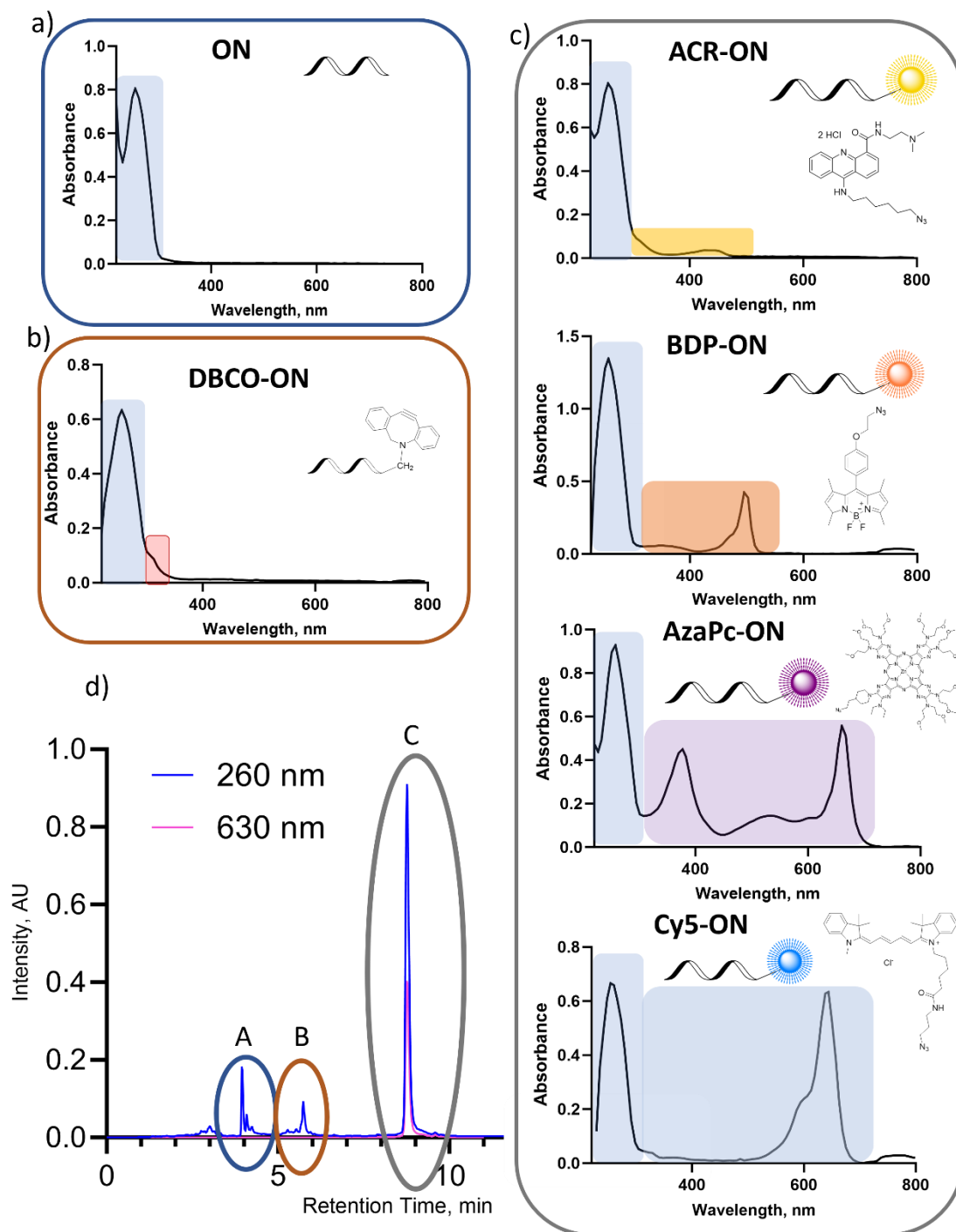
Pevná fáze	CPG 2000/ 1000 / 500/ PS 1000
Pozice modifikace	3' / X / 5'
Modifikátor	AzaPc / Cy5 / BDP / ACR
Koncentrace modifikátoru	0,1 / 1 / 10 / 100 mM

Abychom zajistili úplnou konjugaci a zabránili vlivu variability reakčních podmínek, prováděli jsme hlavní linii reakčních experimentů po dobu 24 hodin. V další fázi projektu jsme monitorovali vliv zkracování doby reakce na výtěžnost SPAAC. Získané poznatky byly následně využity pro stanovení času použitého při značení na syntetizéru.

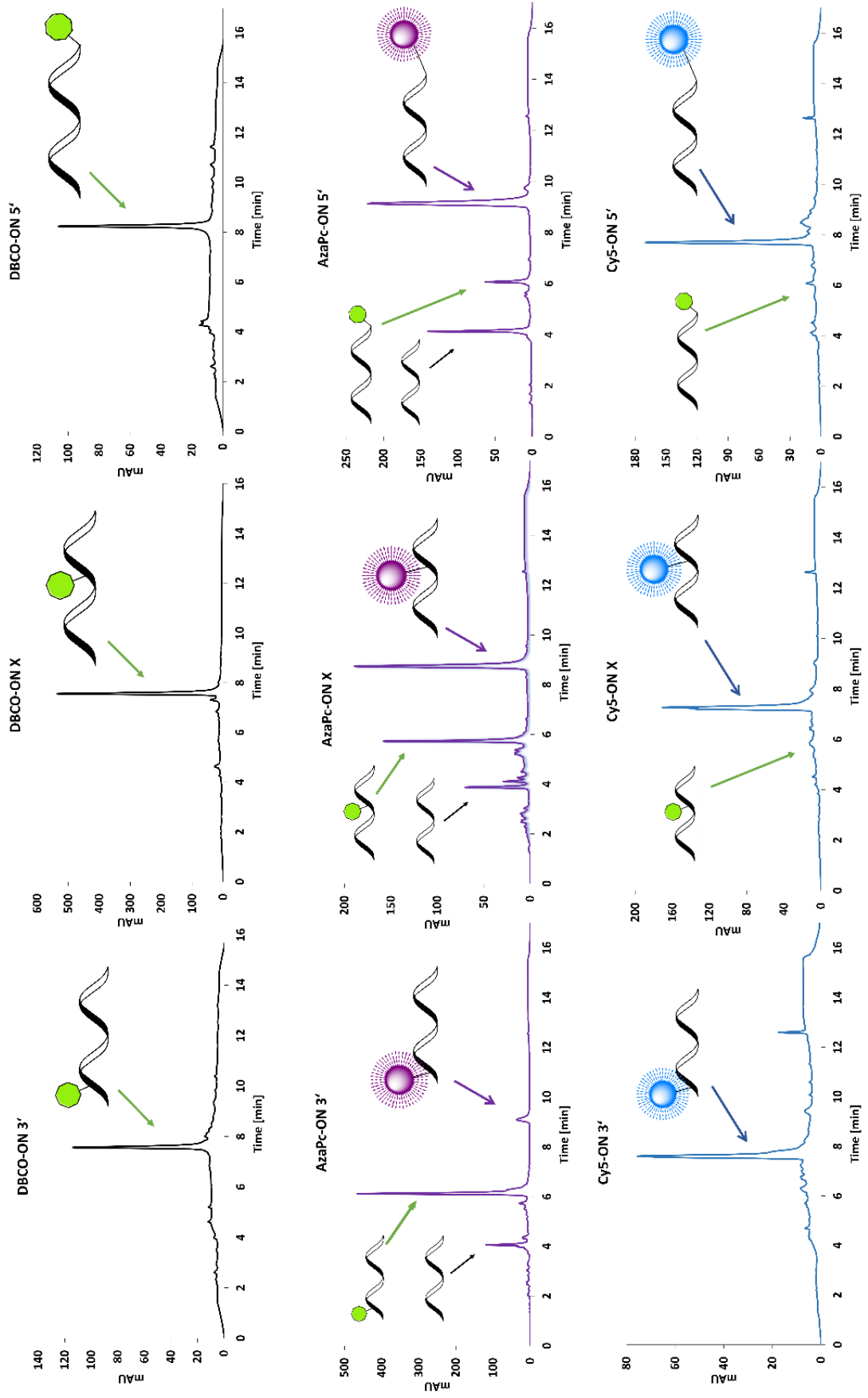
6.4.2 Analýza a vyhodnocování

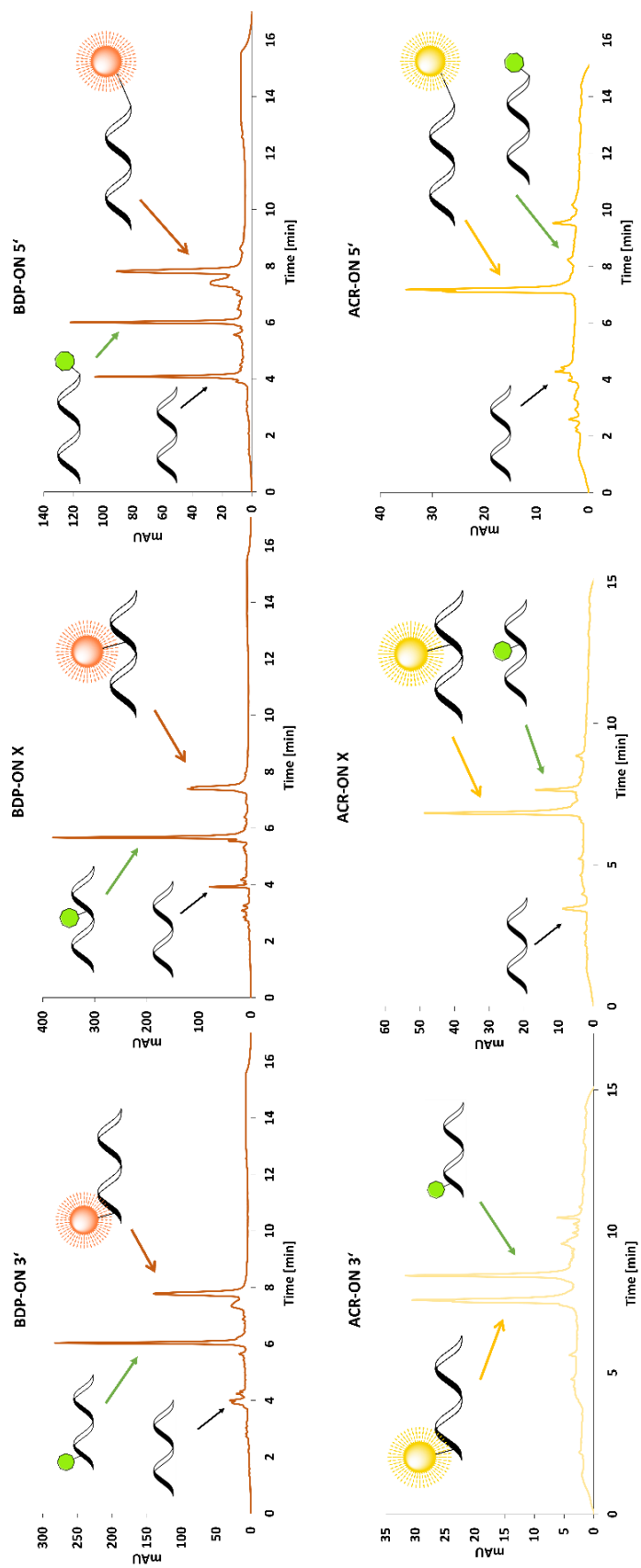
Běžně používanou metodou purifikace ON je HPLC na reverzní fázi s DAD detekcí s UV/vis detekcí.¹¹⁰ Tato metoda detekce se jevila jako ideální i v našem případě, jelikož vznikající konjugáty (**AzaPc-ON**, **Cy5-ON**, **BDP-ON** a **ACR-ON**) ve svém absorpčním spektru obsahují pásy všech použitých chromoforů (obr. 50c). Použité modifikátory mají ve svém absorpčním spektru charakteristické pásy s maximy ve středních až vyšších vlnových délkách na rozdíl od ON s typickým maximem při 260 nm (obr. 50a). Dokonce

i ON modifikované pomocí DBCO (**DBCO-ON**) v jakékoliv poloze je jednoznačně odlišitelné na základě absorpčního spektra obsahujícího navíc drobný bathochromně posunutý absorpční pás kolem 320 nm (obr. 50b).



Obrázek 50 a) Absorpční spektrum neznačené sekvence **ON**, b) absorpční spektrum **DBCO-ON**, c) absorpční spektra všech konjugátů **ACR-ON**, **BDP-ON**, **AzaPc-ON** a **Cy5-ON**, d) modelový chromatogram, kde **A** je pik neznačeného **ON**, **B** je pik **DBCO-ON** a **C** je pik konjugátu.





Obrázek 51 Zástupci chromatogramů modifikovaných ON.

Vývoj základních metod probíhal v rámci rigorózní práce PharmDr. Tomáše Šemleje pod vedením doc. PharmDr. Radima Kučery, Ph.D. a nebude v rámci disertační práce blíže diskutován. Kromě charakteristických absorpčních spekter bylo samozřejmě využito i nemodifikované **ON** sekvence a **DBCO-ON** na všech zkoumaných pozicích jako vnějších standardů. Na těchto základech byly identifikovány píky představující vzniklé konjugáty a residua zbylá ze syntézy sekvence a značení (**DBCO-ON** a nemodifikovaný **ON**) (obr. 50a, b). S retenčními časy pohybujícími se okolo 4 min pro nemodifikovaný **ON** a 6 min pro **DBCO-ON** (obr. 51). Retenční čas konjugátů se pohyboval v rozmezí 7,5 – 10 min. U konjugátu typu **ACR-ON** bylo z důvodu vyšší polaritativy značící molekuly pořadí píků opačné oproti ostatním a konjugát se eluoval dříve (7,5 min) než výchozí **DBCO-ON** (8,5 min). Identita píků konjugátů pak byla navíc ověřena pomocí hmotnostní spektrometrie MALDI (viz kap. 5.4.3.).

Každý vzorek z triplikátu provedení reakce byl analyzován třikrát pro potvrzení plně rekonstituovaného stavu vzorku a ověření výsledku. U plně homogenních vzorků jsme podle očekávání nepozorovali mezi jednotlivými nástříky žádný rozdíl. U píků konjugátů menších molekul si lze všimnout částečně naštěpeného tvaru, nebo píku s širší bazí (obr. 51, např. **BDP-ON X**, **ACR-ON 5'**). Tento jev byl v naší skupině při značení pomocí SPAAC již sledován a bylo prokázáno pomocí hmotnostní spektrometrie, že se jedná o polohové izomery SPAAC reakce.^{127, 147} Z tohoto důvodu jsme neusilovali o úplnou separaci těchto píků.

6.4.3 Výsledky značení

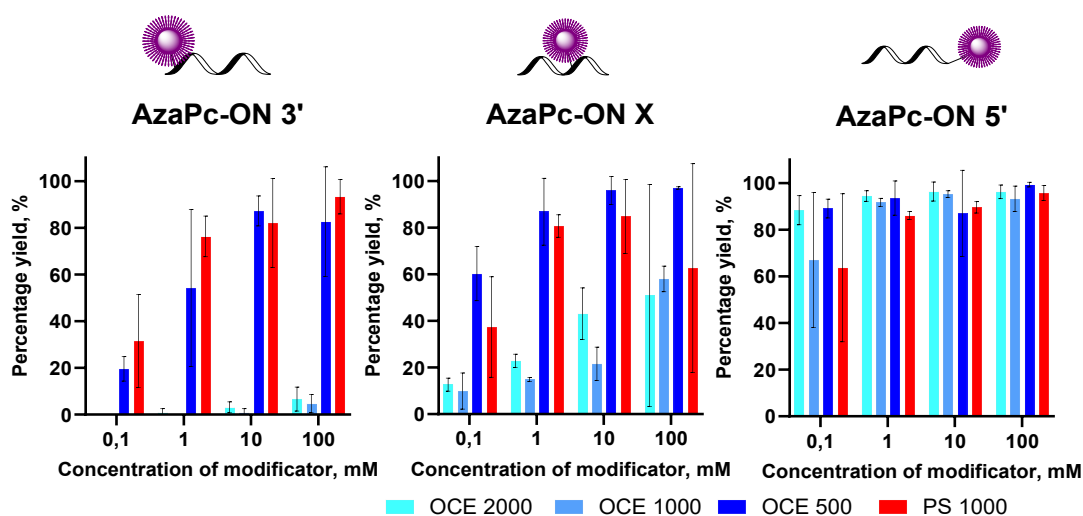
Po integraci každého záznamu byla z ploch pod píkem modifikovaného **ON** a nezreagovaného **DBCO-ON** vypočítána procentuální efektivita reakce dle rovnice:

$$\text{výtěžek \%} = \frac{AUC_S}{AUC_{ON} + AUC_S} \times 100,$$

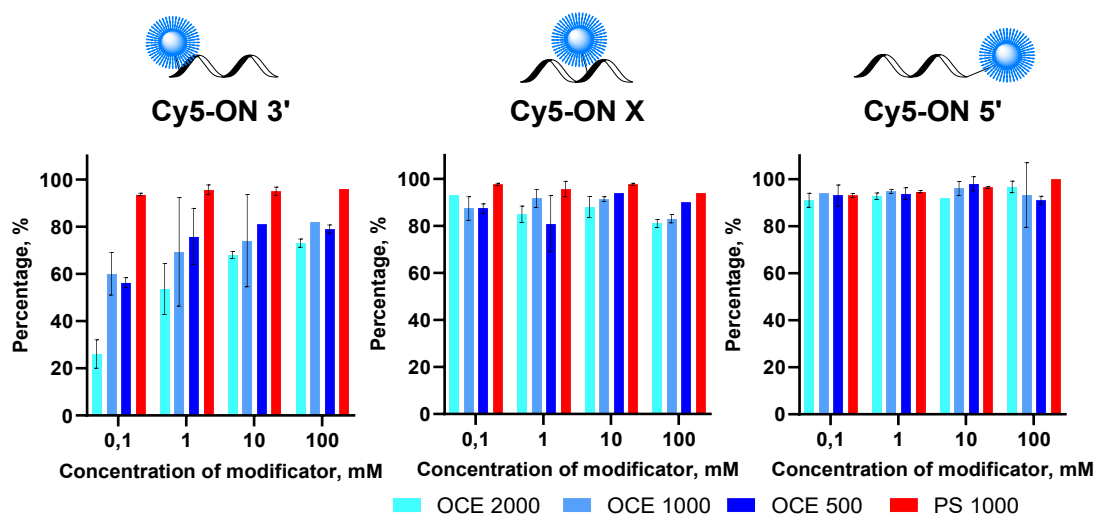
kde AUC_S je plocha pod píkem modifikovaného **ON** a AUC_{ON} je plocha pod píkem nezreagovaného **DBCO-ON**.

Hodnoty každého nástříku a stejných vzorků byly zprůměrovány a výsledkem jsou tři jednotlivé grafy pro každou pozici u každého modifikátoru. Z výsledků značením pomocí **AzaPc** lze pozorovat vysokou variabilitu výtěžků (obr. 52). Zatímco SPAAC na 5'-konci

vykazuje konzistentní efektivitu kolem 90 % i při nejnižších koncentracích na všech typech pevných fází, interní značení na 10. bazi již výrazně poukazuje na vliv použité pevné fáze. Nosič PS a především CPG 500 zde prokázaly ve většině koncentrací více než dvojnásobný výtěžek značení oproti CPG 1000 a CPG 2000. Vysoká výtěžnost se projevila už při použití 10mM značícího roztoku. Při této koncentraci na pevné fázi CPG 1000 a 2000 byly výtěžky pod 50 %, a ještě více byl tento rozdíl viditelný v pozici nejbližší k pevné fázi. Zde CPG nosiče s větší porozitou – 1000 Å a 2000 Å neposkytly ve většině koncentrací žádný výtěžek a v koncentraci 100 mM pouze výtěžky v řádu jednotek procent. Efektivita CPG 500 a PS byla tedy o více než řád vyšší.

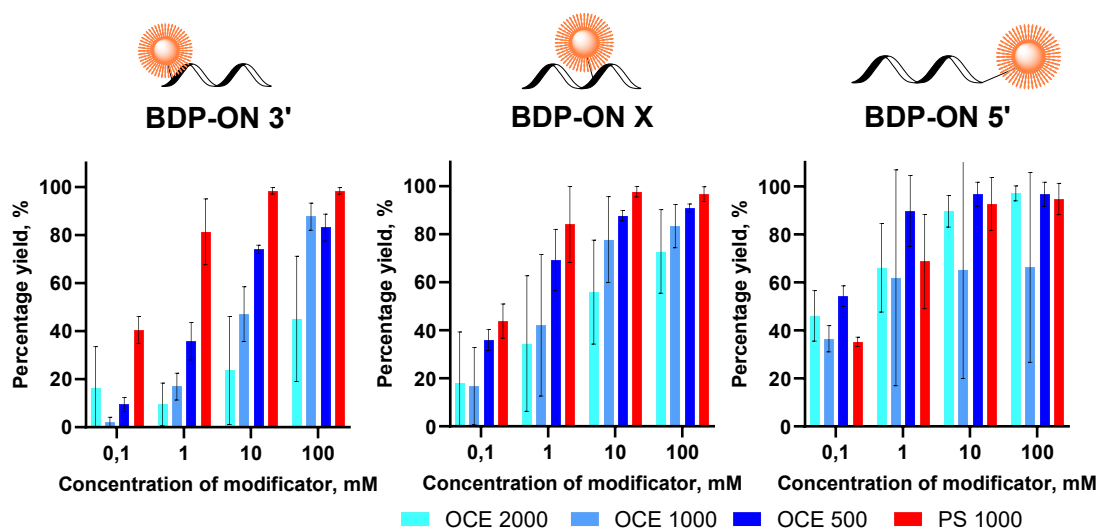


Obrázek 52 Výsledky značení ON pomocí různých koncentrací AzaPc.



Obrázek 53 Výsledky značení ON pomocí různých koncentrací Cy5.

Výsledky značení pomocí **Cy5** vykázaly o poznání vyšší efektivitu (obr. 53). I nejnižší použitá koncentrace 0,1 mM při značení uprostřed a na 5'-konci řetězce reagovala s minimálními rozdíly mezi jednotlivými nosiči. Na 3'-konci kopírovaly výtěžky trendy vycházející u předchozího modifikátoru, tedy nižší výtěžky při použití pevné fáze CPG 2000 a nejlepší výtěžky u PS. Podobně jako u **ACR** (viz dále) se zde významně projevil pozitivní vliv tohoto materiálu. Výtěžky na CPG 1000 byly v případě této značky srovnatelné s CPG 500.

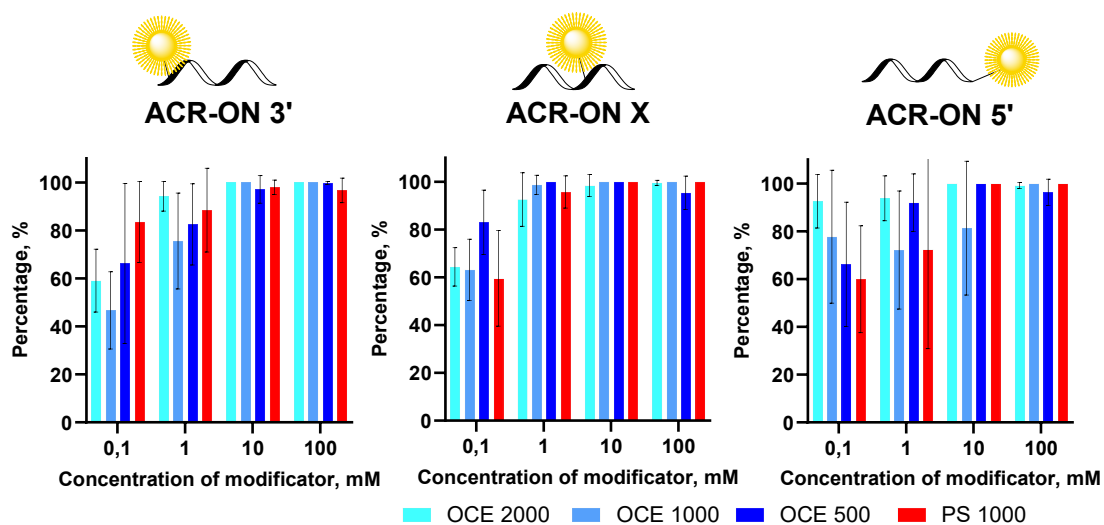


Obrázek 54 Výsledky značení ON pomocí různých koncentrací BDP

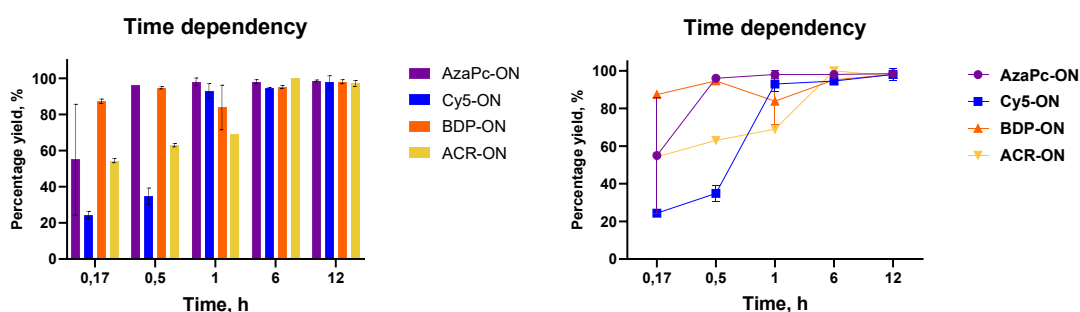
Ve výsledcích **BDP** modifikátoru (obr. 54) lze číst ve všech pozicích obdobné i když méně výrazné trendy jako v případě **AzaPc**. Čím blíže se SPAAC nacházel k nosiči, tím více byl snížen její výtěžek, a to především u pevné fáze CPG 2000. Z experimentů na CPG 1000 se nezískala konzistentní a jasně čitelná data. Na 3'-konci i uprostřed řetězce byl jasně viditelný vliv koncentrace, přičemž 100 mM poskytlo srovnatelnou výtěžnost jako v ostatních pozicích řetězce. Výtěžky na 5'-konci ovšem vykazují velký rozptyl směrodatné odchylky, což indikuje chybu v průběhu jedné ze tří sérií experimentů, která výrazně ovlivnila výsledné hodnoty. Ačkoliv by se nabízelo vysvětlení v podobě špatného naředění modifikátoru, je to nepravděpodobné. Tato odchylka by se musela projevit v celé sérii dané koncentrace modifikátoru, neboť byl vždy připravován jeden zásobní roztok pro značení na všech pozicích. Podobně jako u **Cy5** i v případě **BDP** se zvýraznila převaha výtěžnosti na PS pevné fázi nad ostatními materiály. Ve všech pozicích byla u této pevné fáze patrná výrazná koncentrační závislost, nejvíce však při

značení u 3'-konce. Pro dosažení uspokojivé výtěžnosti bylo možné použít na všech pozicích 10mM roztok modifikátoru i v případě CPG 500, aleu PS pevné fáze byla pro vysoký výtěžek dostačující už 1mM koncentrace.

ACR modifikátor se podle výsledků jeví jako nejúčinnější značící molekula, jelikož výtěžnost SPAAC reakce je ovlivněna různými podmínkami jen minimálně (obr. 55). I 1mM koncentrace naznačila velmi vysoké výtěžky na všech pozicích bez ohledu na druh použité pevné fáze. Pouze v případě 0,1mM koncentrace modifikátoru jsou výsledky méně konzistentní.



Obrázek 55 Výsledky značení ON pomocí různých koncentrací ACR.

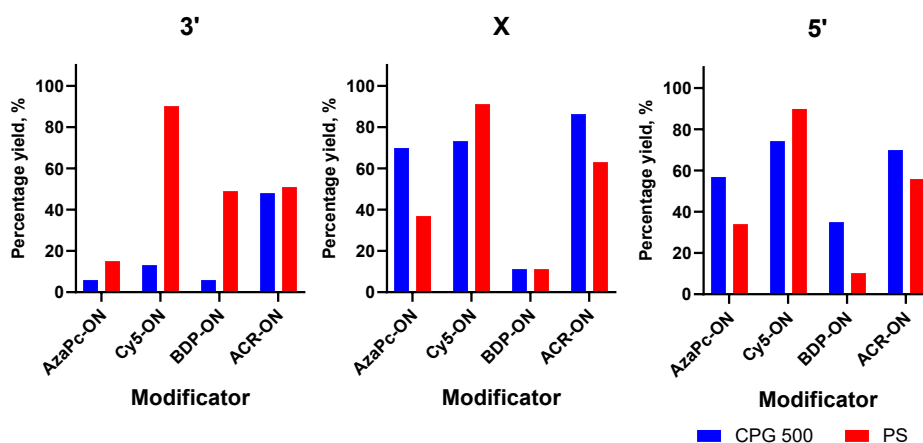


Obrázek 56 Vliv času na SPAAC všech modifikátorů na 5'-konci, pevné fázi CPG 500 Å v koncentraci 1mM ve dvou provedení

Z průřezu všech výsledků jsme zvolili kombinaci polohy modifikace, pevnou fází CPG 500 a nejnižší koncentrace modifikátoru, na které jsme vyzkoušeli vliv času značící reakce SPAAC ve dvou opakováních (obr. 56). **AzaPc-ON** a **BDP-ON** byly naznačeny už

během deseti minut, i když v případě AzaPc s proměnlivým výsledkem. Naopak **Cy5-ON** se naznačilo až po hodině a **ACR-ON** po 6 h.

Kombinace 1mM koncentrace modifikátoru a 1 h byla aplikována i na experiment v reálném provozu (obr. 57), kdy bylo 30 nmol naváženo do kolony a naznačeno upraveným značícím cyklem na syntetizéru ABI 394 s celkovou dobou působení 1 h. Viditelně odchýlené hodnoty výtěžku oproti laboratorním experimentům byly očekávány. Při značení za využití přístroje je třeba pro optimální výsledek přizpůsobit mnoho parametrů, jako je doba promývání reagenциemi a acetonitrilem, optimální koncentrační rozsah při couplingu a další. Toto nejspíše ovlivnilo výsledky **BDP-ON** na všech pozicích. Tento experiment měl za úkol potvrdit koncept proveditelnosti značení v reálných podmínkách ve všech polohách modifikace řetězce v co nejmenší koncentraci na dvou běžně používaných pevných fázích. Zajímavý je vysoký výtěžek v případě PS pevné fáze u **Cy5-ON 3'**, který odpovídá výsledkům na ostatních pozicích. Jelikož fluorofor **Cy5** je ve formě fosforamiditu pro přímé značení oligonukleotidů komerčně dostupný pouze pro značení na 5'-konci, výsledky tohoto experimentu naznačují skutečně vysoký potenciál této metody, realizované na PS pevné fázi v praxi.



Obrázek 57 Značení na ABI 394 syntetizéru.

Průřezem všech výsledků lze konstatovat vysokou efektivitu SPAAC ve výrazné většině kombinací charakteru modifikátoru, pozice v řetězci a povaze pevné fáze v koncentraci o jeden řád nižší, než je doporučovaná značící koncentrace komerčních modifikátorů. Jedinou výjimku tvoří objemný **AzaPc**, u něhož reakce v pozicích blíže u pevné fáze probíhá uspokojivě pouze na PS a CPG pevných fázích s nižší velikostí pórů. Tento jev

se nám nepodařilo uspokojivě vysvětlit. Může souviset s tím, že v případě CPG se jedná o poměrně silně polární materiál se skupinami SiOH, které jsou v neutrálním pH záporně nabitě. U pevných fází s většími póry jsou 3'-konce oligonukleotidů ukotvené hlouběji uvnitř částic pevné fáze a relativně velká, silně lipofilní molekula k nim hůře proniká. Jedná se ale prozatím pouze o teorii, v literatuře jsme nenalezli studie, které by popisovaly tuto problematiku. Tato teorie je ale podpořena i trendy chování ostatních modifikátorů, které se ve své struktuře liší právě nábojem, resp. polaritou. **BDP** je jakožto zwitterion povrchovými zápornými náboji ovlivněn nejvíce, a proto jsou i jeho výsledky nekonzistentní. **ACR** a **Cy5** jakožto kationické látky jsou tímto záporným nábojem naopak přitahovány, a proto vykazují výrazně vyšší výtěžky i v nejnižších koncentracích při použití pevné fáze CPG 1000 a GPG 2000. Polystyrenová pevná fáze je na druhou stranu využívána i v organické syntéze a přípravě peptidů právě pro svou vynikající stabilitu a inertnost,^{195, 196} a proto se v jejím případě výtěžnosti SPAAC takové rozdíly ve struktuře modifikátorů nedotknou. Tato problematika bude podrobena dalším experimentům, které snad jasně prokážou vlivy uplatňující se v této reakci.

7 Závěr

Tato práce se zabývala studiem struktury a fotofyzikálních vlastností Pc a TPyzPz.

První část se zabývá přípravou křemičitých komplexů TPyzPz. Vyzkoušeny byly dvě metody přípravy, přičemž byly popsány klíčové parametry ovlivňující komplexaci křemičitých kationtů do bezkovových derivátů TPyzPz nesoucích různé periferní skupiny. Právě elektronový charakter periferie má velký vliv na potřebné množství trichlorsilanu, a dobu či proveditelnost reakce. Blíže byla prověřena i axiální substituce, její labilita a nutnost silikonové vazby.

Druhá část zkoumala hořečnaté komplexy Pc a TPyzPz, stabilitu jejich centrálního kationtu kovu od neutrálních po silně kyselé podmínky. Do detailu zkoumala a potvrdila acidoprotolytický mechanismus demetalace v organických rozpouštědlech a solvolytický mechanismus v polárním prostředí. Bylo potvrzeno, že proces demetalace podléhá kinetice prvního řádu a jeho rychlost je přímo úměrná síle acidity prostředí. Z porovnání dvou ochranných systémů mikroemulzí a lipozomů vyšla najevo vyšší stabilita lipozomálních systémů, a navíc bylo možné pozorovat vyšší stabilitu TPyzPz v obou studovaných DSS.

V další části byla provedena rozsáhlá studie světlem indukovaného uvolňování lipozomálního obsahu se zaměřením na různé složení lipidů, Ps a karga. Byla potvrzena teorie singletového kyslíku produkovaného Ps jako hlavního hnacího motoru rozpadu lipozomů. Avšak také byla prokázána vysoká součinnost dalších faktorů, které je třeba zohlednit při přímém porovnání různých Pc, těmi je především úroveň jejich agregace v roztoku a intenzita absorpce světla při dané excitační vlnové délce. Především však byla prokázána důležitost úvodních stabilitních testů jakéhokoliv karga právě vůči fotooxidačním dějům probíhajících v rámci světlem indukovaného uvolňování lipozomálního obsahu. Potvrdila se vyšší citlivost k uvolňování u lipozomů s větším počtem dvojných vazeb v alkylových řetězcích v důsledku intenzivnější fotoperoxidace fosfolipidů. Celkově studie potvrdila vysoký potenciál amfifilních Pc jako Ps při světlem indukovaném uvolňování z lipozomů, zejména těch s vysokou tvorbou singletového kyslíku a dobrou interkalací do lipidové dvojvrstvy.

Poslední část této práce se zabývala studiem SPAAC jako metodou post-syntetické modifikace ON na pevné fázi a v rozsáhlé studii byl porovnán vliv koncentrace a povaha modifikátoru, pozice modifikace v řetězci vůči pevné fázi a také typ použité pevné fáze při syntéze ON na výtěžnost této modifikační reakce. Vyšlo najevo, že charakter modifikátoru může mít výrazný vliv na výtěžnost v pozicích blíže povrchu pevné fáze v závislosti na materiálu použité pevné fáze. Dále byl zkoumán vliv času na reakci a také proběhly pilotní zkoušky na syntetizéru potvrzující vysoký potenciál SPAAC v praxi.

8 Seznam publikovaných vědeckých a odborných prací

8.1 Články v impaktovaných časopisech

P1 Kolářová, M.; Zimčík, P.; Ivanova, S.; Miletín, M.; Nováková, V. Synthesis of peripherally substituted aza-analogues of Si(IV) phthalocyanines by complexation method. *J. Porphyr. Phthalocyanines* **2023**, 27 (1), 444-451. DOI: 10.1142/s108842462350013x. (Cat.: Chemistry, multidisciplinary **IF₂₀₂₂: 1.5, Q4**; **AIS₂₀₂₂: 0.208, Q4**)

Podíl autorky: Příprava struktur, fotofyzikální experimenty, vyhodnocení dat, metodika. Podíl na přípravě originálního textu publikace, editace.

P2 Kolářová, M.; Mulaku, A.; Miletín, M.; Nováková, V.; Zimčík, P. Magnesium Phthalocyanines and Tetrapyrizinoporphyrazines: The Influence of a Solvent and a Delivery System on a Dissociation of Central Metal in Acidic Media. *Pharmaceuticals* **2022**, 15 (4). DOI: 10.3390/ph15040409. (Cat.: Chemistry, medicinal **IF₂₀₂₂: 4.6, Q2**; **AIS₂₀₂₂: 0.772, Q2**)

Podíl autorky: Příprava formulací, fotofyzikální experimenty, vyhodnocení dat, metodika, vizualizace. Podíl na přípravě originálního textu publikace, editace.

8.2 Ústní prezentace

- **2023** „Complexation method as a useful tool in silicon(iv) tetrapyrizinoporphyrazines synthesis”, 13th Postgraduate and Postdoc Conference at Charles University, Faculty of Pharmacy.
- **2022** „Oligodeoxynucleotide probes labeling: influences on a click reaction efficiency ”, 12th Postgraduate and Postdoc Conference at Charles University, Faculty of Pharmacy.
- **2021** „A click reaction in oligodeoxynucleotide probes labelling”, 49th conference Synthesis and Analysis of Drugs 2021.

- **2021** „Efficiency of a click reaction in an oligodeoxynucleotide probes preparation”, 11th Postgraduate and Postdoc Conference at Charles University, Faculty of Pharmacy.
- **2020** „Synthesis of silicon complexes of tetrapyrazinoporphyrazines”, 10th Postgraduate and Postdoc Conference at Charles University, Faculty of Pharmacy.
- **2019** „Stability evaluation of magnesium complexes of phthalocyanines and azaphthalocyanines under acidic conditions”, 9th Postgraduate and Postdoc Conference at Charles University, Faculty of Pharmacy

8.3 Plakátová sdělení

- **2022** „The influence of a solvent and a delivery system on a dissociation of the central metal of magnesium phthalocyanines and tetrapyrazinoporphyrazines in acidic media“, ICPP 12, Madrid, Španělsko.
- **2022** „Efficiency of Strain Promoted Azide-Alkyne Cycloaddition of Azaphthalocyanine Fluorescence Quencher and BODIPY Fluorophore with Oligonucleotides“, ICPP 12, Madrid, Španělsko.
- **2021** „Silicon complexes of azaphthalocyanines with heteroatom peripheral substitution: different synthesis approaches“, ICPP 11, Buffalo, USA. (on-line)
- **2021** „Delivery systems as a protection tool of magnesium phthalocyanines and tetrapyrazinoporphyrazines against demetallation in acidic media“, 5th Photodynamic Day, Istanbul, Turecko. (online)
- **2019** „Magnesium phthalocyanines and tetrapyrazinoporphyrazines: kinetic inertness of central cation in acidic media and demetallation“, Liblice 54th Conference: Advances in Organic, Bioorganic and Pharmaceutical Chemistry.
- **2019** „Delivery systems as a protection of magnesium complexes of phthalocyanines and tetrapyrazinoporphyrazines in acidic media“, XIII International Conference "Synthesis and application of Porphyrins and their analogues", Ivanovo, Rusko.
- **2018** „Synthesis of fluorescent azaphthalocyanines for binding to oligonucleotides“, Liblice 53rd Conference: Advances in Organic, Bioorganic and Pharmaceutical Chemistry.

9 Granty

9.1 Hlavní řešitelka

2021–2023

Univerzita Karlova, CZ.02.2.69/0.0/0.0/19_073/0016935, projekt START/MED/079
Light-triggered drug release from liposomes

9.2 Členka výzkumného týmu

2021-2022

Grantová agentura České republiky, projekt 21-14919J

Hlavní řešitel: doc. PharmDr. Veronika Nováková, Ph.D.

Porfyrainoidy s nekovovými centrálními atomy jako nové perspektivní fotosenzitizéry a fluorescenční senzory

2020-2023

Univerzita Karlova, projekt Primus 20/SCI/013

Hlavní řešitel: doc. PharmDr. Veronika Nováková, Ph.D.

Studium ftalocyaninů pro fotodynamickou terapii nádorů a biozobrazování

2020-2022

Grantová agentura České republiky, projekt GA20-0921S

Hlavní řešitel: prof. PharmDr. Petr Zimčík, Ph.D.

Využití supramolekulárních interakcí ke zlepšení fotodynamických vlastností fotosenzitizérů

2018-2020

Grantová agentura České republiky, projekt 18-08169S

Hlavní řešitel: doc. PharmDr. Tomáš Šimůnek, Ph.D.

Studium jednotlivých isoform topoisomerasy II v protinádorovém a kardiotoxickém působení antracyklinů a jejich modulací bisdioxopiperaziny

2017-2019

Grantová agentura České republiky, projekt 17-19094S

Hlavní řešitel: prof. PharmDr. Petr Zimčík, Ph.D.

Azaftalocyaniny – nefluoreskující zhášedce pro DNA hybridizační sondy

10 Stáže, ocenění a další profesní zkušenosti

10.1 Výzkumná stáž

- **1. 3. 2022 – 31. 7. 2022** – pěti měsíční stáž ve výzkumné skupině Nanoscience and Molecular Materials Research Group, Universidad Autónoma de Madrid, Španělsko.

Vedoucí: prof. Tomás Torres Cabada, prof. Salomé Rodrigues Morgado

Náplň stáže:

- Příprava amidů kyseliny nikotinové s alkylaminoadamantylem
- Příprava symetricky a asymetricky axiálně substituovaných ftalocyaninových komplexů s rutheniem
- Členka realizačního výboru konference ICPP 12, Madrid, Španělsko

10.2 Obdržená ocenění

- **2021** 49th Conference Synthesis and Analysis of Drugs 2021–1. místo za nejlepší prezentaci „**A click reaction in oligodeoxynucleotide probes labeling**“, ústní sdělení.

10.3 Odborné kurzy

- **2022** 19th International Course on “Principles and Applications of Time-resolved Fluorescence Spectroscopy”, Picoquant, pětidenní online interaktivní kurz fluorescenční spectroscopie zaměřený na realtime techniky detekce elektronu
- **2019** Summer school of scientific writing with prof. Temesgen, Mayo clinic, USA

10.4 Profesní členství

- **2020-2023** Society of Porphyrins and Phthalocyanines
- **2018-2024** Česká lékárnická komora

11 Reference

- (1) Moussaron, A.; Arnoux, P.; Vanderesse, R.; Sibille, E.; Chaimbault, P.; Frochot, C. Lipophilic phthalocyanines for their potential interest in photodynamic therapy: synthesis and photo-physical properties. *Tetrahedron* **2013**, *69* (47), 10116-10122. DOI: 10.1016/j.tet.2013.09.035.
- (2) Linstead, R. P.; Lowe, A. R. 214. Phthalocyanines. Part III. Preliminary experiments on the preparation of phthalocyanines from phthalonitrile. *Journal of the Chemical Society (Resumed)* **1934**, (0), 1022-1027, DOI: 10.1039/JR9340001022.
- (3) McKeown, N. B. *Phthalocyanine Materials: Synthesis, Structure and Function*, Cambridge University Press, 1998.
- (4) Barton, D. H. R.; Rydon, H. N.; Elvidge, J. A. Reginald Patrick Linstead, 1902-1966. *Biogr. Mem. Fellows R. Soc.* **1968**, *14*, 308-347. DOI: doi:10.1098/rsbm.1968.0014.
- (5) Machacek, M.; Demuth, J.; Cermak, P.; Vavreckova, M.; Hruby, L.; Jedlickova, A.; Kubat, P.; Simunek, T.; Novakova, V.; Zimcik, P. Tetra(3,4-pyrido)porphyrazines Caught in the Cationic Cage: Toward Nanomolar Active Photosensitizers. *J. Med. Chem.* **2016**, *59* (20), 9443-9456. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.6b01140.
- (6) Novakova, V.; Lochman, L.; Zajícová, I.; Kopecky, K.; Miletin, M.; Lang, K.; Kirakci, K.; Zimcik, P. Azaphthalocyanines: Red Fluorescent Probes for Cations. *Chem. - Eur. J.* **2013**, *19* (16), 5025-5028. DOI: 10.1002/chem.201300079.
- (7) Novakova, V.; Laskova, M.; Vavrickova, H.; Zimcik, P. Phenol-Substituted Tetrapyrazinoporphyrazines: pH-Dependent Fluorescence in Basic Media. *Chem. - Eur. J.* **2015**, *21* (41), 14382-14392. DOI: 10.1002/chem.201502533.
- (8) 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*, **2008**; *1*, 21-29. DOI: 10.6060/mhc2008.1.21
- (9) Ogawa, K.; Yao, J. C.; Yonehara, H.; Pac, C. Chemical behaviour of ocotitanium (IV) phthalocyanine (OTiPc) solutions associated with the preparation of OTiPc monolayers and multilayers. *J. Mater. Chem.* **1996**, *6* (2), 143-147. DOI: 10.1039/jm9960600143.
- (10) Goedken, V. L.; Dessy, G.; Ercolani, C.; Fares, V.; Gastaldi, L. Synthesis, reactivity, and X-ray crystal-structure of dichloro(phthalocyaninato)titanium(IV). *Inorg. Chem.* **1985**, *24* (7), 991-995. DOI: 10.1021/ic00201a006.
- (11) Darwish, W.; Schlecht, S.; Schaper, A.; Fröba, M.; Harms, K.; Massa, W.; Sundermeyer, J. Synthesis and Crystal Structures of Axially Substituted Titaniumphthalocyanines and Preparation of PcTi@SBA-15 and PcTi&TiO_x@SBA-15 Materials. *Z. anorg. allg. Chem.* **2009**, *635* (8), 1215-1224. DOI: 10.1002/zaac.200801289.
- (12) Schweiger, K.; Huckstadt, H.; Homborg, H. Crystal structure of mixed crystals of the tetra(n-butyl)ammonium salts of cis-tetrafluorophthalocyaninato(2-)tantalate(V) and cis-trifluorophthalocyaninato(2-)tantalate(IV). *Z. anorg. allg. Chem.* **1997**, *623* (12), 1853-1854. DOI: 10.1002/zaac.19976231204.

- (13) Ishikawa, N. Electronic structures and spectral properties of double- and triple-decker phthalocyanine complexes in a localized molecular orbital view. *J. Porphyr. Phthalocyanines* **2001**, 5 (1), 87-101.
- (14) Brumfield, S. N.; Mays, B. C.; Thomas, A. L. Formation of copper phthalocyanine. *J. Org. Chem.* **1964**, 29 (8), 2484-2486.
- (15) Linstead, R. P.; Noble, E. G.; Wright, J. M. Phthalocyanines. IX. Derivatives of thiophene, thionaphthene, pyridine and pyrazine, and a note on the nomenclature. *J. Chem. Soc.* **1937**, 911-921.
- (16) Christie, R. M.; Deans, D. D. An investigation into the mechanism of the phthalonitrile route to copper phthalocyanines using differential scanning calorimetry. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* **1989**, (2), 193-198.
- (17) Cao, W.; Wang, K.; Ledoux-Rak, I.; Jiang, J. Z. ABAB-type phthalocyanines simultaneously bearing electron donating and electron accepting groups. Synthesis, spectroscopy, and structure. *Inorg. Chem. Front.* **2016**, 3 (9), 1146-1151. DOI: 10.1039/c6qi00147e.
- (18) Mørkved, E. H.; Kjøsen, H.; Ossletten, H.; Erchak, N. Syntheses of Octa(dialkylamino)azaphthalocyanines. *J. Porphyr. Phthalocyanines* **1999**, 3 (6-7), 417-423.
- (19) Pekbelgin Karaoğlu, H.; Kalkan Burat, A. α - and β -substituted metal-free phthalocyanines: synthesis, photophysical and electrochemical properties. *Molecules* **2020**, 25 (2), 363.
- (20) Dede, G.; Bayrak, R.; Er, M.; Özkaya, A. R.; Değirmencioglu, İ. DBU-catalyzed condensation of metal free and metallophthalocyanines containing thiazole and azine moieties: Synthesis, characterization and electrochemical properties. *J. Organomet. Chem.* **2013**, 740, 70-77.
- (21) Zimcik P., M. M., Kostka M., Schwarz J., Musil Z., Kopecky K. Synthesis and comparison of photodynamic activity of alkylheteroatom substituted azaphthalocyanines. In *J. Photochem. Photobiol. A-Chem.*, **2004**; 163, 21-28.
- (22) Janczak, J. Solvothermal modification of magnesium phthalocyanine. *Inorganica Chim. Acta* **2018**, 478, 88-103. DOI: 10.1016/j.ica.2018.03.018.
- (23) Kossanyi, J.; Chahraoui, D. Electron transfer reaction and demetalation of phthalocyanines. *Int. J. Photoenergy* **2000**, 2, 9-15. DOI: 10.1155/s1110662x00000027.
- (24) Jang, C. K.; Byun, S. H.; Kim, S. H.; Lee, D. K.; Jaung, J. Y. Synthesis and optical properties of tetrapyrizinoporphyrazines containing camphorquinone group. *J. Porphyr. Phthalocyanines* **2009**, 13, 794-797. DOI: 10.1142/S1088424609000991.
- (25) Kopecky K., Z. 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 Pigm.* **2008**; 78, 231-238.
- (26) Yang H.X., S., J.R., Hay A.S. Preparation and properties of novel soluble poly(arylether)s bearing covalently bound tetrapyrizinoporphyrazine units. In *J. Polym. Sci. Pol. Chem.*, **1995**; 33, 989-997.

- (27) Stuzhin, P. A.; Khelevina, O. G. Azaporphyrins: Structure of the reaction centre and reactions of complex formation. *Coord. Chem. Rev.* **1996**, *147*, 41-86.
- (28) Mack, J.; Kobayashi, N. Low symmetry phthalocyanines and their analogues. *Chem. Rev.* **2011**, *111* (2), 281-321.
- (29) Engel, M.; Kadish, K.; Smith, K.; Guillard, R. The Porphyrin Handbook. In *Phthalocyanines: Structural Characterization*, Vol. 20; Elsevier, 2003; pp 1-88.
- (30) Keizer, S. P.; Mack, J.; Bench, B. A.; Gorun, S. M.; Stillman, M. J. Spectroscopy and electronic structure of electron deficient zinc phthalocyanines. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125* (23), 7067-7085.
- (31) Huang, J.; Liu, E.; Yang, S.; Chen, N.; Duan, J.; Chen, Y. The monomer electronic spectra and fluorescence spectra of some metal phthalocyanines. *Spectroscopy and Spectral Analysis* **2000**, *20* (1), 95-98.
- (32) Ough, E. A.; Stillman, M. J.; Creber, K. A. Absorption and magnetic circular dichroism spectra of nitrogen homologues of magnesium and zinc phthalocyanine. *Can. J. Chem.* **1993**, *71* (11), 1898-1909.
- (33) Cook, M. J.; Dunn, A. J.; Howe, S. D.; Thomson, A. J.; Harrison, K. J. Octa-alkoxy phthalocyanine and naphthalocyanine derivatives: dyes with Q-band absorption in the far red or near infrared. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1988**, (8), 2453-2458.
- (34) Guilbault, G. G. *Practical fluorescence*; CRC Press, 2020.
- (35) Novakova, V. *Příprava a studium vlastností azaanalogů ftalocyaninů*; 2011.
- (36) Lakowicz, J. R.; Lakowicz, J. R. Instrumentation for fluorescence spectroscopy. *Principles of fluorescence spectroscopy* **1999**, 25-61.
- (37) Allison, R. R.; Sibata, C. H. Oncologic photodynamic therapy photosensitizers: a clinical review. *Photodiagnosis Photodyn.* **2010**, *7* (2), 61-75.
- (38) Tuhl, A.; Makhseed, S.; Zimcik, P.; Al-Awadi, N.; Novakova, V.; Samuel, J. Heavy metal effects on physicochemical properties of non-aggregated azaphthalocyanine derivatives. *J. Porphyr. Phthalocyanines* **2012**, *16* (7-8), 817-825.
- (39) Novakova, V.; Hladik, P.; Filandrova, T.; Zajicova, I.; Krepsova, V.; Miletin, M.; Lenco, J.; Zimcik, P. Structural factors influencing the intramolecular charge transfer and photoinduced electron transfer in tetrapyrazinoporphyrazines. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2014**, *16* (11), 5440-5446. DOI: Doi 10.1039/C3cp54731k.
- (40) Novakova, V.; Donzello, M. P.; Ercolani, C.; Zimcik, 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. DOI: 10.1016/j.ccr.2018.01.015.
- (41) Zimcik, P.; Novakova, V.; Kopecky, K.; Miletin, M.; Uslu Kobak, R. Z.; Svandrlíkova, E.; Váchová, L.; Lang, K. Magnesium Azaphthalocyanines: An Emerging Family of Excellent Red-Emitting Fluorophores. *Inorg. Chem.* **2012**, *51* (7), 4215-4223. DOI: 10.1021/ic2027016.
- (42) Petrik P., Z. P., Kopecky K., Musil Z., Miletin M., Loukotova V. Protonation and deprotonation of nitrogens in tetrapyrazinoporphyrazine macrocycle. In *J. Porphyrins Phthalocyanines*, 2007; Vol. 11, pp 487-495.

- (43) Petrik, P.; Zimcik, P.; Kopecky, K.; Musil, Z.; Miletin, M.; Loukotova, V. Protonation and deprotonation of nitrogens in tetrapyrroline porphyrin macrocycles. *J. Porphyr. Phthalocyanines* **2007**, *11*, 487-495. DOI: 10.1142/S1088424607000564.
- (44) Kopecky K., N. V., Miletin M., Kucera R., Zimcik P. Synthesis of new azaphthalocyanine dark quencher and evaluation of its quenching efficiency with different fluorophores. In *Tetrahedron*, 2011; Vol. 67, pp 5956-5963.
- (45) Makhseed S., I. F., Bezzu C.G., McKeown N.B. The Synthesis of Metal-Free Octaazaphthalocyanine Derivatives Containing Bulky Phenoxy substituents to prevent self-association. In *Tetrahedron Lett.*, 2007; Vol. 48, pp 7358-7361.
- (46) Zimcik P., M. M., Musil Z., Kopecky K., Kubza L., Brault D. Cationic azaphthalocyanines bearing aliphatic tertiary amino substituents-Synthesis, singlet oxygen production and spectroscopic studies. In *J. Photochem. Photobiol. A - Chem.*, 2006; Vol. 183, pp 59-69.
- (47) Kuhri, S.; Engelhardt, V.; Faust, R.; Guldi, D. M. En route towards panchromatic light harvesting: photophysical and electrochemical properties of Bodipy-porphyrin conjugates. *J. Chem. Sci.* **2014**, *5* (6), 2580-2588. DOI: 10.1039/c4sc00326h.
- (48) Kharitonova, N. V.; Maiorova, L. A.; Koifman, O. I. Aggregation behavior of unsubstituted magnesium porphyrin in monolayers at air-water interface and in Langmuir-Schaefer films. *J. Porphyr. Phthalocyanines* **2018**, *22* (6), 509-520. DOI: 10.1142/S1088424618500505.
- (49) Falkowski, M.; Rebis, T.; Piskorz, J.; Popenda, L.; Jurga, S.; Mielcarek, J.; Milczarek, G.; Goslinski, T. Improved electrocatalytic response toward hydrogen peroxide reduction of sulfanyl porphyrin/multiwalled carbon nanotube hybrids deposited on glassy carbon electrodes. *Dyes Pigm.* **2016**, *134*, 569-579. DOI: 10.1016/j.dyepig.2016.08.014.
- (50) Guillaud, G.; Simon, J.; Germain, J. Metallophthalocyanines: Gas sensors, resistors and field effect transistors. *Coord. Chem. Rev.* **1998**, *178*, 1433-1484.
- (51) Kadish, K.; Smith, K. M.; Guillard, R. *The Porphyrin Handbook, Volume 3*; Elsevier, 2000.
- (52) Loi, M. A.; Denk, P.; Hoppe, H.; Neugebauer, H.; Winder, C.; Meissner, D.; Brabec, C.; Sariciftci, N. S.; Gouloumis, A.; Vázquez, P. Long-lived photoinduced charge separation for solar cell applications in phthalocyanine–fulleropyrrolidine dyad thin films. *J. Mater. Chem.* **2003**, *13* (4), 700-704.
- (53) Guldi, D. M.; Gouloumis, A.; Vázquez, P.; Torres, T. Charge-transfer states in strongly coupled phthalocyanine fullerene ensembles. *Chem. Commun.* **2002**, (18), 2056-2057. DOI: 10.1039/b205620h.
- (54) Gursel, Y. H.; Senkal, B. F.; Kandaz, M.; Yakuphanoglu, F. Synthesis and liquid crystal properties of phthalocyanine bearing a star polytetrahydrofuran moiety. *Polyhedron* **2009**, *28* (8), 1490-1496.
- (55) Durmuş, M.; Yeşilot, S.; Ahsen, V. Separation and mesogenic properties of tetraalkoxy-substituted phthalocyanine isomers. *New J Chem* **2006**, *30* (5), 675-678.

- (56) Machacek, M.; Cidlina, A.; Novakova, V.; Svec, J.; Rudof, E.; Miletin, M.; Kucera, R.; Simunek, T.; Zimcik, P. Far-Red-Absorbing Cationic Phthalocyanine Photosensitizers: Synthesis and Evaluation of the Photodynamic Anticancer Activity and the Mode of Cell Death Induction. *J. Med. Chem.* **2015**, *58* (4), 1736-1749. DOI: 10.1021/jm5014852.
- (57) Lapshina, M. A.; Norko, S. I.; Baulin, V. E.; Terentiev, A. A.; Tsivadze, A. Y.; Goldshleger, N. F. Magnesium Octa[(4'-benzo-15-crown-5)oxy]phthalocyanine in Phosphate Buffer: Supramolecular Organization, Cytotoxicity and Accumulation/Localization in Tumor Cells HeLa. *Macroheterocycles* **2018**, *11* (4), 396-403. DOI: 10.6060/mhc1808991.
- (58) Yabaş, E.; Şahin-Bölükbaşı, S.; Şahin-İnan, Z. D. New water soluble magnesium phthalocyanine as a potential anticancer drug: Cytotoxic and apoptotic effect on different cancer cell lines. *J. Porphyr. Phthalocyanines* **2022**, *26* (01), 65-77. DOI: 10.1142/s1088424621500863.
- (59) Lobo, A. C. S.; Silva, A. D.; Tomé, V. A.; Pinto, S. M. A.; Silva, E. F. F.; Calvete, M. J. F.; Gomes, C. M. F.; Pereira, M. M.; Arnaut, L. G. Phthalocyanine Labels for Near-Infrared Fluorescence Imaging of Solid Tumors. *J. Med. Chem.* **2016**, *59* (10), 4688-4696. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.6b00054.
- (60) Lo, P. C.; Ng, D. K. P.; Pandey, R. K.; Zimcik, P. Photodynamic Therapy: An Innovative and Versatile Treatment Modality Triggered by Light. *Chempluschem* **2023**, *88* (6). DOI: 10.1002/cplu.202300159.
- (61) Van Straten, D.; Mashayekhi, V.; De Bruijn, H. S.; Oliveira, S.; Robinson, D. J. Oncologic photodynamic therapy: basic principles, current clinical status and future directions. *Cancers* **2017**, *9* (2), 19.
- (62) Dougherty, T. J. An update on photodynamic therapy applications. *Journal of clinical laser medicine & surgery* **2002**, *20* (1), 3-7.
- (63) Kinsella, T. J.; Colussi, V. C.; Oleinick, N. L.; Sibata, C. H. Photodynamic therapy in oncology. *Expert Opin. Pharmacother.* **2001**, *2* (6), 917-927.
- (64) Beharry, A. A. Next-Generation Photodynamic Therapy: New Probes for Cancer Imaging and Treatment; *Biochemistry*, **2018**, *57*, (2), 173–174.
- (65) Shinozaki, T.; Matsuura, K.; Okano, W.; Tomioka, T.; Nishiya, Y.; Machida, M.; Hayashi, R. Eligibility for Photoimmunotherapy in Patients with Unresectable Advanced or Recurrent Head and Neck Cancer and Changes before and after Systemic Therapy. *Cancers* **2023**, *15* (15). DOI: 10.3390/cancers15153795.
- (66) Celli J.P., S. 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**; 2795-2838.
- (67) Peaston, A.; Leach, M.; Higgins, R. Photodynamic therapy for nasal and aural squamous cell carcinoma in cats. *Journal of the American Veterinary Medical Association* **1993**, *202* (8), 1261-1265.
- (68) Dolmans, D. E.; Fukumura, D.; Jain, R. K. Photodynamic therapy for cancer. *Nat. Rev. Cancer* **2003**, *3* (5), 380-387.

- (69) Zimcik, P.; Miletin, M. Photodynamic Therapy. In *Dyes Pigm.: New Research*, Lang, A. R. Ed.; Nova Science Publishers, Inc., 2009; pp 1-62.
- (70) Filonenko, E. V.; Sokolov, V. V.; Chissov, V. I.; Lukyanets, E. A.; Vorozhtsov, G. N. Photodynamic therapy of early esophageal cancer. *Photodiagnosis Photodyn.* **2008**, *5* (3), 187-190.
- (71) Sutoris, K.; Vetvicka, D.; Horak, L.; Benes, J.; Nekvasil, M.; Jezek, P.; Zadinova, M.; Pouckova, P. Evaluation of Topical Photodynamic Therapy of Mammary Carcinoma with an Experimental Gel Containing Liposomal Hydroxyl-aluminium Phthalocyanine. *Anticancer Res.* **2012**, *32* (9), 3769-3774.
- (72) Mfouo-Tynga, I.; Houreld, N. N.; Abrahamse, H. Induced Cell Death Pathway Post Photodynamic Therapy Using a Metallophthalocyanine Photosensitizer in Breast Cancer Cells. *Photomed. Laser Surg.* **2014**, *32* (4), 205-211. DOI: 10.1089/pho.2013.3650.
- (73) Chen, D.; Song, M. R.; Huang, J. L.; Chen, N. S.; Xue, J. P.; Huang, M. D. Photocyanine: A novel and effective phthalocyanine-based photosensitizer for cancer treatment. *Innov. Opt. Health Sci.* **2020**, *13* (3). DOI: 10.1142/s1793545820300098.
- (74) Li, S.; Bi, B. T.; Luo, G. Y.; Zhan, J.; Zhang, R.; Li, J. B.; Chen, N. S.; Huang, J. L.; Xue, J. P.; Xu, G. L. A phase I study to evaluate the application of photocyanine using pharmacokinetic and pharmacodynamic analysis in patients with malignancy. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2020**, *86* (2), 267-276. DOI: 10.1007/s00280-020-04096-y.
- (75) Gomes-da-Silva, L. C.; Kepp, O.; Kroemer, G. Regulatory approval of photoimmunotherapy: photodynamic therapy that induces immunogenic cell death. *Oncoimmunology* **2020**, *9* (1). DOI: 10.1080/2162402x.2020.1841393.
- (76) Shahzad, A.; Edetsberger, M.; Koehler, G. Fluorescence Spectroscopy: An Emerging Excellent Diagnostic Tool in Medical Sciences. *Appl. Spectrosc. Rev.* **2010**, *45* (1), 1-11. DOI: 10.1080/05704920903435375.
- (77) Shahzad, A.; Knapp, M.; Edetsberger, M.; Puchinger, M.; Gaubitzer, E.; Köhler, G. Diagnostic Application of Fluorescence Spectroscopy in Oncology Field: Hopes and Challenges. *Appl. Spectrosc. Rev.* **2010**, *45* (1), 92-99. DOI: 10.1080/05704920903435599.
- (78) Musil Z., Z. P., Miletin M., Kopecky K., Link M., Petrik P., Schwarz J. Synthesis and singlet oxygen production of azaphthalocyanines bearing functional derivatives of carboxylic acid. In *J. Porphyrins Phthalocyanines*, 2006; Vol. 10, pp 122-131.
- (79) Miletin, M. *Biologicky aktivní látky na bázi dusíkatých heterocyklů*; 2013.
- (80) Gabizon, A. A.; Shmeeda, H.; Zalipsky, S. Pros and cons of the liposome platform in cancer drug targeting. *J. Liposome Res.* **2006**, *16* (3), 175-183. DOI: 10.1080/08982100600848769.
- (81) Fathi, S.; Oyelere, A. K. Liposomal drug delivery systems for targeted cancer therapy: is active targeting the best choice? *Future Med. Chem.* **2016**, *8* (17), 2091-2112. DOI: 10.4155/fmc-2016-0135.
- (82) Abbasi, H.; Kouchak, M.; Mirveis, Z.; Hajipour, F.; Khodarahmi, M.; Rahbar, N.; Handali, S. What We Need to Know about Liposomes as Drug Nanocarriers: An Updated Review. *Adv. pharm. bull.* **2023**, *13* (1), 7-23. DOI: 10.34172/apb.2023.009.

- (83) Gagliardi, A.; Giuliano, E.; Venkateswararao, E.; Fresta, M.; Bulotta, S.; Awasthi, V.; Cosco, D. Biodegradable Polymeric Nanoparticles for Drug Delivery to Solid Tumors. *Front. pharmacol.* **2021**, *12*. DOI: 10.3389/fphar.2021.601626.
- (84) Mosley, R. J.; Rucci, B.; Byrne, M. E. Recent advancements in design of nucleic acid nanocarriers for controlled drug delivery. *J. Mater. Chem. B* **2023**, *11* (10), 2078-2094. DOI: 10.1039/d2tb02325c.
- (85) Yuba, E.; Osaki, T.; Ono, M.; Park, S.; Harada, A.; Yamashita, M.; Azuma, K.; Tsuka, T.; Ito, N.; Imagawa, T.; Okamoto, Y. Bleomycin-Loaded pH-Sensitive Polymer-Lipid-Incorporated Liposomes for Cancer Chemotherapy. *Polymers* **2018**, *10* (1). DOI: 10.3390/polym10010074.
- (86) Jerjes, W.; Theodossiou, T. A.; Hirschberg, H.; Hogset, A.; Weyergang, A.; Selbo, P. K.; Hamdoon, Z.; Hopper, C.; Berg, K. Photochemical Internalization for Intracellular Drug Delivery. From Basic Mechanisms to Clinical Research. *J. Clin. Med.* **2020**, *9* (2). DOI: 10.3390/jcm9020528.
- (87) Yu, M. M.; Cao, R.; Ma, Z. Y.; Zhu, M. F. Development of "smart" drug delivery systems for chemo/PDT synergistic treatment. *J. Mater. Chem. B* **2023**, *11* (7), 1416-1433. DOI: 10.1039/d2tb02248f.
- (88) AlSawaftah, N.; Pitt, W. G.; Husseini, G. A. Dual-Targeting and Stimuli-Triggered Liposomal Drug Delivery in Cancer Treatment. *ACS Pharmacol. Transl. Sci.* **2021**, *4* (3), 1028-1049. DOI: 10.1021/acsptsci.1c00066.
- (89) Silva, J. M.; Silva, E.; Reis, R. L. Light-triggered release of photocaged therapeutics - Where are we now? *J. Control. Release* **2019**, *298*, 154-176. DOI: 10.1016/j.jconrel.2019.02.006.
- (90) Massiot, J.; Rosilio, V.; Makky, A. Photo-triggerable liposomal drug delivery systems: from simple porphyrin insertion in the lipid bilayer towards supramolecular assemblies of lipid-porphyrin conjugates. *J. Mater. Chem. B* **2019**, *7* (11), 1805-1823. DOI: 10.1039/c9tb00015a.
- (91) Massiot, J.; Makky, A.; Di Meo, F.; Chapron, D.; Trouillas, P.; Rosilio, V. Impact of lipid composition and photosensitizer hydrophobicity on the efficiency of light-triggered liposomal release. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2017**, *19* (18), 11460-11473. DOI: 10.1039/c7cp00983f.
- (92) Enzian, P.; Schell, C.; Link, A.; Malich, C.; Pries, R.; Wollenberg, B.; Rahmzadeh, R. Optically Controlled Drug Release from Light-Sensitive Liposomes with the New Photosensitizer 5,10-DiOH. *Mol. Pharmaceutics* **2020**, *17* (8), 2779-2788. DOI: 10.1021/acs.molpharmaceut.9b01173.
- (93) Lajunen, T.; Kontturi, L. S.; Viitala, L.; Manna, M.; Cramariuc, O.; Róg, T.; Bunker, A.; Laaksonen, T.; Viitala, T.; Murtomäki, L.; Urtti, A. Indocyanine Green-Loaded Liposomes for Light-Triggered Drug Release. *Mol. Pharmaceutics* **2016**, *13* (6), 2095-2107. DOI: 10.1021/acs.molpharmaceut.6b00207.
- (94) Chitgupi, U.; Shao, S.; Carter, K. A.; Huang, W. C.; Lovell, J. F. Multicolor Liposome Mixtures for Selective and Selectable Cargo Release. *Nano Lett.* **2018**, *18* (2), 1331-1336. DOI: 10.1021/acs.nanolett.7b05025.

- (95) Zheng, K.; Liu, H. Y.; Liu, X. X.; Jiang, L. B.; Li, L. L.; Wu, X. G.; Guo, N. N.; Ding, C. F.; Huang, M. D. Photo-triggered release of doxorubicin from liposomes formulated by amphiphilic phthalocyanines for combination therapy to enhance antitumor efficacy. *J. Mater. Chem. B* **2020**, *8* (35), 8022-8036. DOI: 10.1039/d0tb01093f.
- (96) Niemeyer, C. M. Semisynthetic DNA-Protein Conjugates for Biosensing and Nanofabrication. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49* (7), 1200-1216. DOI: 10.1002/anie.200904930.
- (97) Muratovska, A.; Eccles, M. R. Conjugate for efficient delivery of short interfering RNA (siRNA) into mammalian cells. *FEBS Lett.* **2004**, *558* (1-3), 63-68.
- (98) Wuellner, U.; Gavriljuk, J. I.; Barbas, C. F. Expanding the Concept of Chemically Programmable Antibodies to RNA Aptamers: Chemically Programmed Biotherapeutics. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49* (34), 5934-5937. DOI: 10.1002/anie.201001736.
- (99) Weinberg, C. E.; Weinberg, Z.; Hammann, C. Novel ribozymes: discovery, catalytic mechanisms, and the quest to understand biological function. *Nucleic Acids Res.* **2019**, *47* (18), 9480-9494. DOI: 10.1093/nar/gkz737.
- (100) Wilson, T. J.; Liu, Y. J.; Li, N. S.; Dai, Q.; Piccirilli, J. A.; Lilley, D. M. J. Comparison of the Structures and Mechanisms of the Pistol and Hammerhead Ribozymes. *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, *141* (19), 7865-7875. DOI: 10.1021/jacs.9b02141.
- (101) Lee, H. H.; Kalhor, R.; Goela, N.; Bolot, J.; Church, G. M. Terminator-free template-independent enzymatic DNA synthesis for digital information storage. *Nat. Commun.* **2019**, *10*. DOI: 10.1038/s41467-019-10258-1.
- (102) Yang, K. F.; McCloskey, C. M.; Chaput, J. C. Reading and Writing Digital Information in TNA. *ACS Synth. Biol.* **2020**, *9* (11), 2936-2942. DOI: 10.1021/acssynbio.0c00361.
- (103) Knapp, D. C.; D'Onofrio, J.; Engels, J. W. Fluorescent Labeling of (Oligo)Nucleotides by a New Fluoride Cleavable Linker Capable of Versatile Attachment Modes. *Bioconjugate Chem.* **2010**, *21* (6), 1043-1055. DOI: 10.1021/bc900542f.
- (104) Kricka, L. J.; Fortina, P. Analytical Ancestry: "Firsts" in Fluorescent Labeling of Nucleosides, Nucleotides, and Nucleic Acids. *Clin. Chem.* **2009**, *55* (4), 670-683. DOI: 10.1373/clinchem.2008.116152.
- (105) Hassane, F. S.; Saleh, A. F.; Abes, R.; Gait, M. J.; Lebleu, B. Cell penetrating peptides: overview and applications to the delivery of oligonucleotides. *Cell. Mol. Life Sci.* **2010**, *67* (5), 715-726. DOI: 10.1007/s00018-009-0186-0.
- (106) Biessen, E. A. L.; Van Berkel, T. J. C. N-Acetyl Galactosamine Targeting: Paving the Way for Clinical Application of Nucleotide Medicines in Cardiovascular Diseases. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2021**, *41* (12), 2855-2865. DOI: 10.1161/atvbaha.121.316290.
- (107) Kim, D.; Seo, J. M.; Shin, K. J.; Yang, S. G. Design and clinical developments of aptamer-drug conjugates for targeted cancer therapy. *Biomaterials Res.* **2021**, *25* (1). DOI: 10.1186/s40824-021-00244-4.

- (108) Beaucage, S. L.; Iyer, R. P. The synthesis of modified oligonucleotides by the phosphoramidite approach and their applications. *Tetrahedron* **1993**, *49* (28), 6123-6194. DOI: 10.1016/s0040-4020(01)87958-8.
- (109) Eritja, R.; de Gruyter, W. *Modifications and Conjugates for Biomedicine and Nanotechnology*; Eritja, R., de Gruyter, W., Eds.; ProQuest Ebook Central, 2021.
- (110) Paredes, E.; Aduda, V.; Ackley, K. L.; Cramer, H. 6.11 - Manufacturing of Oligonucleotides. In *Comprehensive Medicinal Chemistry III*, Chackalamannil, S., Rotella, D., Ward, S. E. Eds.; Elsevier, 2017; pp 233-279.
- (111) Guzaev, A. P. Solid-phase supports for oligonucleotide synthesis. *Curr Protoc Nucleic Acid Chem* **2013**, *Chapter 3*, 3.1.1-3.1.60. DOI: 10.1002/0471142700.nc0301s53 From NLM.
- (112) Aviñó, A.; Fàbrega, C.; Eritja, R. 4 Nonradioactive labeling of oligonucleotides and postsynthetic modification of oligonucleotides. *Nucleic Acids Chemistry* **2021**, 143.
- (113) Jorge, A. F.; Grijalvo, S.; Aviñó, A.; Fàbrega, C.; Eritja, R. 8 Oligonucleotide conjugates and DNA nanotechnology. *Nucleic Acids Chemistry: Modifications and Conjugates for Biomedicine and Nanotechnology* **2021**, 331.
- (114) Okamoto, A.; Tainaka, K.; Saito, I. A facile incorporation of the aldehyde function into DNA: 3-formylindole nucleoside as an aldehyde-containing universal nucleoside. *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43* (26), 4581-4583. DOI: 10.1016/s0040-4039(02)00888-2.
- (115) Podyminogin, M. A.; Lukhtanov, E. A.; Reed, M. W. Attachment of benzaldehyde-modified oligodeoxynucleotide probes to semicarbazide-coated glass. *Nucleic Acids Res.* **2001**, *29* (24), 5090-5098. DOI: 10.1093/nar/29.24.5090.
- (116) Sánchez, A.; Pedroso, E.; Grandas, A. Maleimide-Dimethylfuran *exo* Adducts: Effective Maleimide Protection in the Synthesis of Oligonucleotide Conjugates. *Org. Lett.* **2011**, *13* (16), 4364-4367. DOI: 10.1021/ol201690b.
- (117) Rehman, F. N.; Audeh, M.; Abrams, E. S.; Hammond, P. W.; Kenney, M.; Boles, T. C. Immobilization of acrylamide-modified oligonucleotides by co-polymerization. *Nucleic Acids Res.* **1999**, *27* (2), 649-655. DOI: 10.1093/nar/27.2.649.
- (118) Lu, K.; Duan, Q. P.; Ma, L.; Zhao, D. X. Chemical Strategies for the Synthesis of Peptide-Oligonucleotide Conjugates. *Bioconjugate Chem.* **2010**, *21* (2), 187-202. DOI: 10.1021/bc900158s.
- (119) Singh, Y.; Murat, P.; Defrancq, E. Recent developments in oligonucleotide conjugation. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39* (6), 2054-2070. DOI: 10.1039/b911431a.
- (120) Singh, Y.; Spinelli, N.; Defrancq, E. Chemical strategies for oligonucleotide-conjugates synthesis. *Curr. Org. Chem.* **2008**, *12* (4), 263-290.
- (121) Farzan, V. M.; Ulashchik, E. A.; Martynenko-Makaev, Y. V.; Kvach, M. V.; Aparin, I. O.; Brylev, V. A.; Prikazchikova, T. A.; Maldakova, S. Y.; Majouga, A. G.; Ustinov, A. V.; et al. Automated Solid-Phase Click Synthesis of Oligonucleotide Conjugates: From Small Molecules to Diverse N-Acetylgalactosamine Clusters. *Bioconjugate Chem.* **2017**, *28* (10), 2599-2607. DOI: 10.1021/acs.bioconjchem.7b00462.

- (122) Tornøe, C. W.; Christensen, C.; Meldal, M. Peptidotriazoles on solid phase: 1,2,3-triazoles by regioselective copper(I)-catalyzed 1,3-dipolar cycloadditions of terminal alkynes to azides. *J. Org. Chem.* **2002**, *67* (9), 3057-3064. DOI: 10.1021/jo011148j.
- (123) Rostovtsev, V. V.; Green, L. G.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B. A stepwise Huisgen cycloaddition process: Copper(I)-catalyzed regioselective "ligation" of azides and terminal alkynes. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41* (14), 2596-+. DOI: 10.1002/1521-3773(20020715)41:14<2596::Aid-anie2596>3.0.Co;2-4.
- (124) Kolb, H. C.; Finn, M. G.; Sharpless, K. B. Click chemistry: Diverse chemical function from a few good reactions. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40* (11), 2004-+. DOI: 10.1002/1521-3773(20010601)40:11<2004::Aid-anie2004>3.0.Co;2-5.
- (125) Baskin, J. M.; Prescher, J. A.; Laughlin, S. T.; Agard, N. J.; Chang, P. V.; Miller, I. A.; Lo, A.; Codelli, J. A.; Bertozzi, C. R. Copper-free click chemistry for dynamic *in vivo* imaging. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2007**, *104* (43), 16793-16797. DOI: 10.1073/pnas.0707090104.
- (126) Agard, N. J.; Prescher, J. A.; Bertozzi, C. R. A strain-promoted 3+2 azide-alkyne cycloaddition for covalent modification of biomolecules in living systems. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126* (46), 15046-15047. DOI: 10.1021/ja044996f.
- (127) Fantoni, N. Z.; El-Sagheer, A. H.; Brown, T. A Hitchhiker's Guide to Click-Chemistry with Nucleic Acids. *Chem. Rev.* **2021**, *121* (12), 7122-7154. DOI: 10.1021/acs.chemrev.0c00928.
- (128) Johansson, J. R.; Beke-Somfai, T.; Stålsmeden, A. S.; Kann, N. Ruthenium-Catalyzed Azide Alkyne Cycloaddition Reaction: Scope, Mechanism, and Applications. *Chem. Rev.* **2016**, *116* (23), 14726-14768. DOI: 10.1021/acs.chemrev.6b00466.
- (129) Oakdale, J. S.; Fokin, V. V.; Umezaki, S.; Fukuyama, T. Preparation of 1,5-Disubstituted 1,2,3-Triazoles via Ruthenium-catalyzed Azide Alkyne Cycloaddition. *Org. Synth.* **2013**, *90*, 96-+. DOI: 10.15227/orgsyn.090.0096.
- (130) Blomquist, A. T.; Liu, L. H. Many-membered carbon rings .7. cyclooctyne. *J. Am. Chem. Soc.* **1953**, *75* (9), 2153-2154. DOI: 10.1021/ja01105a039.
- (131) Agard, N. J.; Prescher, J. A.; Bertozzi, C. R. A strain-promoted 3+2 azide-alkyne cycloaddition for covalent modification of biomolecules in living systems (vol 126, pg 15046, 2004). *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127* (31), 11196-11196. DOI: 10.1021/ja059912x.
- (132) Jewett, J. C.; Sletten, E. M.; Bertozzi, C. R. Rapid Cu-Free Click Chemistry with Readily Synthesized Biarylazacyclooctynones. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132* (11), 3688-+. DOI: 10.1021/ja100014q.
- (133) Ning, X. H.; Guo, J.; Wolfert, M. A.; Boons, G. J. Visualizing metabolically labeled glycoconjugates of living cells by copper-free and fast huisgen cycloadditions. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47* (12), 2253-2255. DOI: 10.1002/anie.200705456.
- (134) van Delft, P.; Meeuwenoord, N. J.; Hoogendoorn, S.; Dinkelaar, J.; Overkleeft, H. S.; van der Marel, G. A.; Filippov, D. V. Synthesis of Oligoribonucleic Acid Conjugates Using a Cyclooctyne Phosphoramidite. *Org. Lett.* **2010**, *12* (23), 5486-5489. DOI: 10.1021/ol102357u.

- (135) Novakova, V.; Miletin, M.; Filandrova, T.; Lenčo, J.; Růžička, A.; Zimcik, P. Role of Steric Hindrance in the Newman-Kwart Rearrangement and in the Synthesis and Photophysical Properties of Arylsulfanyl Tetrapyrrozinoporphyrazines. *J. Org. Chem.* **2014**, *79* (5), 2082-2093. DOI: 10.1021/jo402791c (accessed 2014/05/01).
- (136) 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.* **2006**, *178* (1), 16-25.
- (137) Makhseed, S.; Ibrahim, F.; Samuel, J.; Helliwell, M.; Warren, J. E.; Bezzu, C. G.; McKeown, N. B. Clathrate formation from octaazaphthalocyanines possessing bulky phenoxy substituents: A new cubic crystal containing solvent-filled, nanoscale voids. *Chem-Eur J* **2008**, *14* (16), 4810-4815.
- (138) Bergkamp, J. J.; Sherman, B. D.; Marino-Ochoa, E.; Palacios, R. E.; Cosa, G.; Moore, T. A.; Gust, D.; Moore, A. L. Synthesis and characterization of silicon phthalocyanines bearing axial phenoxy groups for attachment to semiconducting metal oxides. *J. Porphyr. Phthalocyanines* **2011**, *15* (9-10), 943-950. DOI: 10.1142/s1088424611003847.
- (139) 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. *J. Photochem. Photobiol.* **2010**, *86* (1), 168-175. DOI: 10.1111/j.1751-1097.2009.00647.x.
- (140) Machacek, M.; Cidlina, A.; Novakova, V.; Svec, J.; Rudolf, E.; Miletin, M.; Kučera, R.; Simunek, T.; Zimcik, P. Far-Red-Absorbing Cationic Phthalocyanine Photosensitizers: Synthesis and Evaluation of the Photodynamic Anticancer Activity and the Mode of Cell Death Induction. *J. Med. Chem.* **2015**, *58* (4), 1736-1749. DOI: 10.1021/jm5014852.
- (141) Zimcik, P.; Miletin, M.; Kopecky, K.; Musil, Z.; Berka, P.; Horakova, V.; Kucerova, H.; Zbytovska, J.; Brault, D. Influence of aggregation on interaction of lipophilic, water-insoluble azaphthalocyanines with DOPC vesicles. *J. Photochem. Photobiol.* **2007**, *83* (6), 1497-1504. DOI: 10.1111/j.1751-1097.2007.00193.x.
- (142) Macháček, M.; Carter, K. A.; Kostelanský, F.; Miranda, D.; Seffouh, A.; Ortega, J.; Šimůnek, T.; Zimčík, P.; Lovell, J. F. Binding of an amphiphilic phthalocyanine to pre-formed liposomes confers light-triggered cargo release. *J. Mater. Chem. B* **2018**, 10.1039/C8TB01602J. DOI: 10.1039/C8TB01602J.
- (143) Kollar, J.; Machacek, M.; Halaskova, M.; Lenco, J.; Kucera, R.; Demuth, J.; Rohlickova, M.; Hasonova, K.; Miletin, M.; Novakova, V.; Zimcik, P. Cationic Versus Anionic Phthalocyanines for Photodynamic Therapy: What a Difference the Charge Makes. *J. Med. Chem.* **2020**, *63* (14), 7616-7632. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.0c00481.
- (144) Al-Hamdan, N. S.; Hussain, A.; Kozlikova, M.; Alfred, M. A.; Machacek, M.; Ganesan, A.; Zimcik, P.; Makhseed, S. Enhanced photodynamic activity of asymmetric non-ionic Zn(II) phthalocyanine amphiphiles: Effect of molecular design on In vitro activity. *Dyes Pigm.* **2024**, *221*, 111809. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2023.111809>.
- (145) Redmond, R. W.; Gamlin, J. N. A compilation of singlet oxygen yields from biologically relevant molecules. *J. Photochem. Photobiol.* **1999**, *70* (4), 391-475.

- (146) Luo, D. D.; Carter, K. A.; Razi, A.; Geng, J. M.; Shao, S.; Giraldo, D.; Sunar, U.; Ortega, J.; Lovell, J. F. Doxorubicin encapsulated in stealth liposomes conferred with light-triggered drug release. *Biomater.* **2016**, *75*, 193-202. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2015.10.027.
- (147) Kostelansky, F.; Miletin, M.; Havlinova, Z.; Szotakova, B.; Libra, A.; Kucera, R.; Novakova, V.; Zimcik, P. Thermal stabilisation of the short DNA duplexes by acridine-4-carboxamide derivatives. *Nucleic Acids Res.* **2022**, *50* (18), 10212-10229. DOI: 10.1093/nar/gkac777.
- (148) Jiri Demuth, R. K., Magdalena Kozlikova, Carola Rando, Miloslav Machacek, Veronika Novakova, Vladimír Šindelář and Petr Zimcik. BODIPY-Cucurbituril Complexes: Supramolecular Approach toward Improvement of Photodynamic Activity. *Material Advances* **2024** [submitted]
- (149) Demuth, J.; Miletin, M.; Machan, M.; Kantor, M.; Zimcik, P.; Novakova, V. Synthesis and J-Dimer Formation of Tetrapyrazinoporphyrazines with Different Functional Groups for Potential Biomolecular Probe Applications. *Chempluschem* **2020**, *85* (3), 527-537. DOI: 10.1002/cplu.202000026.
- (150) Mitra, K.; Hartman, M. C. T. Silicon phthalocyanines: synthesis and resurgent applications. *Org. Biomol. Chem.* **2021**, *19* (6), 1168-1190, 10.1039/D0OB02299C. DOI: 10.1039/D0OB02299C.
- (151) Maree, M. D.; Kuznetsova, N.; Nyokong, T. Silicon octaphenoxypthalocyanines: photostability and singlet oxygen quantum yields. *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* **2001**, *140* (2), 117-125.
- (152) Lo, P. C.; Huang, J. D.; Cheng, D. Y.; Chan, E. Y.; Fong, W. P.; Ko, W. H.; Ng, D. K. New amphiphilic silicon(IV) phthalocyanines as efficient photosensitizers for photodynamic therapy: synthesis, photophysical properties, and in vitro photodynamic activities. *Chemistry* **2004**, *10* (19), 4831-4838.
- (153) Kudrevich, S. V.; vanLier, J. E. Substituted tetra-2,3-pyrazinoporphyrazines .2. Bis(tri-n-hexylsiloxy)silicon derivatives. *Can. J. Chem.-Revue Canadienne De Chimie* **1996**, *74* (9), 1718-1723, DOI: 10.1139/v96-189.
- (154) Kleinwächter, J.; Subramanian, L. R.; Hanack, M. Synthesis of silicon tetrapyrazinoporphyrazines. *J. Porphyr. Phthalocyanines* **2000**, *4* (5), 498-504. DOI: 10.1002/1099-1409(200008)4:5<498::Aid-jpp277>3.0.Co;2-f.
- (155) Song, C. J.; Park, J. M.; Yao, W.; Jung, C. Y.; Jaung, J. Y. Synthesis and photophysical properties of silicon(IV) tetrapyrazinoporphyrazines axially substituted with ethylene glycol chains as potential photosensitizer. *J. Porphyr. Phthalocyanines* **2015**, *19* (8), 967-972, DOI: 10.1142/s1088424615500698.
- (156) Park, J. M.; Jung, C. Y.; Song, C. J.; Jaung, J. Y. Synthesis and photophysical properties of axially substituted silicon (IV) tetrapyrazinoporphyrazines. *Inorg. Chem. Commun.* **2015**, *62*, 64-66. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.inoche.2015.10.015>.
- (157) Kolarova, M.; Zimcik, P.; Ivanova, S.; Miletin, M.; Novakova, V. Synthesis of peripherally substituted aza-analogues of Si(IV) phthalocyanines by complexation method. *J. Porphyr. Phthalocyanines* **2023**, *27* (1), 444-451. DOI: 10.1142/s108842462350013x.

- (158) Bispo, M.; Pereira, P. M. R.; Setaro, F.; Rodríguez-Morgade, M. S.; Fernandes, R.; Torres, T.; Tomé, J. P. C. A Galactose Dendritic Silicon (IV) Phthalocyanine as a Photosensitizing Agent in Cancer Photodynamic Therapy. *Chempluschem* **2018**, *83* (9), 855-860. DOI: 10.1002/cplu.201800370.
- (159) Davison, J. B.; Wynne, K. J. Many-membered carbon rings .7. cyclooctyne. *Macromolecules* **1978**, *11* (1), 186-191. DOI: 10.1021/ma60061a033.
- (160) Esposito, J. N.; Lloyd, J. E.; Kenney, M. E. Synthesis and physical properties of some organo- and organosiloxysilicon phthalocyanines. *Inorg. Chem.* **1966**, *5* (11), 1979. DOI: 10.1021/ic50045a031.
- (161) Tamao, K.; Akita, M.; Kato, H.; Kumada, M. Electrophilic cleavage reactions of carbon silicon bonds in neutral hexacoordinate silicon-compounds - diorgano(phthalocyaninato)silicon. *J. Organomet. Chem.* **1988**, *341* (1-3), 165-179. DOI: 10.1016/0022-328x(88)89072-7.
- (162) Biyiklioglu, Z.; Alp, H. Electropolymerizable peripherally tetra-{2- 3-(diethylamino) phenoxy ethoxy} substituted as well as axially (4-phenylpiperazin-1-yl)-propanoxy-disubstituted silicon phthalocyanines and their electrochemistry. *Dalton Trans.* **2015**, *44* (43), 18993-18999, DOI: 10.1039/c5dt03421c.
- (163) Musil, Z.; Zimcik, P.; Miletin, M.; Kopecky, K.; Lenco, J. Synthesis, separation and UV/Vis spectroscopy of pyrazino-quinoxalino-porphyrazine macrocycles. *European J. Org. Chem.* **2007**, (27), 4535-4542.
- (164) Nyokong, T.; Isago, H. The renaissance in optical spectroscopy of phthalocyanines and other tetraazaporphyrins. *J. Porphyr. Phthalocyanines* **2004**, *8* (9), 1083-1090,
- (165) Maree, M. D.; Kuznetsova, N.; Nyokong, T. Silicon octaphenoxypthalocyanines: photostability and singlet oxygen quantum yields. *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* **2001**, *140* (2), 117-125.
- (166) Kudrevich, S. V.; Van Lier, J. E. Substituted tetra-2,3-pyrazinoporphyrazines. Part II. Bis(tri-n-hexylsiloxy)silicon derivatives. *Can. J. Chem.* **1996**, *74* (9), 1718-1723.
- (167) Chen, Y. X.; Fang, W. J.; Wang, K.; Liu, W.; Jiang, J. Z. Nonperipheral Tetrakis(dibutylamino)phthalocyanines. New Types of 1,8,15,22-Tetrakis(substituted)phthalocyanine Isomers. *Inorg. Chem.* **2016**, *55* (18), 9289-9296. DOI: 10.1021/acs.inorgchem.6b01371.
- (168) Kolarova, M.; Mulaku, A.; Miletin, M.; Novakova, V.; Zimcik, P. Magnesium Phthalocyanines and Tetrapyrazinoporphyrazines: The Influence of a Solvent and a Delivery System on a Dissociation of Central Metal in Acidic Media. *Pharmaceuticals* **2022**, *15* (4). DOI: 10.3390/ph15040409.
- (169) Berezin, B. D.; Shukhto, O. V.; Berezin, D. B. A new type of metal porphyrin dissociation reaction. *Russ. J. Inorg. Chem.* **2002**, *47* (11), 1763-1768.
- (170) Berezin, B. D.; Shukhto, O. V.; Berezin, D. B. Unusual spectral and kinetic properties of magnesium phthalocyanine. *Izv. Vyssh. Uchebn. Zaved., Khim. Khim. Tekhnol.* **2002**, *45* (2), 5-11.
- (171) Stuzhin, P. A. Azaporphyrins and phthalocyanines as multicentre conjugated ampholites. *J. Porphyr. Phthalocyanines* **1999**, *3* (6-7), 500-513.

- (172) Ivanova, S. S.; Stuzhin, P. A. Indium(III) complexes of octaphenylporphyrazine: Effect of halide coordination on the basic properties and stability in acid media. *J. Porphyr. Phthalocyanines* **2011**, *15* (11-12), 1299-1309. DOI: 10.1142/s108842461100421x.
- (173) Fukuzumi, S.; Honda, T.; Kojima, T. Structures and photoinduced electron transfer of protonated complexes of porphyrins and metallophthalocyanines. *Coord. Chem. Rev.* **2012**, *256* (21-22), 2488-2502. DOI: 10.1016/j.ccr.2012.01.011 Scopus.
- (174) Lapok, L.; Cyza, M.; Gut, A.; Kepczynski, M.; Szewczyk, G.; Sarna, T.; Nowakowska, M. Synthesis, spectroscopic properties and interaction with a liposomal membrane of a novel iodinated magnesium phthalocyanine. *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* **2014**, *286*, 55-63. DOI: 10.1016/j.jphotochem.2014.04.006.
- (175) Bartlett, M. A.; Sundermeyer, J. Group 10 metal–thiocatecholate capped magnesium phthalocyanines – coupling chromophore and electron donor/acceptor entities and its impact on sulfur induced red-shifts. *Dalton Trans.* **2018**, *47* (45), 16255-16263, DOI: 10.1039/C8DT03681K.
- (176) Malinin, A. S.; Kalashnikova, I. V.; Rakhnyanskaya, A. A.; Yaroslavov, A. A. Adsorption of cationic polymers on the surfaces of anionic glass microspheres. *Polym. Sci. - A.* **2012**, *54* (2), 81-86, DOI: 10.1134/s0965545x1201004x.
- (177) Kristensen, K.; Henriksen, J. R.; Andresen, T. L. Adsorption of Cationic Peptides to Solid Surfaces of Glass and Plastic. *Plos One* **2015**, *10* (5). DOI: 10.1371/journal.pone.0122419.
- (178) Liu, X.; Cheng, J.; Lu, X.; Wang, R. Surface acidity of quartz: understanding the crystallographic control. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2014**, *16* (48), 26909-26916, DOI: 10.1039/C4CP02955K.
- (179) Behrens, S. H.; Grier, D. G. The charge of glass and silica surfaces. *J. Chem. Phys.* **2001**, *115* (14), 6716-6721. DOI: 10.1063/1.1404988.
- (180) Matos, C.; Moutinho, C.; Lobao, P. Liposomes as a model for the biological membrane: studies on daunorubicin bilayer interaction. *J. Membr. Biol.* **2012**, *245* (2), 69-75. DOI: 10.1007/s00232-011-9414-2
- (181) Peetla, C.; Stine, A.; Labhasetwar, V. Biophysical Interactions with Model Lipid Membranes: Applications in Drug Discovery and Drug Delivery. *Mol. Pharmaceutics* **2009**, *6* (5), 1264-1276. DOI: 10.1021/mp9000662.
- (182) Macháček, M.; Carter, K. A.; Kostelanský, F.; Miranda, D.; Seffouh, A.; Ortega, J.; Šimůnek, T.; Zimčík, P.; Lovell, J. F. Binding of an amphiphilic phthalocyanine to pre-formed liposomes confers light-triggered cargo release. *J. Mater. Chem. B* **2018**, *6* (44), 7298-7305, DOI: 10.1039/C8TB01602J.
- (183) Randles, E. G.; Bergethon, P. R. A Photodependent Switch of Liposome Stability and Permeability. *Langmuir* **2013**, *29* (5), 1490-1497. DOI: 10.1021/la303526k.
- (184) Baselga, J.; Manikhas, A.; Cortés, J.; Llombart, A.; Roman, L.; Semiglazov, V. F.; Byakhov, M.; Lokanatha, D.; Forenza, S.; Goldfarb, R. H.; et al. Phase III trial of nonpegylated liposomal doxorubicin in combination with trastuzumab and paclitaxel in HER2-positive metastatic breast cancer. *Ann. Oncol.* **2014**, *25* (3), 592-598. DOI: 10.1093/annonc/mdt543.

- (185) Bulbake, U.; Doppalapudi, S.; Kommineni, N.; Khan, W. Liposomal Formulations in Clinical Use: An Updated Review. *Pharmaceutics* **2017**, *9* (2). DOI: 10.3390/pharmaceutics9020012.
- (186) Arias-Alpizar, G.; Kong, L.; Vlieg, R. C.; Rabe, A.; Papadopoulou, P.; Meijer, M. S.; Bonnet, S.; Vogel, S.; van Noort, J.; Kros, A.; Campbell, F. Light-triggered switching of liposome surface charge directs delivery of membrane impermeable payloads in vivo. *Nat. Comm.* **2020**, *11* (1). DOI: 10.1038/s41467-020-17360-9.
- (187) Zhao, F.; Li, R.; Liu, Y.; Chen, H. Perspectives on lecithin from egg yolk: Extraction, physicochemical properties, modification, and applications. *Front. Nutr.* **2022**, *9*, 1082671. DOI: 10.3389/fnut.2022.1082671 From NLM.
- (188) Ghosh, S.; Carter, K. A.; Lovell, J. F. Liposomal formulations of photosensitizers. *Biomater.* **2019**, *218*. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2019.119341.
- (189) Zeballos, N. C. L.; Vior, M. C. G.; Awruch, J.; Dicelio, L. E. An exhaustive study of a novel sulfur-linked adamantane tetrasubstituted zinc(II) phthalocyanine incorporated into liposomes. *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* **2012**, *235*, 7-13. DOI: 10.1016/j.jphotochem.2012.02.022.
- (190) Chen, C. C.; Wu, R. J.; Tzeng, Y. Y.; Lu, C. S. Chemical Oxidative Degradation of Acridine Orange Dye in Aqueous Solution by Fenton's Reagent. *J. Chin. Chem. Soc.* **2009**, *56* (6), 1147-1155. DOI: 10.1002/jccs.200900165.
- (191) Wilkinson, F.; Helman, W. P.; Ross, A. B. Rate Constants for the Decay and Reactions of the Lowest Electronically Excited Singlet-State of Molecular-Oxygen in Solution - an Expanded and Revised Compilation. *J. Phys. Chem. Ref.* **1995**, *24* (2), 663-1021. DOI: 10.1063/1.555965.
- (192) Schnurpfeil, G.; Sobbi, A. K.; Spiller, W.; Kliesch, H.; Wohrle, D. Photo-oxidative Stability and its Correlation with Semi-empirical MO Calculations of Various Tetraazaporphyrin Derivatives in Solution. *J. Porphyr. Phthalocyanines* **1997**, *1* (2), 159-167.
- (193) Demuth, J.; Kucera, R.; Kopecky, K.; Havlínová, Z.; Libra, A.; Novakova, V.; Miletin, M.; Zimcik, 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. DOI: 10.1002/chem.201801319.
- (194) Marks, I. S.; Kang, J. S.; Jones, B. T.; Landmark, K. J.; Cleland, A. J.; Taton, T. A. Strain-Promoted "Click" Chemistry for Terminal Labeling of DNA. *Bioconjugate Chem.* **2011**, *22* (7), 1259-1263. DOI: 10.1021/bc1003668.
- (195) Siyad, M. A.; Kumar, G. S. V. Synthesis, characterization, and evaluation of PS-PPDC resin: A novel flexible cross-linked polymeric support for solid-phase organic synthesis. *Biopolymers* **2012**, *98* (3), 239-248. DOI: 10.1002/bip.22060.
- (196) Li, C.; Che, W.; Liu, S. Y.; Liao, G. Hypercrosslinked microporous polystyrene: from synthesis to properties to applications. *Mater. Today Chem.* **2023**, *29*. DOI: 10.1016/j.mtchem.2023.101392.