

**Univerzita Karlova v Praze**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Chemie



Alena Tomášková

Modifikované chelátory železa prostupující plazmatickou membránou

Modified Iron Chelators Permeating Plasmatic Membrane

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

Vedoucí práce:

Prof. RNDr. Jan Kotek, PhD.

Praha, 2024

**Prohlášení:**

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

V Praze, dne 21. května 2024

Alena Tomášková

## **Abstrakt**

V dnešní době je velkým tématem snaha o nalezení léčby onkologických onemocnění. Buňky některých typů nádorů obsahují větší množství železa než zdravé buňky. Železo je biogenní prvek, který je důležitý pro buněčné dělení a růst. Protože hlavním místem metabolismu železa je mitochondrie, je jednou z cest, jak nádorovým buňkám přivodit buněčnou smrt, snížení biologické dostupnosti železa v mitochondriích. V současnosti je několik registrovaných terapeutik, z nichž některá obsahují hydroxypyridonovou skupinu jako jednotku chelatující železo, ale žádná z používaných léčiv nejsou cílená do mitochondrií. Aby byla chelatující jednotka schopna vázat železo lokalizované v mitochondriích, je potřeba, aby prošla přes její vnější a vnitřní membránu, čehož lze docílit spojením trifenylfosfoniového kationtu, což je ověřený transportér látek do mitochondrie, s chelatující jednotkou přes lipofilní řetězec. Trifenylfosfonium by díky svému kladnému náboji mělo být schopné hydrofilní chelatující jednotku dopravit do mitochondrií, kde chelátor zakomplexuje železité kationty, čímž by se měla snížit jejich dostupnost pro ostatní biochemické procesy.

V rámci této práce byly připraveny dva hydroxypyridonové deriváty lišící se různě dlouhou spojkou mezi chelatující jednotkou a trifenylfosfoniovým kationtem.

## **Klíčová slova**

Ligandy pro železo, mitochondriální membrána, nádorové buňky, fosfoniové soli, hydroxypyridony

## **Abstract**

The effort to find a cure for cancer is a big topic nowadays. Some types of cancer cells contain more iron than healthy cells. Iron is a biogenic element that is important for cell proliferation and growth. Since the main site of iron metabolism is in the mitochondria, one way to induce cell death in cancer cells is to reduce the bioavailability of iron in the mitochondria. There are several currently registered therapeutics, some of which contain a hydroxypyridone group as an iron chelating unit, but none of the drugs in use are designed to target the mitochondria. For the chelating unit able to bind iron localized in the mitochondria, it needs to cross the outer and inner membranes of the mitochondria, which can be achieved by coupling the chelating unit with the triphenylphosphonium cation, which is a known membrane transporter, via a lipophilic chain. Triphenylphosphonium should be able to transport the hydrophilic chelating unit into the mitochondria due to its positive charge. The chelator will complex the ferric cations, thereby reducing their availability for other biochemical processes.

In this work, two hydroxypyridone derivatives were prepared differing in the length of the spacer between the chelating unit and triphenylphosphine cation.

## **Keywords**

Iron-binding ligands, mitochondrial membrane, cancer cells, phosphonium salts, hydroxypyridones

## **Poděkování**

V první řadě bych ráda poděkovala mému školiteli Honzovi Kotkovi, především za jeho ochotu mi pomoci se všemi problémy, za pomoc při práci v laboratoři i při sepisování bakalářské práce, za odpovědi na veškeré mé dotazy, za jeho věčný optimismus a celkově za všechnen čas, který mi věnoval.

Dále bych chtěla poděkovat Terce Dobrovolné, se kterou jsem mohla konzultovat všechny vydařené i nevydařené syntézy, a která mě trpělivě naučila pracovat se všemi přístroji potřebnými k dokončení této práce.

Ráda bych také poděkovala všem ostatním z laboratoře za odpovědi na mé dotazy, ochotnou pomoc a vysvětlení různých laboratorních úkonů, za pomoc při luštění spekter a celkově za vytvoření skvělé atmosféry v laboratoři.

V neposlední řadě bych chtěla poděkovat rodině a kamarádům za podporu, kterou mi věnovali po celou dobu mého studia.

## Seznam zkratek

ADP	Adenosindifosfát
ATP	Adenosin trifosfát
$\beta$ -Ala	Beta-alanin, kyselina 3-aminopropanová
DFO	Desferrioxamin
DFP	Deferipron
DFX	Deferasirox
DIPEA	<i>N,N</i> -Diisopropylethylamin
DMAP	4-Dimethylaminopyridin
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DNA	Deoxyribonukleová kyselina ( <i>Deoxyribonucleic acid</i> )
EDC	Ethyl(dimethylaminopropyl)karbodiimid
EDTA	Kyselina ethylendiamintetraoctová ( <i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i> )
FAD	Oxidovaná forma koenzymu flavinadenindinukleotid
FADH <sub>2</sub>	Redukovaná forma koenzymu flavinadenindinukleotid
GIT	Trávicí soustava ( <i>Gastrointestinal tract</i> )
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie ( <i>High-performance liquid chromatography</i> )
LIP	Intracelulární zásoba železa ( <i>Labile iron pool</i> )
MS	Hmotnostní spektrometrie ( <i>Mass spectrometry</i> )
NAD <sup>+</sup>	Oxidovaná forma koenzymu nikotinamidadenindinukleotid
NADH	Redukovaná forma koenzymu nikotinamidadenindinukleotid
NMR	Nukleární magnetická rezonance
PIH	Pyridoxal isonikotinoyl hydrazon

ROS	Reaktivní formy kyslíku ( <i>Reactive oxygen species</i> )
RVO	Rotační vakuová odparka
<i>t</i> -BuOH	<i>Terc</i> -butanol
TFA	Kyselina trifluoroctová ( <i>Trifluoroacetic acid</i> )
TMS	Tetramethylsilan

# Obsah

1.	Teoretický úvod.....	10
1.1.	Mitochondrie .....	10
1.1.1.	Elektron-transportní řetězec .....	11
1.1.2.	Železo v mitochondriích.....	12
1.1.3.	Membrány.....	14
1.2.	Rakovinné buňky.....	15
1.3.	Chelátory železa .....	15
1.3.1.	Desferrioxamin.....	16
1.3.2.	Pyridoxal isonikotinoyl hydrazon a jeho analogy .....	17
1.3.3.	Parabactin .....	18
1.3.4.	Thiosemikarbazony .....	18
1.3.5.	Deferasirox .....	19
1.3.6.	Hydroxypyrony a hydroxypyridony .....	20
2.	Cíl práce .....	22
3.	Experimentální část.....	23
3.1.	Použité chemikálie.....	23
3.2.	Metody izolace a charakterizace syntetizovaných látek.....	23
3.2.1.	Hmotnostní spektrometrie .....	23
3.2.2.	Vysokoučinná kapalinová chromatografie.....	23
3.2.3.	Spektroskopie NMR .....	25
3.3.	Syntetická část.....	26
3.3.1.	Látka 3: 3-(benzyloxy)-2-methyl-4H-pyran-4-on.....	26
3.3.2.	Látka 6: hydrobromid bromidu (2-aminoethyl)trifenylfosfonia.....	27
3.3.3.	Látka 8: 3-(3-(benzyloxy)-2-methyl-4-oxopyridin-1(4H)-yl)propanová kyselina .....	27
3.3.4.	Látka 9: hydrochlorid 3-(3-hydroxy-2-methyl-4-oxopyridin-1(4H)-yl)propanové kyseliny.....	29
3.3.5.	Látka 10: (2-(3-(3-hydroxy-2-methyl-4-oxopyridin-1(4H)-yl)propanamido)ethyl)trifenylfosfonium chlorid.....	30
3.3.6.	Látka 12: 6-(3-(benzyloxy)-2-methyl-4-oxopyridin-1(4H)-yl)hexanová kyselina .....	31
3.3.7.	Látka 13: hydrochlorid 6-(3-hydroxy-2-methyl-4-oxopyridin-1(4H)-yl)hexanové kyseliny .....	32



3.3.8. Látka 14: (2-(6-(3-hydroxy-2-methyl-4-oxopyridin-1(4H)-yl)hexanamido)ethyl)trifenyfosfonium chlorid .....	33
4. Výsledky a diskuze.....	35
5. Závěr.....	40
6. Literatura.....	41

# 1. Teoretický úvod

V dnešní době jsou onkologická onemocnění a jejich potenciální léčba velkým tématem. Jednou z možností léčby by mohlo být využití chelátorů železa cílených do mitochondrií. Díky tomu, že nádorové buňky obsahují oproti zdravým buňkám více železa, by tato metoda mohla být potenciálně selektivní pouze k nádorovým buňkám.<sup>1</sup>

Některé chelátory železa jsou již schválenými léčivými a využívají se pro léčbu nemocí spojených s vysokou koncentrací železa v organismu. Příkladem takové nemoci je například hemochromatóza, která může být dána geneticky (v organismu se hromadí železo z potravy) nebo může být důsledkem častých transfuzí. Chelátory schválenými pro léčbu takových nemocí jsou například Deferiprone (DFP), Deferasirox (DFX), nebo Desferrioxamin (DFO) (popis těchto látek a jejich strukturní vzorce jsou uvedeny níže v textu).<sup>2</sup> Tyto chelátory ale neprocházejí do mitochondrií, ale chelatují kationty železa v cytosolu. Pro vstup do mitochondrií musejí chelátory projít přes vnitřní a vnější membránu mitochondrie. Vnější mitochondriální membrána obsahuje poměrně velké póry, které propouštějí nízkomolekulární látky do molekulové hmotnosti ca 5000 Da, avšak vnitřní membrána je pro drtivou většinu látek nepropustná. Proto je potřeba na chelatující jednotku navázat přes dostatečně lipofilní řetězec skupinu, která chelátor dopraví přes vnitřní membránu. Takovou schopnost má například trifenylylfosfoniový kation.<sup>3</sup>

## 1.1. Mitochondrie

Mitochondrie jsou membránové orgány vyskytující se ve většině eukaryotických buněk. Mají vlastní DNA a rozmnožují se dělením. V mnohém se podobají bakteriím a předpokládá se, že se vyvinuly z bakterií, které byly pohlceny buňkami. Jejich nejznámější funkcí je oxidativní fosforylace adenosindifosfátu (ADP) na adenosintrifosfát (ATP). Tento proces je energeticky spřažen s elektron-transportním řetězcem, a nazývá se oxidativní fosforylace. Redukované koenzymy vstupující do elektron-transportního řetězce vznikají během glykolýzy (probíhající v cytosolu buňky), v citrátovém cyklu nebo při beta-oxidaci mastných kyselin (odbourávání mastných

kyselin). Beta-oxidace mastných kyselin a citrátový cyklus se také odehrávají v matrix mitochondrií.

Vzhledem k tomu, že mitochondrie jsou místem, kde buňka získává většinu energie, můžeme říct, že eukaryotické buňky bez mitochondrií nemohou existovat. Proto pokud chceme nádorovým buňkám přivodit buněčnou smrt, jednou z cest je poškození mitochondrií. Mitochondrie jsou velmi bohaté na železo. Probíhá zde část syntézy hemu a Fe-S klastrů a nacházejí se zde komplexy elektron-transportního řetězce a cytochromy, které obsahují železo. Omezení biologické dostupnosti železa jeho koordinací vhodnými ligandy přímo v mitochondriích tedy může významně narušit elektron-transportní řetězec, tím připravit buňku o způsob získávání energie a v důsledku toho přivodit buněčnou smrt.

### **1.1.1. Elektron-transportní řetězec**

Elektron-transportní řetězec neboli dýchací řetězec je proces, při němž se přenášejí elektrony z redukovaných koenzymů NADH (v komplexu I) a FADH<sub>2</sub> (v komplexu II) do komplexu IV, kde se díky nim redukuje kyslík a vzniká voda. Tento řetězec se nachází ve vnitřní membráně, ve které jsou všechny komplexy elektron-transportního řetězce a ATP-synthasa. Komplex I obsahuje NADH-ubichinonreduktasu, komplex II obsahuje sukcinát-ubichinonreduktasu, komplex III obsahuje kubichinol-cytochrom C-reduktasu a komplex IV obsahuje cytochrom C-oxidasu.

Nejprve se v komplexu I z NADH (nebo v komplexu II z FaDH<sub>2</sub>) odebere hydridový anion, který je převeden na proton a dva elektrony, kterými je redukován koenzym Q. Redukce koenzymu Q probíhá v komplexu III. Redukovaný koenzym Q nesoucí dva elektrony předá oba tyto elektrony dvěma molekulám oxidovaných cytochromů C (obsahující Fe<sup>3+</sup>) a do mezimembránového prostoru se uvolní dva protony. Redukované cytochromy C (obsahující Fe<sup>2+</sup>) poté do komplexu IV přenesou dva elektrony, kterými se redukuje ½ O<sub>2</sub> a vzniká voda. Elektrony v komplexu I mají vysokou energii, kterou při každém kroku elektron-transportního řetězce ztrácejí. Tím získávají energii komplexy elektron-transportního řetězce. Komplexy I, III a IV ji poté využívají k získání protonu z vody v matrix mitochondrie a k transportu tohoto protonu do mezimembránového

prostoru. Přesunem protonů z matrix mitochondrie do mezimembránového prostoru se vytváří gradient elektrochemického potenciálu protonů. Protony, které jsou pumpovány do mezimembránového prostoru, mají malou molekulovou hmotnost, díky které mohou procházet přes vnější membránu mitochondrie, a proto pH v mezimembránovém prostoru a v cytosolu je stejné, a to okolo hodnoty 7. V matrix mitochondrií je ale menší koncentrace protonů, pH v matrix je okolo hodnoty 8, takže koncentrace protonů je v matrix mitochondrií asi desetkrát nižší<sup>4</sup>.

ATP-synthasa použít protony z mezimembránového prostoru zpět do matrix mitochondrie, přičemž získává energii, která je uložena v gradientu elektrochemického potenciálu protonů. Díky této energii je umožněno provést fosforylaci ADP na ATP pomocí anorganického fosfátu.

Protože všechny čtyři komplexy a cytochrom C obsahují železnaté a železité kationty, je jednou z cest jak usmrtit buňku vyvázání železa nebo jeho znedostupnění pro syntézu nových komplexů a cytochromu C. Porušením funkce jednoho nebo více komplexů elektron-transportního řetězce zablokujeme buňce schopnost přenášet elektrony na kyslík, přičemž komplexy I, III a IV přestanou pumpovat protony do mezimembránového prostoru, čímž zmizí gradient elektrochemického potenciálu protonů a ATP-synthasa nebude mít energii k fosforylaci ADP na ATP.

### **1.1.2. Železo v mitochondriích**

Železo se v organismu vyskytuje jak v oxidované ( $\text{Fe}^{3+}$ ) tak i v redukované ( $\text{Fe}^{2+}$ ) formě. Díky přechodu mezi těmito dvěma oxidačními stavy se ve velkém množství enzymů může chovat jako akceptor i jako donor elektronů. Železo je biogenní prvek, účastní se mnoha biologických procesů, jako jsou přenos kyslíku, získávání energie nebo například syntéza DNA,<sup>5,6</sup> ale pokud je železa v organismu příliš, může působit i toxicky. Toxický účinek je založen na Fentonově reakci (1.1.2.1) a Haberově-Weissově reakci (1.1.2.2), při kterých vznikají reaktivní formy kyslíku (ROS).<sup>1,2</sup> Volné železo má také další toxické účinky. S nenasycenými lipidy reaguje za vzniku alkoxylových a peroxylových radikálů, které poškozují buňky a tkáně.<sup>7</sup> Proto je koncentrace železa v buňce regulována transportními (transferin) a skladovacími proteiny (ferritin,

hemosiderin).<sup>1,2,5</sup> Jedna molekula ferritinu na sebe může navázat až 4500 atomů železa.<sup>5</sup> Železo je v buňce transportováno díky transferinu (každá molekula transferinu na sebe naváže dva železité kationty) a přes membrány prochází díky transferinovým receptorům. Železo se vyskytuje především v hemu a v proteinových klastrech Fe-S.<sup>2</sup> Obě tyto struktury jsou částečně syntetizovány v mitochondriích a jsou kofaktory velkého množství enzymů.<sup>2,8</sup> Hem je složen z protoporfyrinu IX a z iontu železa a tvoří prostetickou skupinu mnoha hemoproteinů (například hemoglobin, myoglobin a cytochromy).<sup>2</sup> Tělo dospělého člověka obsahuje 4,5 – 5,0 g železa, z toho největší množství (2,3 – 2,6 g) se nachází v hemoglobinu<sup>5</sup>, kde se podílí na transportu kyslíku. V mitochondriích se železo vyskytuje v cytochromech a ve všech čtyřech komplexech elektron-transportního řetězce.<sup>2</sup> Železo se do organismu dostává v potravě v hemové formě (živočišné výrobky) nebo v nehemové formě (například ovoce, zelenina nebo luštěniny)<sup>1,9</sup> absorpcí v trávicí soustavě (GIT – gastrointestinal tract). Železo v hemové formě má lepší biologickou dostupnost než železo v nehemové formě, toho je ale v potravě větší množství, proto železo v nehemové formě přispívá k získávání železa více.<sup>9</sup> V hemové formě je železo ve formě železitých kationtů a je dále díky transferinu přepravováno do cytosolu, kde se váže na aminokyseliny, nukleotidy nebo cukry a vzniká intracelulární zásoba železa (LIP – labile iron pool).<sup>5</sup> Aby se dostalo dále do mitochondrie, musí železo projít přes obě membrány. Vnější membrána je propustná pro všechny malé molekuly, ale přes vnitřní membránu je dopraveno díky transportním proteinům (mitoferiny).<sup>4</sup>

#### **1.1.2.1. Fentonova reakce**

Při Fentonově reakci se díky oxidaci železnatého (nebo měďného) kationtu redukuje peroxid vodíku za vzniku hydroxylového aniontu a hydroxylového radikálu. Hydroxylový radikál je jedno z nejsilnějších oxidačních činidel (standardní redoxní potenciál 2,8 V), která mohou způsobit buněčnou smrt, protože mohou oxidovat DNA nebo ničit membrány mitochondrie.<sup>1</sup> Volné radikály mohou také způsobit vznik nádorového bujení.<sup>10</sup>

### **1.1.2.2. Haberova-Weissova reakce**

Haberova-Weissova reakce je železem (nebo mědí) pouze katalyzována. Peroxid vodíku reaguje se superoxidem za vzniku kyslíku, hydroxylového aniontu a hydroxylového radikálu.<sup>1,11</sup> Stejně jako u Fentonovy reakce zde vzniká hydroxylový radikál, který je díky svým oxidačním vlastnostem pro buňku toxický.

### **1.1.3. Membrány**

Mitochondrie mají dvě membrány, vnitřní a vnější, mezi kterými je tzv. mezimembránový prostor. Vnitřní i vnější membrány jsou tvořeny fosfolipidovou dvojvrstvou, různými bílkovinami a enzymy.

#### **1.1.3.1. Vnější membrána**

Asi největší rozdíl mezi vnitřní a vnější membránou je porin, tunelová bílkovina nacházející se ve vnější membráně. Porin tvoří otvory ve vnější membráně, kterými mohou z cytosolu do mezimembránového prostoru procházet malé molekuly (do 5000 Da).<sup>4</sup> Díky tomuto pasivnímu přechodu je koncentrace malých molekul a iontů na obou stranách vnější membrány mitochondrie stejná, ale v matrix mitochondrie, za vnitřní membránou, je jejich koncentrace nižší.

#### **1.1.3.2. Vnitřní membrána**

Vnitřní membrána je oproti vnější propustná jen pro specifické molekuly (například pyruvát, nebo mastné kyseliny), které jsou přes membránu dopraveny pomocí membránových transportních proteinů. Kromě transportních proteinů se ve vnitřní membráně nacházejí komplexy I až IV z elektron-transportního řetězce a ATP-synthasa. Aby byla zajištěna větší produkce ATP, tedy aby byl prostor pro větší množství komplexů elektron-transportního řetězce a ATP-synthasy, je povrch vnitřní membrány zvětšen záhyby, které se nazývají krysty.<sup>4</sup>

## 1.2. Rakovinné buňky

Hlavním rozdílem mezi zdravou a rakovinnou buňkou je to, že rakovinná buňka nepřestává růst a nepřestává se dělit. Rakovinné buňky změny svůj metabolismus tak, aby pokryly nároky na rychlý růst a dělení.<sup>12</sup> Apoptóza, neboli programovaná buněčná smrt, je funkce, díky které se organismus zbavuje nepotřebných nebo poškozených buněk. Organismus dá zdravým buňkám, pokud jsou poškozené nebo pokud je buněk stejného typu příliš, signál k uskutečnění apoptózy. Rakovinné buňky ale na tento signál nereagují. I když je jich příliš, množí se dělením stále dál. Navíc se rakovinné buňky dělí příliš rychle. Narozdíl od zdravých buněk, které dospějí do fáze, kdy se z nich stávají specializované buňky se speciálními funkcemi, se rakovinné buňky do této fáze nestihnou dostat. Protože rakovinné buňky ignorují signály o tom, že by se měly přestat dělit, a stále rostou, potřebují stále víc prostoru, a proto napadají tkáň v okolí nebo tvoří metastázy v jiných částech těla.

Právě kvůli neustálému dělení mají rakovinné buňky větší potřebu železa pro zajištění metabolismu a pro syntézu DNA. Díky tomu mají i vyšší koncentraci transportních (transferin) a skladovacích proteinů (ferritin, hemosiderin).<sup>2,5,6</sup> Rakovinné buňky jsou tedy více citlivé na nedostatek železa.<sup>13</sup>

## 1.3. Chelátory železa

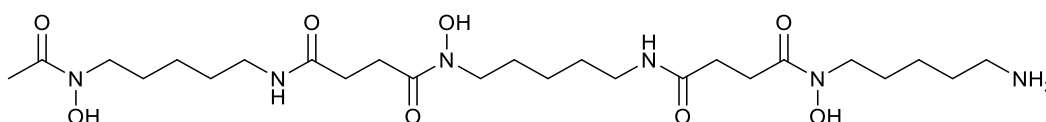
Aby chelátor (ligand) omezil dostupnost železa v mitochondriích natolik, aby jeho nedostatek ovlivnil buňku, musí mít k železitým nebo železnatým kationtům dostatečnou afinitu. Chelátory obsahují prvky, které se chovají jako donory elektronového páru (například kyslík, dusík nebo síra, většinou ve skupinách  $-\text{CO}$ ,  $-\text{OH}$ ,  $-\text{CN}$ ,  $-\text{NH}_2$ ,  $-\text{SH}$ ),<sup>14</sup> které interagují s kladně nabitým iontem kovu, v tomto případě železitého kationtu.

Chelátory se jako léčiva využívají už od 30. let 20. století, kdy Ferdinand Mans syntetizoval ethylendiamintetraoctovou kyselinu (EDTA). Pomocí ligandu EDTA se léčila otrava olovem, ale později byl tento ligand využíván i na odstranění přebytečného železa z organismu. EDTA ale účinně vyvazuje z organismu i vápník, a proto se už k chelataci železa nevyužívá.<sup>15</sup>

Původní myšlenka byla využití chelátorů železa pro léčbu nemocí spojených s vysokou koncentrací železa v organismu, ale možnosti jejich využití jsou mnohem větší. Cílením na různá místa by mohly být chelátory využitelné k léčbě například nádorových onemocnění nebo malárie.<sup>16</sup>

V dnešní době je několik chelátorů schválených pro léčbu nemocí spojených s vysokou koncentrací železa v organismu. Používanými léčivými látkami jsou například Desferrioxamin, pyridoxal isonikotinoyl hydrazon a jeho analogy, Parabactin, thiosemikarbazony, Deferasirox, hydroxypyrony a hydroxypyridony.<sup>16</sup>

### 1.3.1. Desferrioxamin

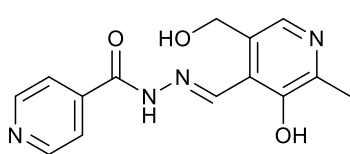


Obrázek 1 – Strukturní vzorec desferrioxaminu.

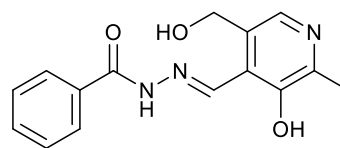
Desferrioxamin (Obrázek 1), také známý jako deferoxamin, je bakteriální siderofor izolovaný z bakterie *Streptomyces pilosus*. Chová se jako hexadentátní ligand, koordinuje kovové kationty přes karbonylové a hydroxylové skupiny. Díky tomu, že má velkou afinitu k železitému kationtu (s ionty  $\text{Fe}^{3+}$  tvoří extrémně stabilní komplexy 1:1), je v dnešní době schváleným léčivem pro léčbu onemocnění spojených s vysokým obsahem železa v organismu, jako je například talasémie nebo hemochromatóza. Nevýhodou DFO je jeho malá lipofilita, kvůli které se málo vstřebává z GIT.<sup>1</sup> Navíc je v organismu rychle metabolizován a jeho biologický poločas v plazmě je pouze 12 minut, proto je potřeba ho podávat subkutánními infuzemi (do podkoží) trvajících 8 až 12 hodin, a to 5 až 7 × týdně.<sup>1,2,15,17,18</sup> DFO má schopnost vyvázat železo z LIP, ferritinu a transferinu, ale není schopný železo vyvázat z porfyrinového kruhu.<sup>2</sup> DFO je ale málo lipofilní, a proto špatně prochází přes membrány. Proto byl stejně jako na cílový ligand této práce na DFO navázán trifenylfosfoniový kation, který by měl DFO přes membrány přenést. Napojení trifenylfosfoniového kationtu na DFO bylo provedeno a publikováno v nedávné době.<sup>19</sup>



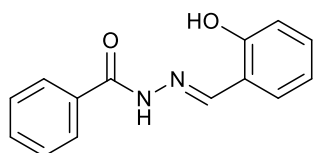
### 1.3.2. Pyridoxal isonikotinoyl hydrazon a jeho analogy



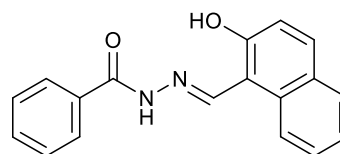
Pyridoxal isonikotinoyl hydrazon (PIH)



Pyridoxal benzoyl hydrazon



Salicylaldehyd benzoyl hydrazon



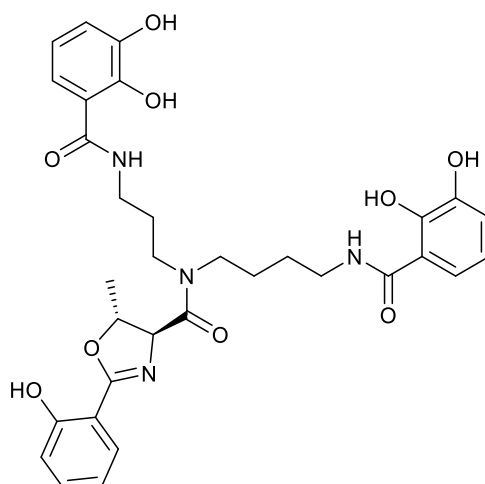
2-hydroxy-1-naftylaldehyd benzoyl hydrazon

Obrázek 2 – Strukturní vzorce pyridoxal isonikotinoyl hydrazonu a jeho analogů.

Vzhledem ke složitému podávání DFO jako léčiva je snaha o nalezení chelátorů s lepšími nebo alespoň stejnými terapeutickými vlastnostmi, ale s možností perorálního podání a lepší biologickou dostupností. Pyridoxal isonikotinoyl hydrazon (PIH) a jeho analogy (Obrázek 2) mají podobně jako DFO vysokou afinitu k železitým kationtům. Vzhledem k jejich dostatečné lipofilitě pro průchod přes membránu do cytosolu buňky byly od počátku zkoumány jako ligandy s potenciálním antiproliferačním účinkem.

Byly porovnávány vlastnosti DFO s PIH a různými jeho analogy (Obrázek 2). I přesto, že PIH dokázal lépe než DFO omezit dostupnost kationtů železa z transferinu, lepší antiproliferační účinky měl DFO. Naopak některé analogy PIH dokázaly omezit proliferaci buněk ještě lépe než DFO. Nejlepšími antiproliferačními činidly byly analogy PIH odvozené od 2-hydroxy-1-naftylaldehyd benzoyl hydrazonu. Z toho se dá usuzovat, že čím je daný derivát lipofilnější, tím má lepší antiproliferační účinek.<sup>20</sup>

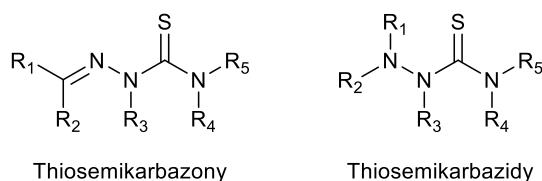
### 1.3.3. Parabactin



Obrázek 3 – Strukturální vzorec Parabactinu.

Již v roce 1975 byly z bakterie *Paracoccus denitrificans* izolovány dva siderofory ze třídy katecholamidů. Oba tyto ligandy měly lepší schopnost vyvazovat kationty železa než DFO, ale vzhledem k tomu, že byly z bakterií izolovány pouze v miligramových množstvích, bylo potřeba siderofory vyrábět synteticky. Bylo syntetizováno mnoho příbuzných ligandů ze třídy katecholamidů, z nichž se nejperspektivnějším ukázal Parabactin (Obrázek 3).<sup>21</sup> Parabactin je hexadentátní ligand a koordinuje železité kationty v poměru 1:1.<sup>22</sup>

### 1.3.4. Thiosemikarbazony



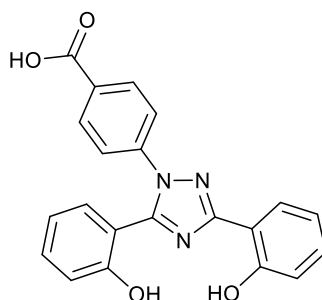
Obrázek 4 – Obecný strukturální vzorec thiosemikarbazonů a thiosemikarbazidů.

Thiosemikarbazony (Obrázek 4) jsou bidentátní ligandy a chelatují kovové kationty přes atom síry a přes atom dusíku. Thiosemikarbazidy (Obrázek 4), skupina látek podobná thiosemikarbazonům, se ve většině případů chovají stejně jako thiosemikarbazony, tedy jako bidentátní ligandy. V takovém případě koordinují kovové

kationty přes atomy síry a dusíku. V některých případech (při koordinaci rtuťnatého a stříbrného kationtu) se ale umí chovat i jako monodentátní ligandy a koordinovat kationt kovů pouze atomem síry. Toto chování u thiosemikarbazonů nebylo pozorováno.<sup>23</sup>

Thiosemikarbazony se využívají k léčbě nádorových onemocnění. Podle prvotních teorií byl jejich antiproliferační účinek založen na inhibici ribonukleotidreduktasy, která je nutná k syntéze DNA, vyvázáním kationtů železa z jejího centra. Později se ukázalo, že schopnost thiosemikarbazonů zastavit proliferaci nádorových buněk je založena na koordinaci i dalších kovů, včetně železa, a to nejen z ribonukleotidreduktasy, ale obecně z LIP. Díky koordinaci kationtů železa jsou inhibovány všechny enzymy obsahující železo. Díky interakci se železem navíc thiosemikarbazony podporují Fentonovu reakci, která vznikem ROS vede k poškození nádorových buněk, a tím způsobuje buněčnou smrt.<sup>24</sup>

### 1.3.5. Deferasirox



Obrázek 5 – Strukturální vzorec Deferasiroxu.

Deferasirox (DFX) je tridentátní ligand, který váže železité kationty v poměru 2:1. Má významně větší afinitu k železitým kationtům než ke kationtům mědi a zinku.<sup>15,25</sup> Protože chelatace přebytečného železa v organismu pomocí DFO je časově náročná, byla snaha syntetizovat chelátory, které by měly delší biologický poločas v plazmě a které by bylo možné podávat perorálně. To splňuje právě DFX a proto se používá pro léčbu nemocí spojených s vysokou koncentrací železa v organismu.<sup>25</sup> Prodává se ve formě potahovaných tablet, v České republice vyrábí tablety pod názvem Deferasirox firma Zentiva. Když byly tablety DFX podány bezprostředně po nebo před jídlem, byla

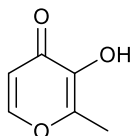
biologická dostupnost léčiva ovlivněna druhem jídla. Proto je doporučeno podávat DFX alespoň 30 minut před jídlem.<sup>25</sup>

Při perorálním podání DFX myším byla sledována 75% absorpce látky, ale pouze 26% biologická dostupnost. Tento rozdíl bude nejpravděpodobněji způsoben first-pass efektem.<sup>25,26</sup> Při first-pass efektu se část léčiva perorálně podaného do organismu dostane dřív do jater, kde je metabolizováno, než do krve, a tím se sníží jeho koncentrace a biologická dostupnost.

### 1.3.6. Hydroxypyrony a hydroxypyridony

Hydroxypyrony i hydroxypyridony jsou bidentátní ligandy s velkou afinitou k železitým kationtům, které koordinují díky karbonylové a hydroxylové skupině, a to v poměru 3:1. Tyto ligandy jsou schopné vyvázat kationty železa jak z LIP, tak i z transferinu nebo ferritinu<sup>16,27</sup>

#### 1.3.6.1. Maltol



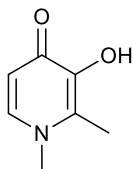
Obrázek 6 – Strukturní vzorec maltolu.

Maltol je zástupcem hydroxypyronů. Je to přírodní látka vyskytující se v semenech a jehličí borovice, v čekance, sladu, kávě, obilí, kakau a dalších materiálech rostlinného původu.<sup>28</sup> Vyskytuje se ve formě sladce vonících nažloutlých krystalů a je využíván v kosmetickém a potravinářském průmyslu.<sup>29,30</sup> Pod označením E636 se přidává do velkého množství potravin jako dochucovadlo a umí potlačit nahořklou chuť umělých sladidel.

Díky karbonylové a hydroxylové skupině může maltol sloužit jako donor elektronových párů, a díky tomu funguje jako chelatující ligand pro kovové kationty. Vzhledem k tomu, že DFP má dobrou afinitu k železitým kationtům, můžeme

předpokládat, že i jiné ligandy odvozené od maltolu budou k železitým kationtům mít obdobně vysokou afinitu.

### 1.3.6.2. Deferipron



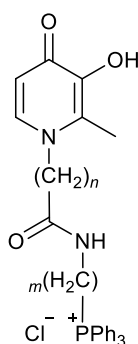
Obrázek 7 – Strukturní vzorec Deferipronu.

Deferipron (DFP) je zástupcem hydroxypyridonů. Prodává se pod názvem Ferriprox jako orálně podávané léčivo na talasémii neboli středomořskou anemii. Talasémie je nemoc, při které se v organismu netvoří hemoglobin, červené krevní barvivo, a proto je nutné ho dodávat častými krevními transfuzemi. Metabolismem dodávaného hemoglobinu se však v organismu kumuluje příliš velké množství železa, které poškozuje srdce, játra a slezinu. Proto je třeba nadbytek železa pomocí chelátorů z organismu odstranit. Doporučená denní dávka DFP je 25 mg/kg třikrát denně, maximální dávka je 100 mg/kg za den. I přesto, že biologická dostupnost DFP je vyšší než pro DFO, jeho úspěšnost při léčbě talasémie je nižší než při léčbě DFO. Proto je DFP až druhou volbou po DFO. V některých případech se pro docílení co nejefektivnější chelatace železa z organismu DFP podává spolu s DFO.<sup>15</sup>

Deriváty hydroxypyridonu lze připravit z maltolu reakcí s aminem, při které dojde k výměně kyslíku v pyranovém cyklu za aminoskupinu.

## 2. Cíl práce

Abychom hydrofilní chelatující jednotku dopravili přes membrány do mitochondrie, je nutné na ni navázat lipofilní postranní řetězec s mitochondriálně cílenou jednotkou. Proto je cílem této bakalářské práce na chelatující jednotku vycházející z maltolu/hydroxypyridonu přes různě dlouhé řetězce navázat trifenylofosfin v podobě fosfoniového iontu. Ten by měl díky kladnému náboji procházet přes vnitřní membránu mitochondrie, a díky jejímu vysokému zápornému membránovému potenciálu se kumulovat i v matrix mitochondrie. Pro lepší mobilitu chelatující jednotky uvnitř mitochondrie byl jako linker mezi chelatující jednotkou a trifenylofosfinem vybrán řetězec spojený peptidovou vazbou. Karboxylová skupina vstupující do peptidové vazby je navázána přes *n*-uhlíkatý řetězec na chelatující hydroxypyridonové jednotce a aminová skupina je přes *m*-uhlíkatý řetězec navázána na trifenylofosfin (Obrázek 8).



Obrázek 8 – Návrh cílových derivátů, *n* označuje délku uhlíkatého řetězce spojujícího karboxylovou skupinu vstupující do peptidového couplingu s chelatující jednotkou, *m* označuje délku uhlíkatého řetězce spojujícího aminoskupinu s trifenylofosfoniovým kationtem.

## **3. Experimentální část**

### **3.1. Použité chemikálie**

Chemikálie použité pro syntézu byly zakoupeny od firem Sigma Aldrich, Fluka, Acros Organics a Serva.

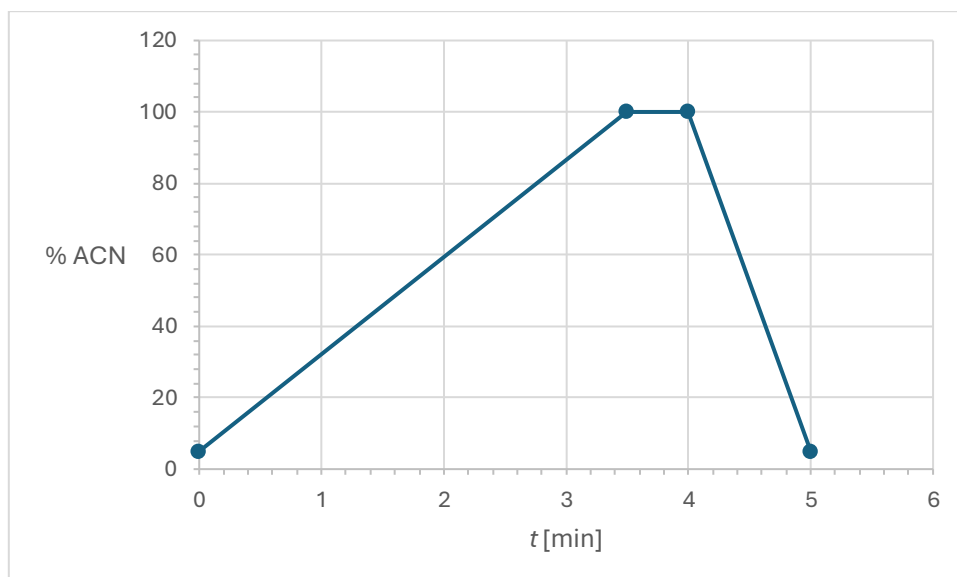
### **3.2. Metody izolace a charakterizace syntetizovaných látek**

#### **3.2.1. Hmotnostní spektrometrie**

Hmotnostní spektra byla měřena na přístroji Waters ACQUITY QDa, s ionizací elektrosprejem a s kvadrupólovým analyzátozem.

#### **3.2.2. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie**

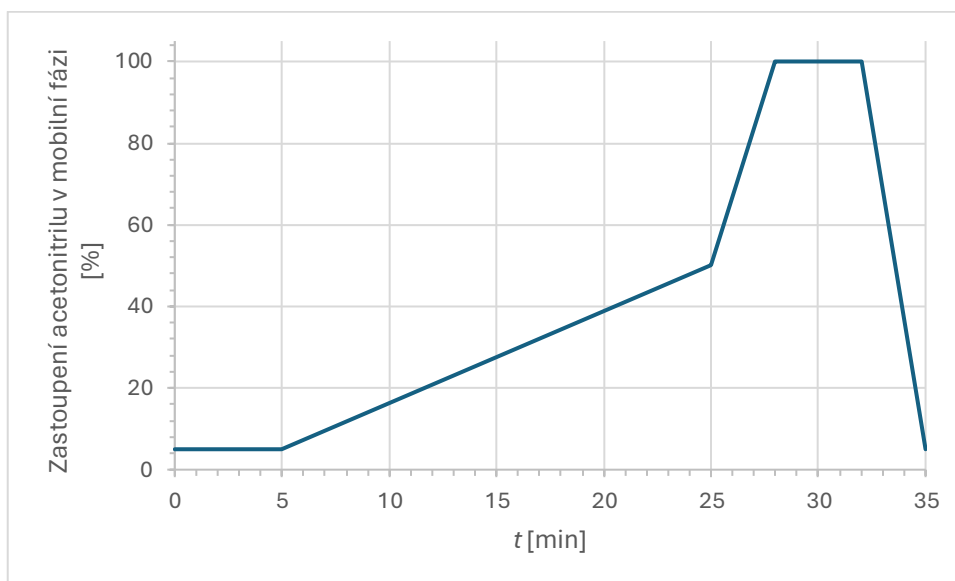
Dělení vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií bylo prováděno na přístroji Waters Arc HPLC systém s UV/VIS a MS detektorem, s kolonou C18 CORTECS (2,7  $\mu\text{m}$ , 4,6 $\times$ 50 mm), s průtokem 1,2 ml/min. Jako mobilní fáze byly při chromatografii použity voda (0,1% roztok trifluoroctové kyseliny – TFA) a acetonitril (0,1% roztok TFA). Při dělení byla použita metoda s gradientovou elucí (Obrázek 9).



Obrázek 9 – Gradientová eluce metody použité při dělení pomocí HPLC. Metoda začíná na 5% roztoku acetonitrilu ve vodě, během 3,5 minuty se koncentrace acetonitrilu lineárně zvedne na 100 %. 100% acetonitrilem je kolona vymývána půl minuty (do 4. minuty). Během poslední minuty (do 5. minuty) klesne koncentrace acetonitrilu zpět na 5 %.

Pro preparativní dělení byla použita analogická metoda s gradientovou elucí (detaily viz Obrázek 10). Dělení bylo prováděno na systému přístrojů Waters 2535 Quarternary Gradient module, Waters 2489 UV/VIS Detector a Waters Fraction Collector III. Byla použita kolona Luna 5 $\mu$ l C18 250 $\times$ 21,2 mm s průtokem 12 ml/min. Jako mobilní fáze byly použity voda (0,1% roztok TFA) a acetonitril (0,1% roztok TFA).





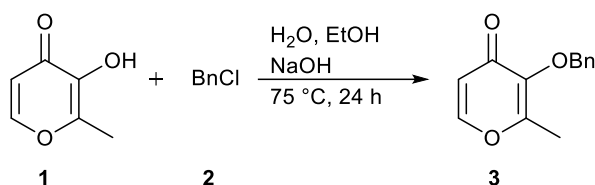
Obrázek 10 - Gradientová eluce metody použité pro dělení obou cílových produktů. Metoda začíná na 5% roztoku acetonitrilu ve vodě. V 5. minutě se koncentrace acetonitrilu začne lineárně zvyšovat, aby se ve 25. minutě dostala na 50% roztok acetonitrilu, odkud se za tři minuty (do 28. minuty) koncentrace zvýší na 100% acetonitrilu. Acetonitrem je kolona vymývána další 4 minuty (do 32. minuty) a za poslední tři minuty (do 35. minuty) koncentrace acetonitrilu klesne zpět na 5%.

### 3.2.3. Spektroskopie NMR

Čistota a charakterizace připravených látek byla určována pomocí 1D ( $^1\text{H}$  a  $^{13}\text{C}$ ) a 2D (COSY, HMBC, HSQC) NMR spekter. Tato spektra byla měřena na přístrojích Bruker Avance III 400 MHz a Bruker Avance Neo 400 MHz. Spektra byla zpracována v programu MestReNova.<sup>31</sup> Byla používána deuterovaná rozpouštědla  $\text{D}_2\text{O}$ ,  $\text{CDCl}_3$  a  $d_4\text{-MeOD}$ . Do těžké vody byl jako standard pro referenci přidán *tert*-butanol ( $^1\text{H} - \delta_{t\text{-BuOH}} = 1,24 \text{ ppm}$ ;  $^{13}\text{C} - \delta_{t\text{-BuOH}(\text{CH}_3)} = 30,1 \text{ ppm}$ ), do deuterovaného chloroformu byl pro referenci v  $^1\text{H}$  spektru přidán tetramethylsilan a  $^{13}\text{C}$  spektra byla referencována na signál rozpouštědla ( $^1\text{H} - \delta_{\text{TMS}} = 0,0 \text{ ppm}$ ;  $^{13}\text{C} - \delta_{\text{CDCl}_3} = 77,2 \text{ ppm}$ ), spektra měřená v methanolu byla referencována na signály rozpouštědla, resp. zbytkový obsah  $^1\text{H}$  ( $^1\text{H} - \delta_{\text{MeOH}(\text{CHD}_2)} = 3,31 \text{ ppm}$ ;  $^{13}\text{C} - \delta_{\text{MeOD}} = 49,0 \text{ ppm}$ ). Níže uváděné hodnoty chemických posunů jsou v ppm a hodnoty interakčních konstant v Hz.

### 3.3. Syntetická část

#### 3.3.1. Látka 3: 3-(benzyloxy)-2-methyl-4H-pyran-4-on



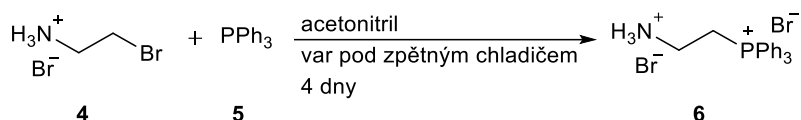
Chránění hydroxylové skupiny maltolu **1** bylo provedeno podle publikovaného postupu<sup>32</sup> s úpravami. Ve 100ml kulaté baňce byl maltol **1** (5,1 g; 40,4 mmol; 1 ekv.) rozpuštěn v 25 ml methanolu. Do roztoku byl nejprve přikapán roztok hydroxidu sodného (1,81 g NaOH + 5 ml H<sub>2</sub>O; 45,3 mmol; 1,1 ekv.) a poté byl během půl hodiny injekční stříkačkou přikapán benzylchlorid **2** (4,65 g; 36,7 mmol; 0,9 ekv.). Reakční směs byla míchána a zahřívána na 75 °C v olejové lázni po dobu 24 h. Poté byla směs přefiltrována přes nuč s fritou a rozpouštědla byla odpařena na rotační vakuové odparce (RVO). Získaný hnědý olej byl rozpuštěn v 50 ml dichlormethanu, promyt 2 × 17 ml 5% vodného roztoku NaOH a 1 × 20 ml solanky. Organická fáze byla poté vysušena bezvodým síranem sodným a dichlormethan byl ze směsi odpařen na RVO. Byl získán produkt **3** jako hnědý olej (6,16 g; 28,4 mmol; odhadovaný výtěžek 79 %).

Charakterizace:

Naměřená NMR spektra (<sup>1</sup>H a <sup>13</sup>C) se shodovala s publikovanými daty<sup>32</sup> a jsou ukázána v Příloze 1.

### 3.3.2. Látka 6: hydrobromid bromidu

#### (2-aminoethyl)trifenylfosfonia



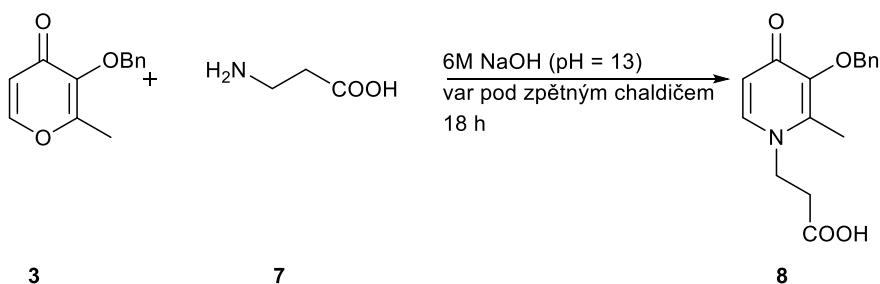
Sloučenina **6** byla syntetizována podle publikovaných postupů<sup>33,34</sup> s úpravami. Trifenylfosfín **5** (1,63 g; 6,2 mmol; 1,3 ekv.) a hydrobromid 1-amino-2-bromethanu **4** (1,01 g; 4,9 mmol; 1 ekv.) byly v 5 ml acetonitrilu zahřívány pod zpětným chladičem po dobu 4 dnů. Reakční směs byla poté extrahována do 10 ml deionizované vody a promyta 3 × 10 ml chloroformu. Vodná fáze byla oddělena a zbavena rozpouštědla na RVO. Byl získán bílý prášek **6** (2,2 g; 4,7 mmol; odhadovaný výtěžek 96 %).

Charakterizace:

Naměřená NMR spektra (<sup>1</sup>H a <sup>13</sup>C) se shodovala s publikovanými daty<sup>33</sup> a jsou ukázána v Příloze 2.

### 3.3.3. Látka 8: 3-(3-(benzyloxy)-2-methyl-4-oxopyridin-

#### -1(4H)-yl)propanová kyselina



Syntéza byla provedena kombinací publikovaných postupů<sup>35,36</sup> s dalšími úpravami. Ve 25ml baňce byly benzylmaltol **3** (0,50 g; 2,3 mmol; 1 ekv.) a β-Ala **7** (0,32 g; 3,6 mmol; 1,5 ekv.) rozpuštěny do směsi ethanolu (4 ml) a vody (4 ml). Do roztoku byl postupně přikapán 6M roztok NaOH, do pH = 13 (změna pH byla sledována pH metrem JenWay 3505 s elektrodou Mettler Toledo). Poté byl roztok zahříván k varu pod zpětným

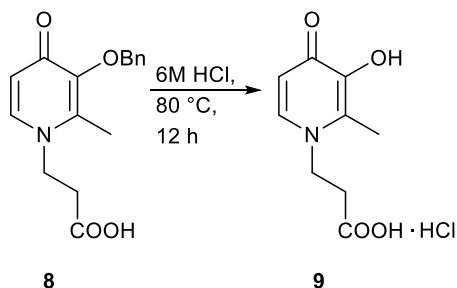
chladičem do druhého dne. Z reakční směsi byla poté odpařena rozpouštědla na rotační vakuové odparce. Odparek byl rozpuštěn do minimálního množství destilované vody a pH roztoku bylo upraveno na hodnotu 4 (změna pH sledována pH metrem) pomocí 6M roztoku HCl. Produkt byl extrahován do 3 × 10 ml dichlormethanu. Organická fáze byla vysušena bezvodým síranem sodným a dichlormethan byl odpařen na rotační vakuové odparce. Získaný olej byl převrstven acetonem a ponechán v lednici. Po dvou dnech byl filtrací izolován nahnědlý prášek **8** (0,36 g; 1,3 mmol; odhadovaný výtěžek 55 %).

Charakterizace (NMR spektra jsou ukázána v Příloze 3):

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, 25 °C, MeOD): 8,42 (d,  $J = 7,2$ ; 1H, CH); 7,47 – 7,39 (m, 2H, *arom.*); 7,43 – 7,33 (m, 3H, *arom.*); 7,22 (d,  $J = 7,1$ ; 1H, CH); 5,18 (s, 2H, CH<sub>2</sub>-Ph); 4,63 (t,  $J = 6,8$ ; 2H, CH<sub>2</sub>); 2,99 – 2,87 (m, 2H, CH<sub>2</sub>); 2,53 (s, 3H, CH<sub>3</sub>).

$^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz, 25 °C, MeOD): 171,9 (s, 1C, COOH); 165,5 (s, 1C, C=O); 152,0 (s, 1C, kvarterní C v pyridinovém cyklu); 144,8 (s, 1C, kvarterní C v pyridinovém cyklu); 143,9 (s, 1C, CH); 137,2 (s, 1C, kvarterní C z Ph); 130,2 (s, 1C, Ph); 129,9 (s, 2C, Ph), 129,7 (s, 2C, Ph); 113,7 (s, 1C, CH); 76,4 (s, 1C, CH-Ph); 53,2 (s, 1C, CH<sub>2</sub>); 34,4 (s, 1C, CH<sub>2</sub>), 13,8 (s, 1C, CH<sub>3</sub>).

### 3.3.4. Látka 9: hydrochlorid 3-(3-hydroxy-2-methyl-4-oxopyridin-1(4H)-yl)propanové kyseliny



Pro odchránění hydroxylové skupiny byla sloučenina **8** (0,36 g; 1,3 mmol) převrstvena 6M kyselinou chlorovodíkovou (10 ml). Směs byla zahřívána na 80 °C v olejové lázni do druhého dne. Roztok byl promyt 3 × 10 ml dichlormethanu a voda z vodné fáze byla odpařena na rotační vakuové odparce. Byl získán žlutohnědý prášek **9** (0,29 g; 1,2 mmol; odhadovaný výtěžek 92 %).

Charakterizace (NMR spektra jsou ukázána v Příloze 4):

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, 25 °C, D<sub>2</sub>O): 8,13 (d, *J* = 7,1; 1H, CH); 7,12 (d, *J* = 7,0; 1H, CH); 4,64 (t, *J* = 6,9; 2H, CH<sub>2</sub>); 3,00 (t, *J* = 6,9; 2H, CH<sub>2</sub>); 2,62 (s, 3H, CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, 25 °C, D<sub>2</sub>O): 174,7 (s, 1C, COOH); 159,6 (s, 1C, C=O); 143,3 (s, 1C, kvarterní C v pyridinovém cyklu); 143,2 (s, 1C, kvarterní C v pyridinovém cyklu); 139,7 (s, 1C, CH); 111,6 (s, 1C, CH); 52,5 (s, 1C, CH<sub>2</sub>); 34,5 (s, 1C, CH<sub>2</sub>); 12,9 (s, 1C, CH<sub>3</sub>).

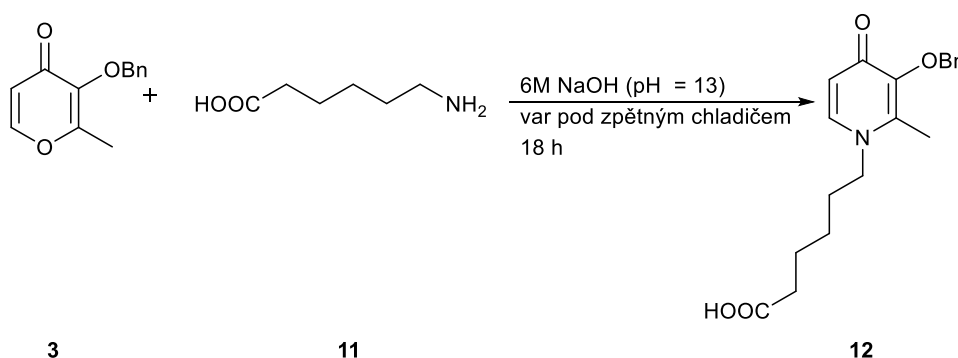


Charakterizace (NMR spektra jsou ukázána v Příloze 5):

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, 25 °C,  $\text{D}_2\text{O}$ ): 8,01 (d,  $J = 7,1$ ; 1H, CH); 7,91 – 7,80 (m, 3H, arom.); 7,79 – 7,65 (m, 12H, arom.); 7,11 (d,  $J = 7,0$ ; 1H, CH); 4,52 (t,  $J = 6,6$ ; 2H,  $\text{CH}_2$ ); 3,70 – 3,58 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ); 3,56 – 3,45 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ); 2,61 (t,  $J = 6,6$ ; 2H,  $\text{CH}_2$ ); 2,56 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ).

$^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz, 25 °C,  $\text{D}_2\text{O}$ ): 171,9 (s, 1C, C=O mimo pyridinový cyklus); 159,1 (s, 1C, C=O v pyridinovém cyklu); 143,3 (s, 1C, kvarterní C v pyridinovém cyklu); 143,3 (s, 1C, kvarterní C v pyridinovém cyklu); 139,5 (s, 1C, CH); 135,9 (d, 1C, arom.); 134,2 (d, 2C, arom.); 130,8 (d, 2C, arom.); 118,0 (d, 1C, kvarterní C arom.); 111,5 (s, 1C, CH); 52,8 (s, 1C,  $\text{CH}_2$ ); 35,6 (s, 1C,  $\text{CH}_2$ ); 33,6 (d, 1C,  $\text{CH}_2$ ); 22,5 (d, 1C,  $\text{CH}_2$ ); 13,0 (s, 1C,  $\text{CH}_3$ ).

### 3.3.6. Látka 12: 6-(3-(benzyloxy)-2-methyl-4-oxopyridin-1(4H)-yl)hexanová kyselina



Syntéza byla provedena podle publikovaného postupu pro  $\beta$ -Ala<sup>36</sup> s úpravami. Ve 100ml kulaté baňce byl benzylmaltol **3** (2,00 g; 9,3 mmol; 1 ekv.) rozpuštěn ve 25 ml ethanolu. Ke vzniklému roztoku byl přidán roztok kapronové kyseliny **11** (1,42 g; 10,8 mmol; 1,2 ekv.) ve 25 ml vody. Do reakční směsi byl přikapáván 10M roztok NaOH, do pH = 13 (změna pH kontrolována univerzálním indikátorovým papírkem). Směs byla zahřívána k varu pod zpětným chladičem po dobu 22 h. Reakční směs byla na rotační vakuové odparce odpařena na 1/3 původního objemu a její pH bylo pomocí 6M HCl upraveno na hodnotu 4 (změna pH kontrolována univerzálním indikátorovým papírkem). Byla provedena extrakce do dichlormethanu (3 × 20 ml). Organická fáze byla zbavena

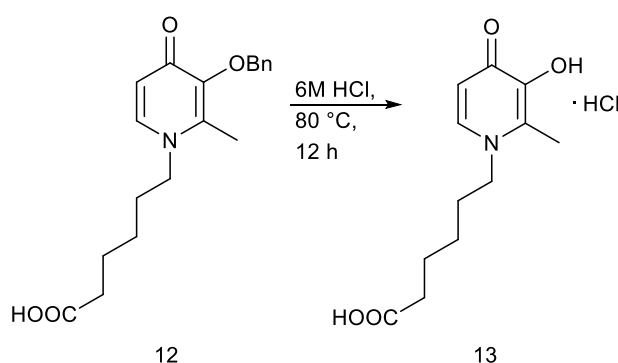
zbytkové vody bezvodým síranem sodným a dichlormethan byl z roztoku odpařen na RVO. Získaný olej byl převrstven acetonem a ponechán v lednici. Po šesti dnech byly filtrací izolovány vzniklé krystaly **12** a byla provedena rekrystalizace z ethanolu a acetonu (2,09 g; 6,3 mmol; odhadovaný výtěžek 68 %).

Charakterizace (NMR spektra jsou ukázána v Příloze 6):

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, 25 °C,  $\text{CDCl}_3$ ): 11,17 (s, 1H, COOH); 7,40 – 7,24 (m, 6H, CH + arom.); 6,65 (d,  $J = 7,2$ ; 1H, CH); 5,15 (s, 2H,  $\text{CH}_2$ ); 3,81 (t,  $J = 7,3$ ; 2H,  $\text{CH}_2$ ); 2,33 (t,  $J = 7,0$ ; 2H,  $\text{CH}_2$ ); 2,10 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ); 1,63 (t,  $J = 7,2$ ; 4H,  $\text{CH}_2$ ); 1,33 (td,  $J = 8,6$ ; 3,6; 2H,  $\text{CH}_2$ ).

$^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz, 25 °C,  $\text{CDCl}_3$ ): 176,2 (s, 1C, COOH); 172,8 (s, 1C, C=O); 145,8 (s, 1C, kvarterní C v pyridinovém cyklu); 142,5 (s, 1C, kvarterní C v pyridinovém cyklu); 139,1 (s, 1C, CH); 137,3 (s, 1C, kvarterní C arom.); 129,2 (s, 1C, arom.); 128,4 (s, 2C, arom.); 128,2 (s, 2C, arom.); 116,6 (s, 1C, CH); 73,4 (s, 1C,  $\text{CH}_2\text{-Ph}$ ); 54,1 (s, 1C,  $\text{CH}_2$ ); 34,2 (s, 1C,  $\text{CH}_2$ ); 30,2 (s, 1C,  $\text{CH}_2$ ); 25,7 (s, 1C,  $\text{CH}_2$ ); 24,3 (s, 1C,  $\text{CH}_2$ ); 12,6 (s, 1C,  $\text{CH}_3$ ).

### 3.3.7. Látka 13: hydrochlorid 6-(3-hydroxy-2-methyl-4-oxopyridin-1(4H)-yl) hexanové kyseliny



Sloučenina **12** (0,58 g; 1,8 mmol) byla rozpuštěna v 10 ml 6M kyseliny chlorovodíkové a roztok byl za stálého míchání zahříván na 80 °C do druhého dne. Reakční směs byla promyta 2 × 10 ml dichlormethanu. Vodná fáze byla prosáta přes nuč



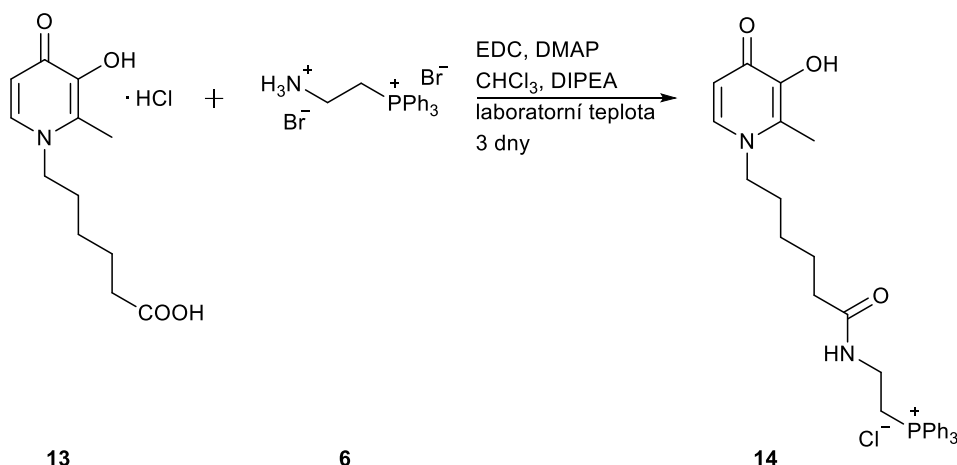
s fritou a voda z filtrátu byla odpařena na rotační vakuové odparce. Byl získán světle hnědý prášek **13** (0,43 g; 1,6 mmol; odhadovaný výtěžek 86 %).

Charakterizace (NMR spektra jsou ukázána v Příloze 7):

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, 25 °C, MeOD): 8,19 (d,  $J = 6,9$ ; 1H, CH); 7,14 (d,  $J = 6,9$ ; 1H, CH), 4,39 (dd,  $J = 8,8$ ; 6,7; 2H,  $\text{CH}_2$ ); 2,64 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ); 2,33 (t,  $J = 7,2$ ; 2H,  $\text{CH}_2$ ); 1,94 – 1,82 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ); 1,68 (p,  $J = 7.3$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2$ ); 1,51 – 1,39 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ).

$^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz, 25 °C, MeOD): 177,2 (s, 1C, COOH); 159,5 (s, 1C, C=O); 145,1 (s, 1C, kvarterní C v pyridinovém cyklu); 143,1 (s, 1C, kvarterní C v pyridinovém cyklu); 139,2 (s, 1C, CH); 111,7 (s, 1C, CH); 57,7 (s, 1C,  $\text{CH}_2$ ); 34,5 (s, 1C,  $\text{CH}_2$ ); 31,0 (s, 1C,  $\text{CH}_2$ ); 26,7 (s, 1C,  $\text{CH}_2$ ); 25,4 (s, 1C,  $\text{CH}_2$ ); 12,7 (s, 1C,  $\text{CH}_3$ ).

### 3.3.8. Látka **14**: (2-(6-(3-hydroxy-2-mythyl-4-oxopyridin-1(4H)-yl)hexanamido)ethyl)trifenylfosfonium chlorid



Do suspenze látky **13** (100 mg; 0,36 mmol; 1,1 ekv.) ve 4 ml chloroformu byla postupně přikapávána DIPEA, dokud se látka **13** nerozpustila. Do roztoku byl dále přidán DMAP (48 mg; 0,39 mmol; 1,2 ekv.) a EDC (75 mg; 0,39 mmol; 1,2 ekv.).

Do suspenze látky **6** (150 mg; 0,32 mmol; 1 ekv.) ve 4 ml chloroformu byla postupně přikapávána DIPEA, dokud se sloučenina **6** nerozpustila.

Oba roztoky byly spojeny a za laboratorní teploty míchány 3 dny. Reakční směs byla poté rozdělena pomocí semipreparativní HPLC (metoda viz kapitola 3.2.2, retenční čas

produktu = 22 minut). Pomocí hmotnostní spektroskopie bylo zjištěno, které frakce obsahují produkt. Frakce obsahující produkt byly spojeny a rozpouštědla z těchto frakcí byla následně odpařena na rotační vakuové odparce (při 37 °C). Získaný olej byl následně rozpuštěn do asi 20 ml 0,1% roztoku kyseliny chlorovodíkové. Poté byla odpařena rozpouštědla na RVO. Tento proces byl proveden celkem třikrát. Po posledním odpaření byl získaný nažloutlý olej **14**, u kterého byla pomocí NMR spektroskopie (jako reference byl při měření v těžké vodě použit methanol) určena efektivní molární hmotnost 881 g/mol (228 mg, 0,26 mmol, výtěžek 81 %).

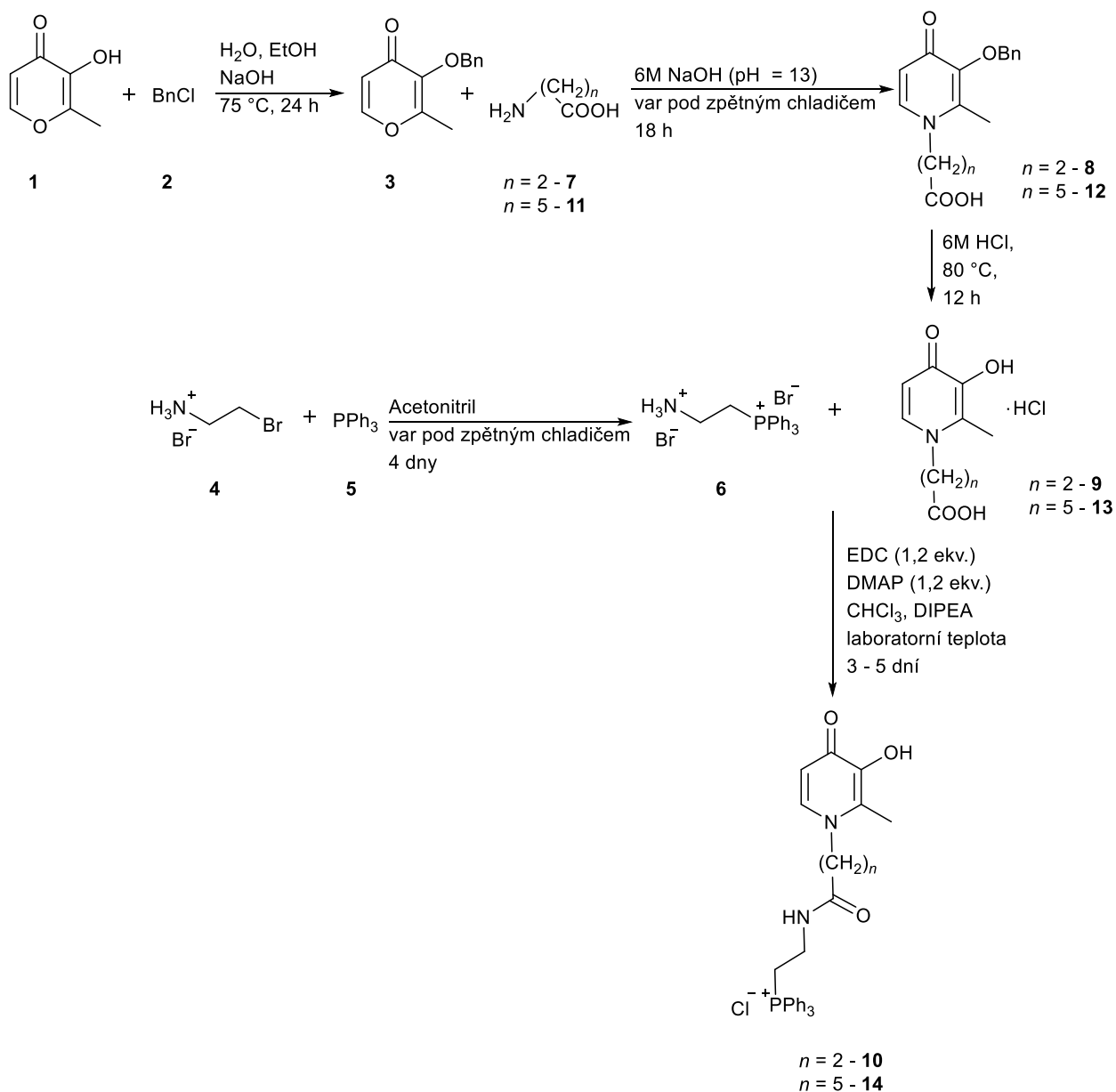
Charakterizace (NMR spektra jsou ukázána v Příloze 8):

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, 25 °C,  $\text{D}_2\text{O}$ ): 7,99 (d,  $J = 7,0$ ; 1H, CH); 7,87 – 7,61 (m, 15H, *arom.*); 7,08 (d,  $J = 7,0$ ; 1H, CH); 4,27 (t,  $J = 7,5$ ; 2H,  $\text{CH}_2$ ); 3,65 – 3,45 (m, 4H,  $\text{CH}_2$ ); 2,53 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ); 1,95 (t,  $J = 7,5$ ; 2H,  $\text{CH}_2$ ); 1,81 – 1,67 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ); 1,40 (p,  $J = 7,5$ ; 2H,  $\text{CH}_2$ ); 1,27 – 1,15 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ).

$^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz, 25 °C,  $\text{D}_2\text{O}$ ): 176,6 (s, 1C, C=O mimo pyridinový cyklus); 157,8 (s, 1C, C=O v pyridinovém cyklu); 142,5 (s, 1C, kvarterní C v pyridinovém cyklu); 142,5 (s, 1C, kvarterní C v pyridinovém cyklu); 138,4 (s, 1C, CH); 135,1 (d, 3C, *arom.*); 133,5 (d, 6C, *arom.*); 130,1 (d, 6V, *arom.*); 117,5 (d, 3C, kvarterní C *arom.*); 110,8 (s, 1C, CH); 56,5 (s, 1C,  $\text{CH}_2$ ); 35,0 (s, 1C,  $\text{CH}_2$ ); 32,8 (d, 1C,  $\text{CH}_2$ ); 29,1 (s, 1C,  $\text{CH}_2$ ); 24,8 (s, 1C,  $\text{CH}_3$ ); 24,2 (s, 1C,  $\text{CH}_2$ ); 21,8 (d, 1C,  $\text{CH}_2$ ); 12,2 (s, 1C,  $\text{CH}_3$ ).

## 4. Výsledky a diskuze

Cílem této práce bylo syntetizovat látky, ve kterých budou různě dlouhými řetězci spojeny chelatující jednotka vycházející z maltolu (resp. z hydroxypyridonu) s trifenylfosfoniovou skupinou. Vzhledem ke zvolenému spojení peptidovým couplingem bylo nejprve trifenylfosfonium navázáno na řetězec s aminoskupinou, a do struktury maltolu byla po ochránění hydroxylové skupiny při výměné reakci atomu kyslíku v cyklu za atom dusíku zavedena  $\omega$ -aminokyselina. Spojení trifenylfosfoniového kationtu s aminoskupinou delším uhlíkatým řetězcem musí probíhat přes derivát s chráněnou aminoskupinou (např. *N*- $\omega$ -bromalkyl-ftalimid), jednodušším řešením je použití kratšího spojovacího řetězce, kdy pro dvouuhlíkatou spojku bylo možné použít hydrobromid 1-amino-2-bromethanu, který reaguje přímo s trifenylfosfinem. Při přípravě cílových produktů byl použit takto syntetizovaný hydrobromid bromidu (2-aminoethyl)trifenylfosfonia, na který byly poté peptidovým couplingem připojeny chelatující jednotky s karboxylovou skupinou napojenou přes dvou a pěti uhlíkaté řetězce, viz Obrázek 11.



Obrázek 11 - Schéma provedených syntéz produktů **10** a **14**.

Ochránění hydroxylové skupiny maltolu **1** benzylovou skupinou bylo provedeno podle postupu popsáném v literatuře<sup>32</sup> (viz kapitola 3.3.1). Při syntéze byl získán produkt o vysoké čistotě (stanoveno pomocí NMR), avšak ve formě hnědého oleje. Výtěžek produktu byl odhadnut se zanedbáním zbytkových rozpouštědel a možných nečistot. Při některých dalších syntézách prováděných Mgr. Terezou Dobrovolnou byl produkt izolován ve formě bílých krystalů, proto byl do dalších kroků syntézy použit takto izolovaný produkt.

Při prvním pokusu o syntézu meziproduktu **6** bylo postupováno podle publikace,<sup>34</sup> kde je použito velké množství acetonitrilu jako rozpouštědla. Výtěžek této reakce byl pouze 16 %, pravděpodobně kvůli nízké koncentraci reaktantů v reakční směsi. Proto byla následně reakce provedena bez rozpouštědla. Teplota tání trifenylofosfinu **5** je 75–76 °C,<sup>37</sup> ale protože 1-amino-2-bromethan **4** do trifenylofosfinu **5** nebyl rozpustný, tak při zahřívání na 90 °C do druhého dne směs nezačala reagovat. Jako další možnost byla zvolena změna rozpouštědla. Aby mohla být směs zahřívána na vyšší teplotu, byl jako rozpouštědlo zvolen dimethylformamid (DMF) s teplotou varu 152–153 °C.<sup>38</sup> Díky tomu, že reakční směs byla zahřívána na vyšší teplotu, vznikl produkt s větším výtěžkem (36 %), ale vzhledem k vysoké teplotě varu DMF bylo složité rozpouštědlo ze směsi odpařit. Proto byl proveden postup podle publikace,<sup>33</sup> kde ale nestačil uvedený čas zahřívání pod zpětným chladičem, kdy po jednom dni byly v reakční směsi stále přítomné oba reaktanty. Kromě malého výtěžku reakce byla problematická izolace čistého produktu **6**. Trifenylofosfin **5** se ze směsi dal snadno odstranit extrakcí do dichlormethanu a do vody. Trifenylofosfin **5** je rozpustný do dichlormethanu a produkt **6** je rozpustný do vody. Do vody je ale rozpustný i 1-amino-2-bromethan **4**, a proto od něj nebyl produkt vyčištěn. Pro co největší konverzi a pro snadné čištění produktu **6** byl proto trifenylofosfin **5** přidáván v nadbytku. Reakce byla pod zpětným chladičem místo jednoho dne zahřívána 4 dny, po dobu kterých zreagoval všechny 1-amino-2-bromethan **4** a produkt **6** pak mohl být vyčištěn extrakcí. Výtěžek byl odhadnut se zanedbáním možného obsahu zbytkových rozpouštědel.

Napojení  $\beta$ -alaninu **7** na chelatující jednotku **3** bylo nejprve provedeno podle publikace<sup>36</sup> a změny pH byly kontrolovány univerzálním pH papírkem. Díky hmotnostní spektroskopii bylo zjištěno, že produkt byl znečištěný a kvůli tomu nevykrytalizoval ani při dlouhém stání v lednici. Proto byla syntéza provedena spojením postupů ze dvou publikací<sup>35,36</sup>, a místo univerzálního indikátorového papírku byl použit pH metr pro přesnější stanovení pH reakční směsi. Při provedení syntézy tímto způsobem, uvedeným v kapitole 3.3.3, se podařilo produkt izolovat krystalizací. Výtěžek byl odhadnut se zanedbáním možného obsahu zbytkových rozpouštědel.

Pro napojení kapronové kyseliny **11** na chelatující jednotku **3** byl použit postup publikovaný pro  $\beta$ -alanin.<sup>36</sup> Rozdíl oproti publikaci vznikl při úpravě pH na hodnotu 4, kdy se kolem každé kapky kyseliny vyloučila bílá sraženina a při pH blízkém hodnotě 4

se začal vylučovat hnědý olej, který se při extrakci rozpustil do dichlormethanu. I přesto, že změny pH byly kontrolovány pouze univerzálním indikátorovým papírkem, reakce proběhla, a produkt po uložení do lednice ze získaného oleje vykrytalizoval. Výtěžek byl odhadnut se zanedbáním možného obsahu zbytkových rozpouštědel.

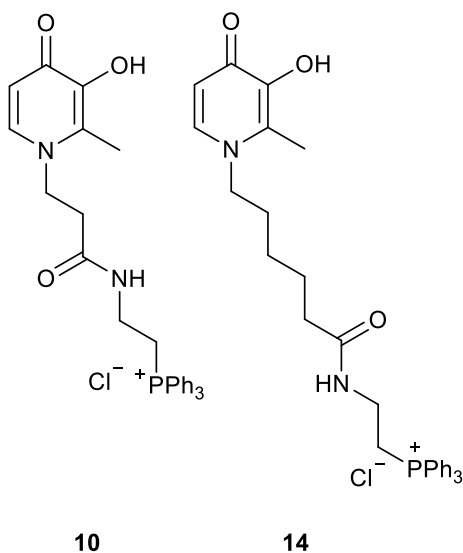
Při syntéze produktu **14** bylo jako couplingové činidlo zvoleno EDC. Při prvním provedení reakce byly nejprve smíchány roztoky látky **13** a látky **6** v chloroformu s malým množstvím DIPEA, a až do této směsi byly přidávány DMAP a EDC. Při druhém pokusu ale kromě produktu (pomocí MS pozorováno  $m/z = 527$ ) vznikaly ve větším množství nečistoty s  $m/z = 334$  a  $m/z = 348$ . Byly provedeny dva slepé pokusy, kdy byla připravena vždy stejná reakční směs, ale v jedné chyběla látka **13** a v jedné látka **6**. Po dvou dnech míchání za laboratorní teploty se v reakční směsi obsahující látku **13** nic nezměnilo, ale v reakční směsi obsahující látku **6** vznikaly nečistoty s  $m/z = 334$  i  $m/z = 348$ . Tím bylo zjištěno, že nečistota pochází od látky **6**, a proto byl postup upraven. Látka **6** byla do reakční směsi přidávána až jako poslední a látka **13** byla přidávána v nadbytku. Produkt byl z reakční směsi získáván pomocí semipreparativní HPLC. Protože rozpouštědla pro tuto chromatografii jsou 0,1% roztoky trifluoroctové kyseliny, ligandy byly po chromatografii získány jako trifluoroacetáty. Vzhledem k dalšímu zkoumání průchodu ligandů do mitochondrií buněk bylo potřeba, aby finální produkt byl ve formě chloridů. Proto byl olej po odpaření frakcí získaných pomocí semipreparativní HPLC (teplota lázně RVO byla nastavena na 37 °C kvůli potenciální termolabilitě peptidové vazby) několikrát rozpuštěn v 0,1% kyselině chlorovodíkové (nízká koncentrace kyseliny chlorovodíkové byla zvolena, aby se případně nehydrolyzovala peptidová vazba). Kyselina chlorovodíková je mnohem silnější než kyselina trifluoroctová, proto by mělo teoreticky hned po prvním odpaření dojít ke změně aniontu. Při zjišťování efektivní molární hmotnosti pomocí NMR spektroskopie bylo potřeba jako referenci v těžké vodě použít methanol, protože běžně používaný *t*-BuOH má stejný posun jako jedna z CH<sub>2</sub> skupin produktu **14**.

Syntéza finálního produktu **10** byla provedena obdobně jako pro analogický produkt **14**. Pro změnu aniontu z trifluoroacetátu na chlorid byl olej, získaný po odpaření frakcí ze semipreparativní HPLC, čtyřikrát rozpuštěn do 0,1% kyseliny chlorovodíkové. Získaný olej s vyměněným aniontem po uložení do lednice do druhého dne

zkrystalizoval. Pokusy o difuzní rekrystalizaci ve směsích voda/acetón a voda/THF pro získání monokrystalu pro zjištění rentgenové struktury však byly prozatím neúspěšné.

## 5. Závěr

V této bakalářské práci byly peptidovým couplingem přes různě dlouhé řetězce spojeny chelatující jednotka vycházející z maltolu a trifénylfosfoniový kation za vzniku dvou cílových ligandů, látek **10** a **14**:



Obě syntézy byly několikrát úspěšně zreprodukovány a cílové látky izolovány a charakterizovány pomocí NMR spektroskopie. Prostup obou ligandů do mitochondrií buněk a jejich chování uvnitř mitochondrií bude dále zkoumáno v laboratoři metabolismu a bioenergetiky Ústavu biochemie, buněčné a molekulární biologie 3. Lékařské fakulty Univerzity Karlovy.



## 6. Literatura

- 1 D. S. Kalinowski and D. R. Richardson, The Evolution of Iron Chelators for the Treatment of Iron Overload Disease and Cancer, *Pharmacol Rev*, 2005, **57**, 547–583.
- 2 Y. Yu, E. Gutierrez, Z. Kovacevic, F. Saletta, P. Obeidy, Y. S. Rahmanto and D. R. Richardson, Iron Chelators for the Treatment of Cancer, *Current Medicinal Chemistry*, **19**, 2689–2702.
- 3 M. P. Murphy, Targeting lipophilic cations to mitochondria, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 2008, **1777**, 1028–1031.
- 4 B. Albers, D. Bray, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts and P. Walter, *Základy buněčné biologie úvod do molekulární biologie buňky*, Espero Publishing, vol. 2005.
- 5 G. J. Kontoghiorghes, Deferiprone and Iron–Maltol: Forty Years since Their Discovery and Insights into Their Drug Design, Development, Clinical Use and Future Prospects, *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, **24**, 4970.
- 6 G. J. Kontoghiorghes and C. N. Kontoghiorghes, Iron and Chelation in Biochemistry and Medicine: New Approaches to Controlling Iron Metabolism and Treating Related Diseases, *Cells*, 2020, **9**, 1456.
- 7 P. T. Lieu, M. Heiskala, P. A. Peterson and Y. Yang, The roles of iron in health and disease, *Molecular Aspects of Medicine*, 2001, **22**, 1–87.
- 8 C. Sandoval-Acuña, N. Torrealba, V. Tomkova, S. B. Jadhav, K. Blazkova, L. Merta, S. Lettlova, M. K. Adamcová, D. Rosel, J. Brábek, J. Neuzil, J. Stursa, L. Werner and J. Truksa, Targeting Mitochondrial Iron Metabolism Suppresses Tumor Growth and Metastasis by Inducing Mitochondrial Dysfunction and Mitophagy, *Cancer Research*, 2021, **81**, 2289–2303.
- 9 N. Abbaspour, R. Hurrell and R. Kelishadi, Review on iron and its importance for human health, *J Res Med Sci*, 2014, **19**, 164–174.
- 10 S. V. Torti and F. M. Torti, Iron and cancer: more ore to be mined, *Nat Rev Cancer*, 2013, **13**, 342–355.
- 11 J. P. Kehrer, The Haber–Weiss reaction and mechanisms of toxicity, *Toxicology*, 2000, **149**, 43–50.
- 12 V. Slaninová and A. Krejčí, Rakovinná buňka a změny jejího metabolismu: cesta k přežití i nástroj k destrukci.
- 13 I. A. Špírková, Diplomová práce, Univerzita Karlova, Praha, 2014.
- 14 A. Furst, *Chemistry of chelation in cancer*, Thomas, Springfield, Ill., 1963.
- 15 N. Mobarra, M. Shanaki, H. Ehteram, H. Nasiri, M. Sahmani, M. Saeidi, M. Goudarzi, H. Pourkarim and M. Azad, A Review on Iron Chelators in Treatment of Iron Overload Syndromes, *Int J Hematol Oncol Stem Cell Res*, 2016, **10**, 239–247.
- 16 D. R. Richardson, Potential of iron chelators as effective antiproliferative agents, *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 1997, **75**, 1164–1180.
- 17 F. Aouad, A. Florence, Y. Zhang, F. Collins, C. Henry, R. J. Ward and R. R. Crichton, Evaluation of new iron chelators and their therapeutic potential, *Inorganica Chimica Acta*, 2002, **339**, 470–480.
- 18 C. Hershko, A. Abrahamov, A. M. Konijn, W. Breuer, I. Z. Cabantchik, P. Pootrakul and G. Link, Objectives and Methods of Iron Chelation Therapy, *Bioinorg Chem Appl*, 2003, **1**, 151–168.

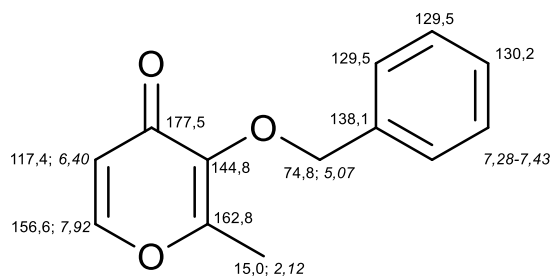
- 19 R. Y. P. Alta, H. A. Vitorino, D. Goswami, M. Terêsa Machini and B. P. Espósito, Triphenylphosphonium-desferrioxamine as a candidate mitochondrial iron chelator, *Biometals*, 2017, **30**, 709–718.
- 20 D. Richardson, E. Tran and P. Ponka, The potential of iron chelators of the pyridoxal isonicotinoyl hydrazone class as effective antiproliferative agents, *Blood*, 1995, **86**, 4295–4306.
- 21 R. J. Bergeron and S. J. Kline, Short synthesis of parabactin, *J. Am. Chem. Soc.*, 1982, **104**, 4489–4492.
- 22 J. B. NEILANDS, T. PETERSON and S. A. LEONG, in *Inorganic Chemistry in Biology and Medicine*, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, 1980, vol. 140, pp. 263–278.
- 23 M. J. M. Campbell, Transition metal complexes of thiosemicarbazide and thiosemicarbazones, *Coordination Chemistry Reviews*, 1975, **15**, 279–319.
- 24 D. S. Kalinowski, P. Quach and D. R. Richardson, Thiosemicarbazones: the new wave in cancer treatment, *Future Medicinal Chemistry*, 2009, **1**, 1143–1151.
- 25 F. Mattioli, M. Puntoni, V. Marini, C. Fucile, G. Milano, L. Robbiano, S. Perrotta, V. Pinto, A. Martelli and G. L. Forni, Determination of deferasirox plasma concentrations: do gender, physical and genetic differences affect chelation efficacy?, *European Journal of Haematology*, 2015, **94**, 310–317.
- 26 F. Waldmeier, G. J. Bruin, U. Glaenzel, K. Hazell, R. Sechaud, S. Warrington and J. B. Porter, Pharmacokinetics, Metabolism, and Disposition of Deferasirox in  $\beta$ -Thalassemic Patients with Transfusion-Dependent Iron Overload Who Are at Pharmacokinetic Steady State, *Drug Metab Dispos*, 2010, **38**, 808–816.
- 27 G. J. Kontoghiorghes and R. W. Evans, Site specificity of iron removal from transferrin by  $\alpha$ -ketohydroxypyridine chelators, *FEBS Letters*, 1985, **189**, 141–144.
- 28 S. A. Mukha, I. A. Antipova, S. A. Medvedeva, V. V. Saraev, L. I. Larina, A. V. Tsyrenzhapov and B. G. Sukhov, Synthesis and Properties of Metal Chelates Based on Natural  $\gamma$ -Pyrone Maltol.
- 29 T. Shibamoto and L. F. Bjeldanes, in *Introduction to Food Toxicology*, eds. T. Shibamoto and L. F. Bjeldanes, Academic Press, San Diego, 1993, pp. 67–96.
- 30 E. Cini, G. Crisponi, A. Fantasia, R. Cappai, S. Siciliano, G. D. Florio, V. M. Nurchi and M. Corsini, Multipurpose Iron-Chelating Ligands Inspired by Bioavailable Molecules, *Biomolecules*, 2024, **14**, 92.
- 31 MestReNova, version 14.1.1-24571, Mestrelab Research S.L., 2019.
- 32 R. Cappai, K. Chand, J. I. Lachowicz, S. Chaves, L. Gano, G. Crisponi, V. M. Nurchi, M. Peana, M. A. Zoroddu and M. A. Santos, A new tripodal-3-hydroxy-4-pyridinone for iron and aluminium sequestration: synthesis, complexation and in vivo studies, *New J. Chem.*, 2018, **42**, 8050–8061.
- 33 Z. Hu, Y. Sim, O. L. Kon, W. H. Ng, A. J. M. Ribeiro, M. J. Ramos, A. Fernandes, R. Ganguly, B. Xing, F. García and E. K. L. Yeow, Unique Triphenylphosphonium Derivatives for Enhanced Mitochondrial Uptake and Photodynamic Therapy, *Bioconjugate Chem.*, 2017, **28**, 590–599.
- 34 J. Pliquett, S. Amor, M. Ponce-Vargas, M. Laly, C. Racœur, Y. Rousselin, F. Denat, A. Bettaïeb, P. Fleurat-Lessard, C. Paul, C. Goze and E. Bodio, Design of a multifunctionalizable BODIPY platform for the facile elaboration of a large series of gold(I)-based optical theranostics, *Dalton Trans.*, 2018, **47**, 11203–11218.

- 35 Y. Mawani, J. F. Cawthray, S. Chang, K. Sachs-Barrable, D. M. Weekes, K. M. Wasan and C. Orvig, In vitro studies of lanthanide complexes for the treatment of osteoporosis, *Dalton Trans.*, 2013, **42**, 5999–6011.
- 36 P. S. Dobbin, R. C. Hider, A. D. Hall, P. D. Taylor, P. Sarpong, J. B. Porter, G. Xiao and D. van der Helm, Synthesis, physicochemical properties, and biological evaluation of N-substituted 2-alkyl-3-hydroxy-4(1H)-pyridinones: orally active iron chelators with clinical potential, *J. Med. Chem.*, 1993, **36**, 2448–2458.
- 37 T. Carnelley, *Physico-chemical constants. Melting and boiling point tables*, Harrison and Sons, London, 1885-87.
- 38 P. Davison, *Directory of Solvents*, Blackie Academic & Professional, 1996.

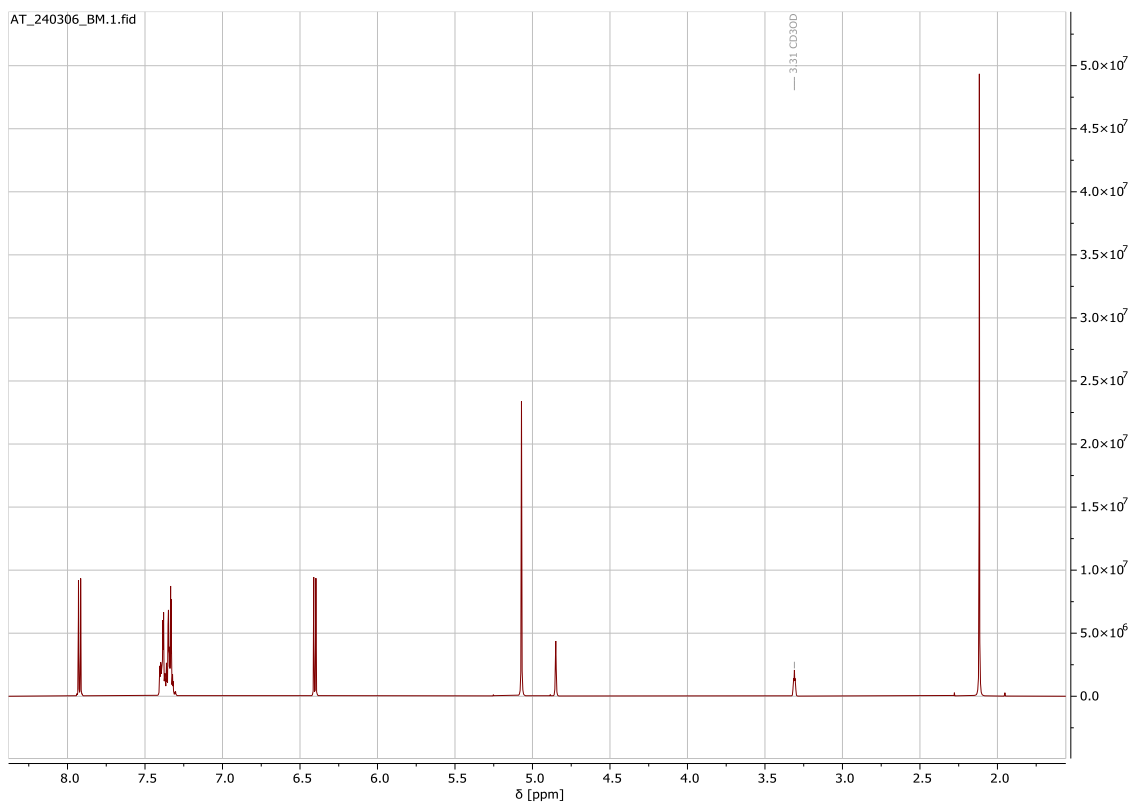
# Přílohy

NMR spektra všech látek syntetizovaných v této práci. V obrázcích u struktur jsou uváděny posuny z  $^{13}\text{C}$  NMR a  $^1\text{H}$  NMR (uváděno kurzívou) v jednotkách ppm.

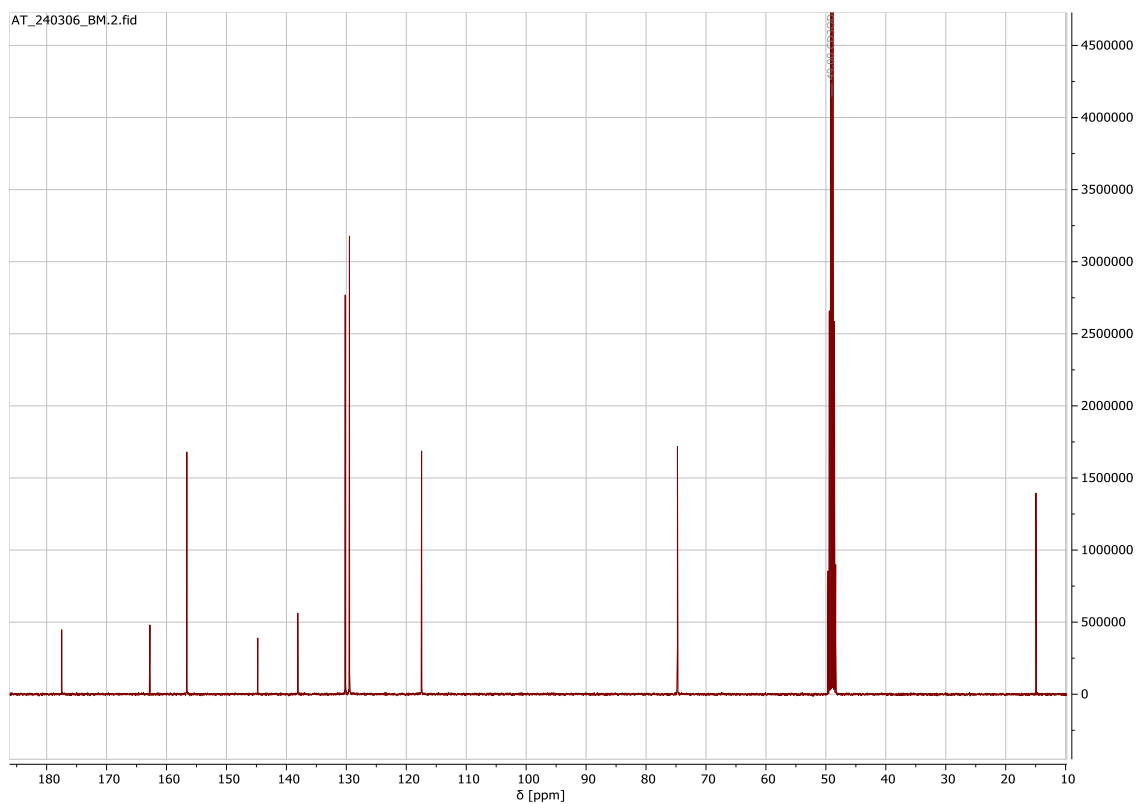
## Příloha 1 – NMR spektra látky 3



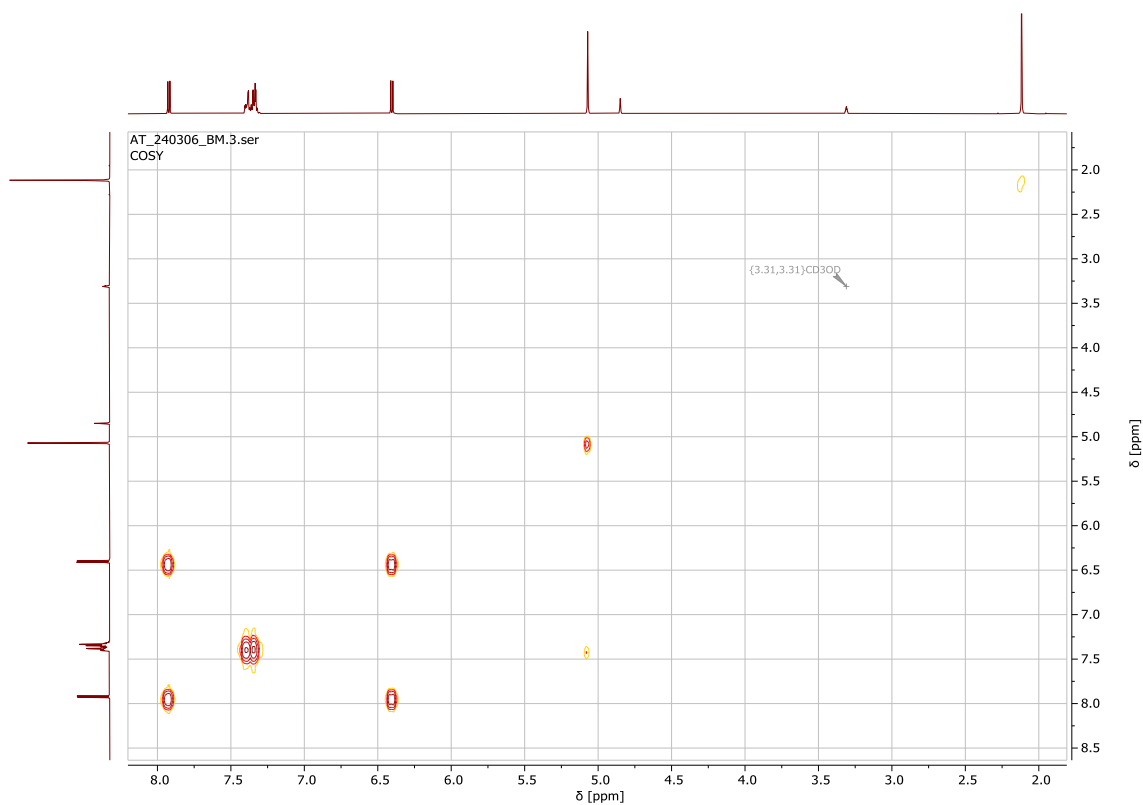
Obrázek 12 – Struktura bynzymaltolu, látky 3 s  $^1\text{H}$  (kurzívou) a  $^{13}\text{C}$  posuny v jednotkách ppm.



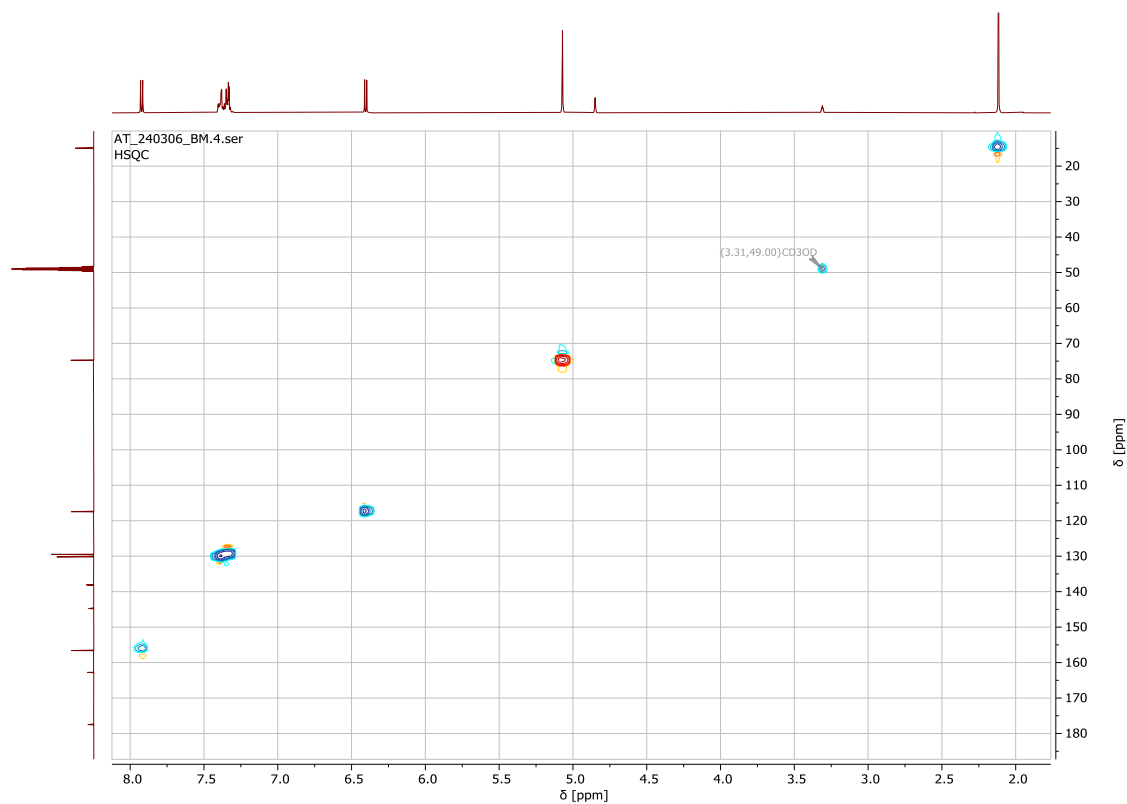
Obrázek 13 -  $^1\text{H}$  NMR spektrum látky 3, rozpouštědlo MeOD.



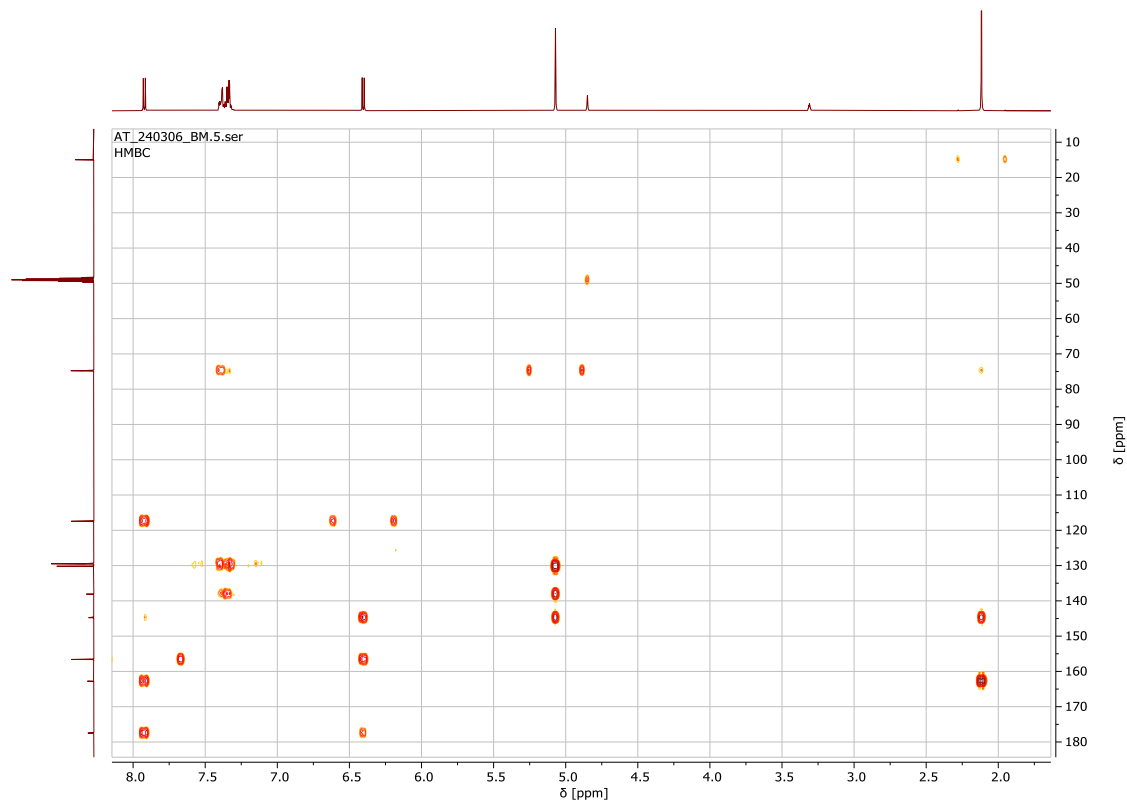
Obrázek 14 -  $^{13}\text{C}$  NMR spektrum látky **3**, rozpouštědlo MeOD.



Obrázek 15 - COSY NMR spektrum látky **3**, rozpouštědlo MeOD.

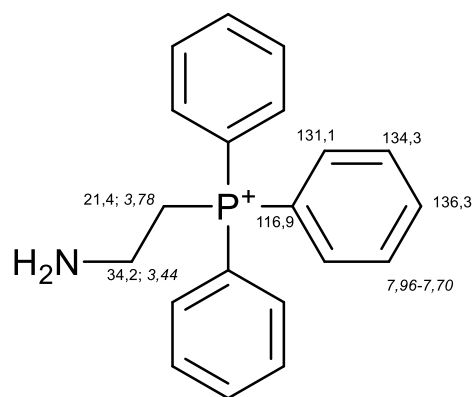


Obrázek 16 - HSQC NMR spektrum látky **3**, rozpouštědlo MeOD.

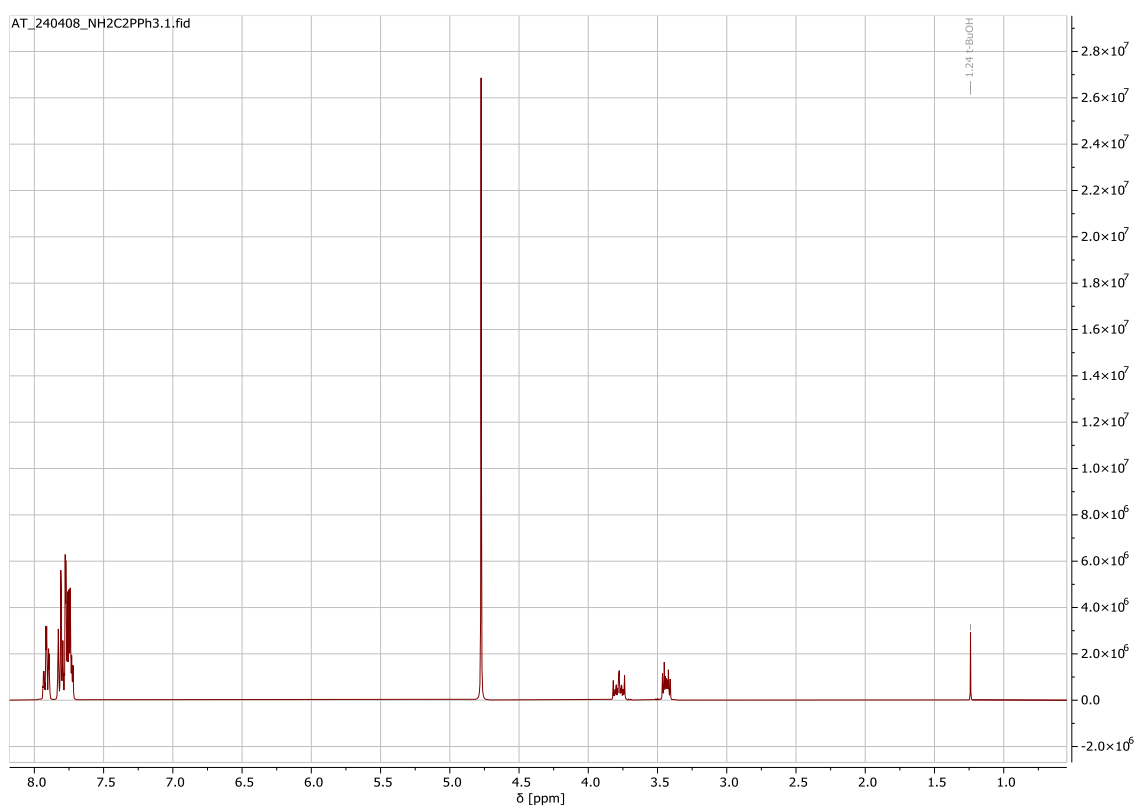


Obrázek 17 - HMBC NMR spektrum látky **3**, rozpouštědlo MeOD.

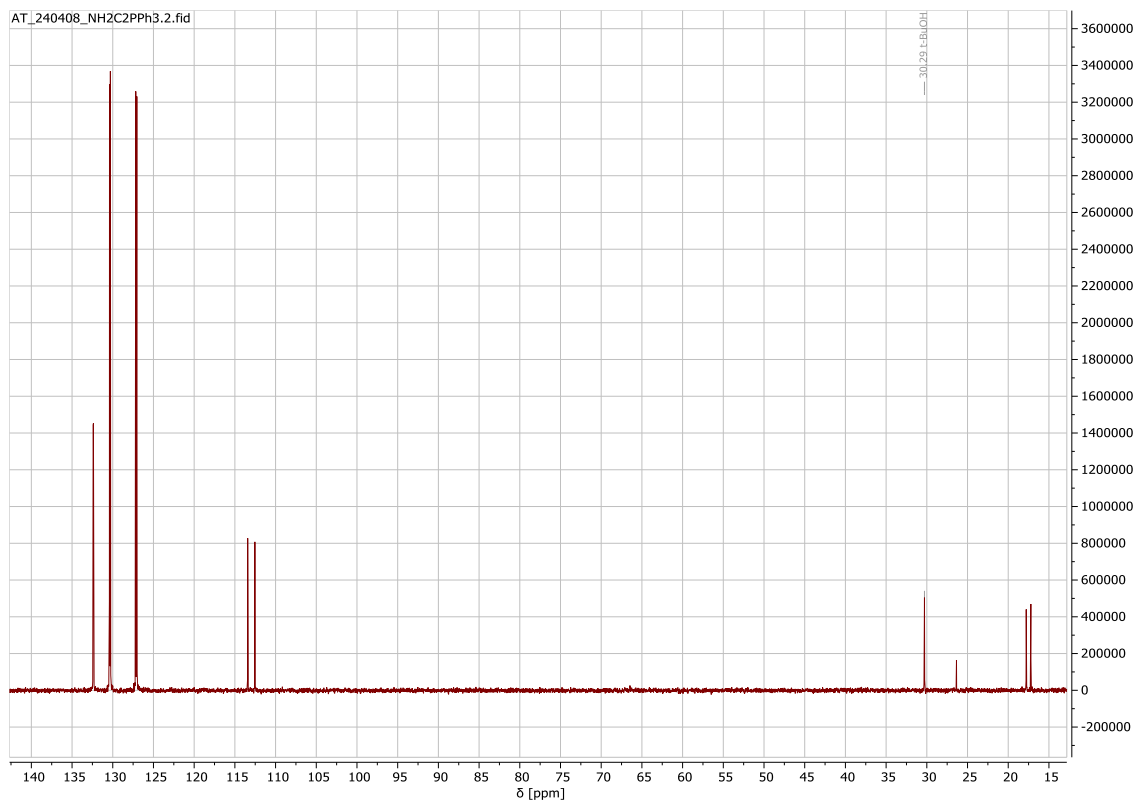
## Příloha 2 – NMR spektra látky 6



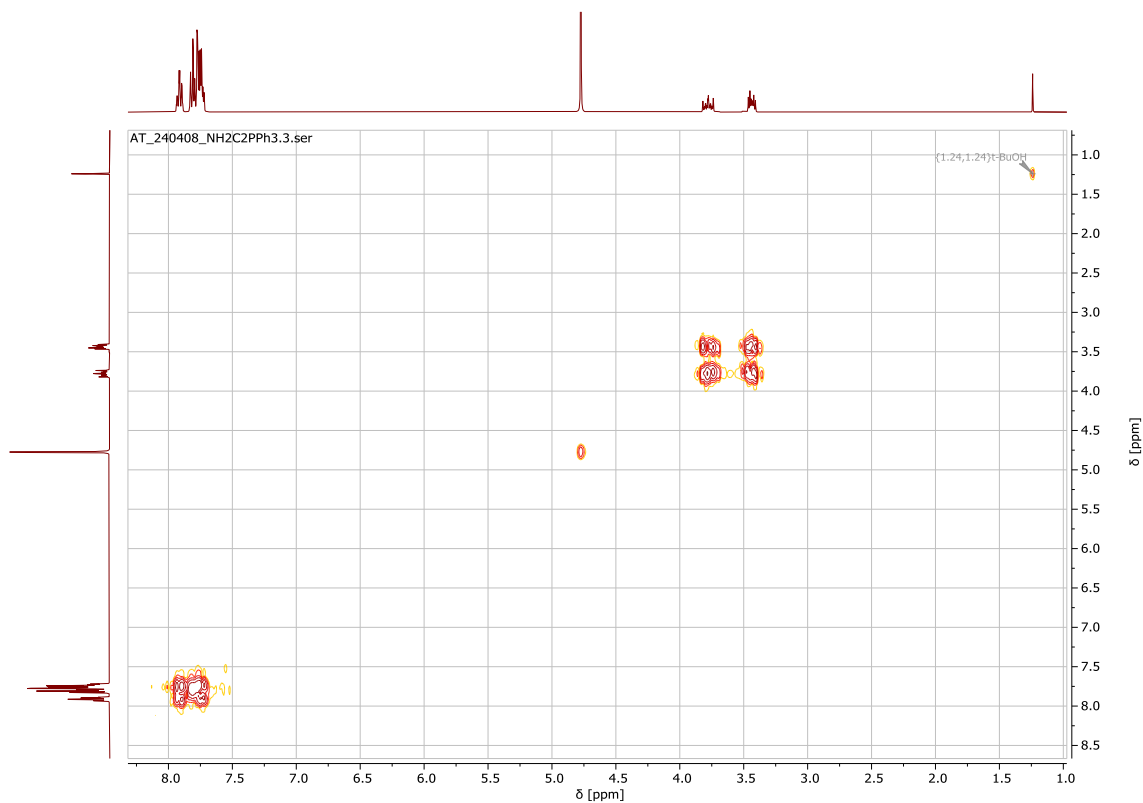
Obrázek 18 - Struktura látky 6 s <sup>1</sup>H (kurzivou) a <sup>13</sup>C posuny v jednotkách ppm.



Obrázek 19 - <sup>1</sup>H NMR spektrum látky 6, rozpouštědlo D<sub>2</sub>O.

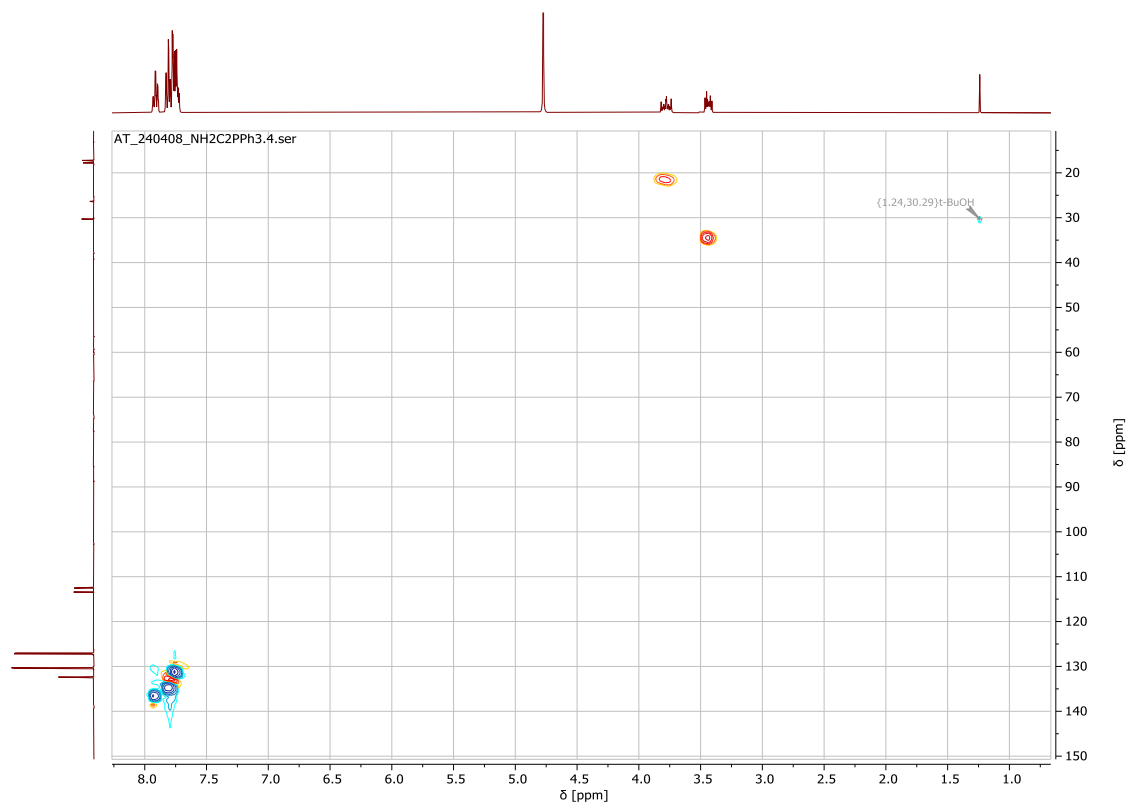


Obrázek 20 -  $^{13}\text{C}$  NMR spektrum látky **6**, rozpouštědlo  $\text{D}_2\text{O}$ .

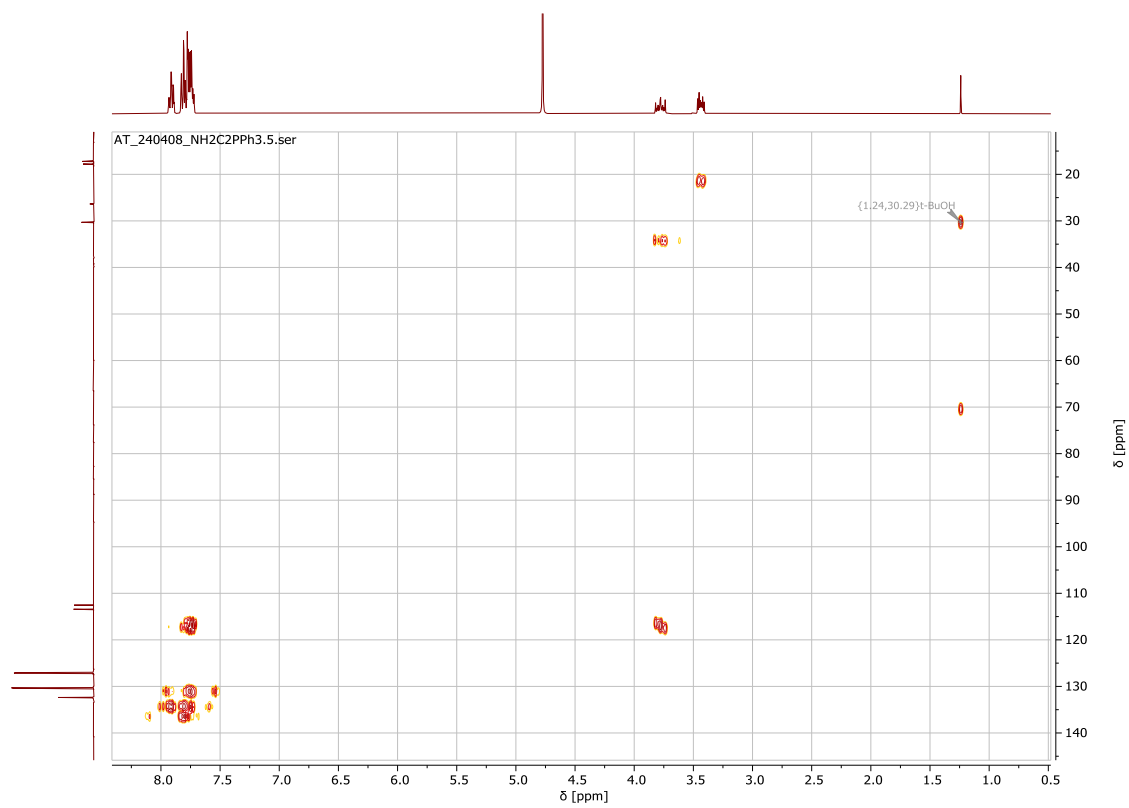


Obrázek 21 - COSY NMR spektrum látky **6**, rozpouštědlo  $\text{D}_2\text{O}$ .



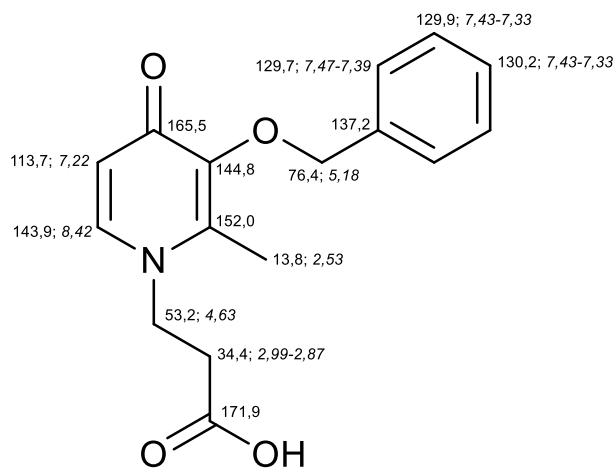


Obrázek 22 - HSQC NMR spektrum látky **6**, rozpouštědlo D<sub>2</sub>O.

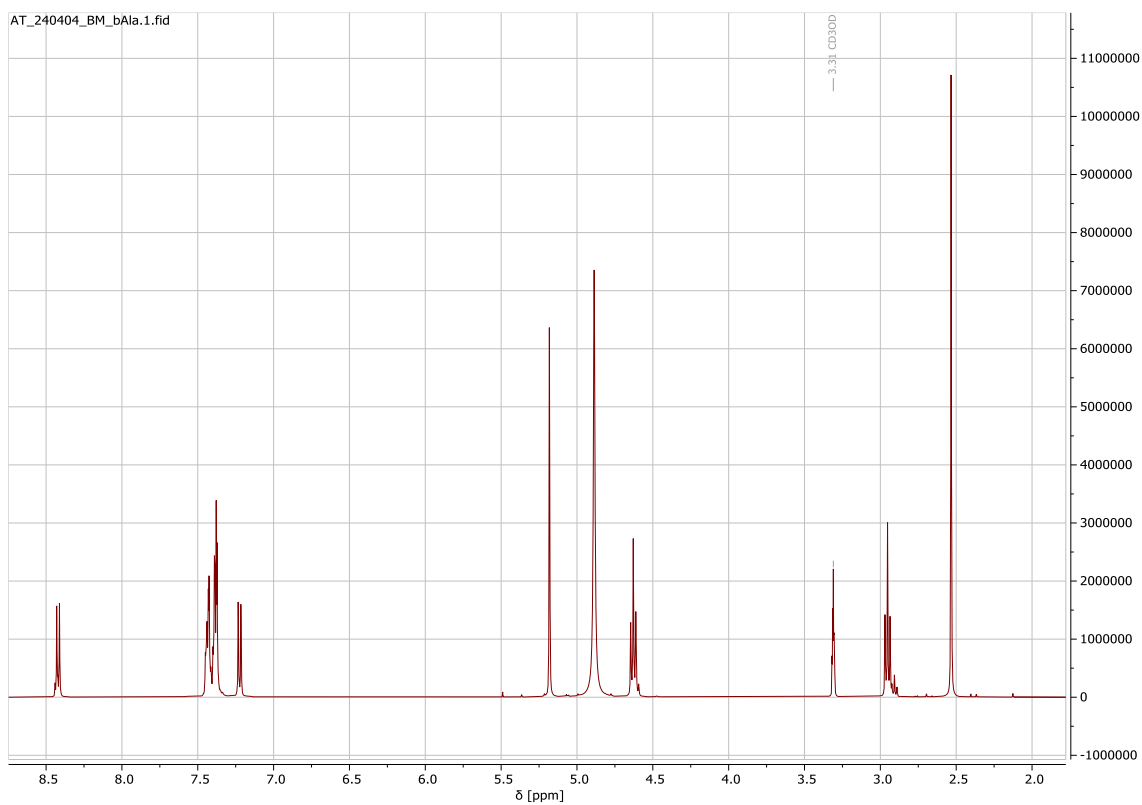


Obrázek 23 - HMBC NMR spektrum látky **6**, rozpouštědlo D<sub>2</sub>O.

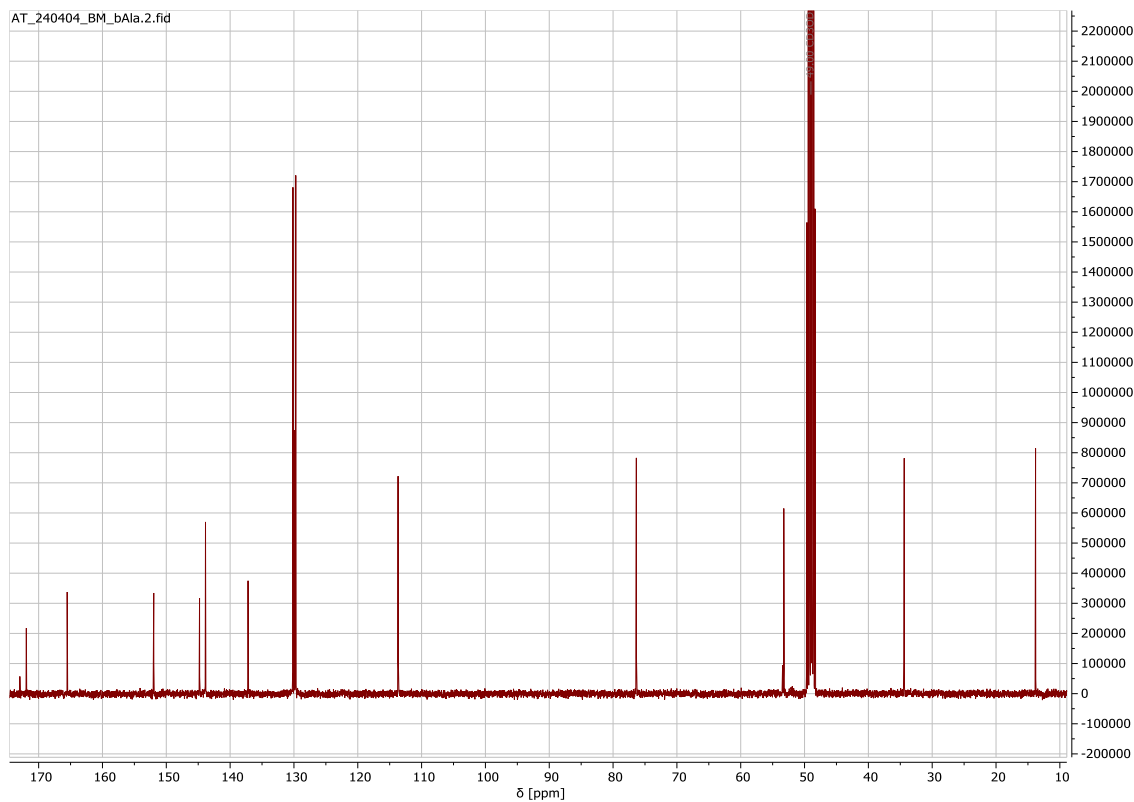
## Příloha 3 – NMR spektra látky 8



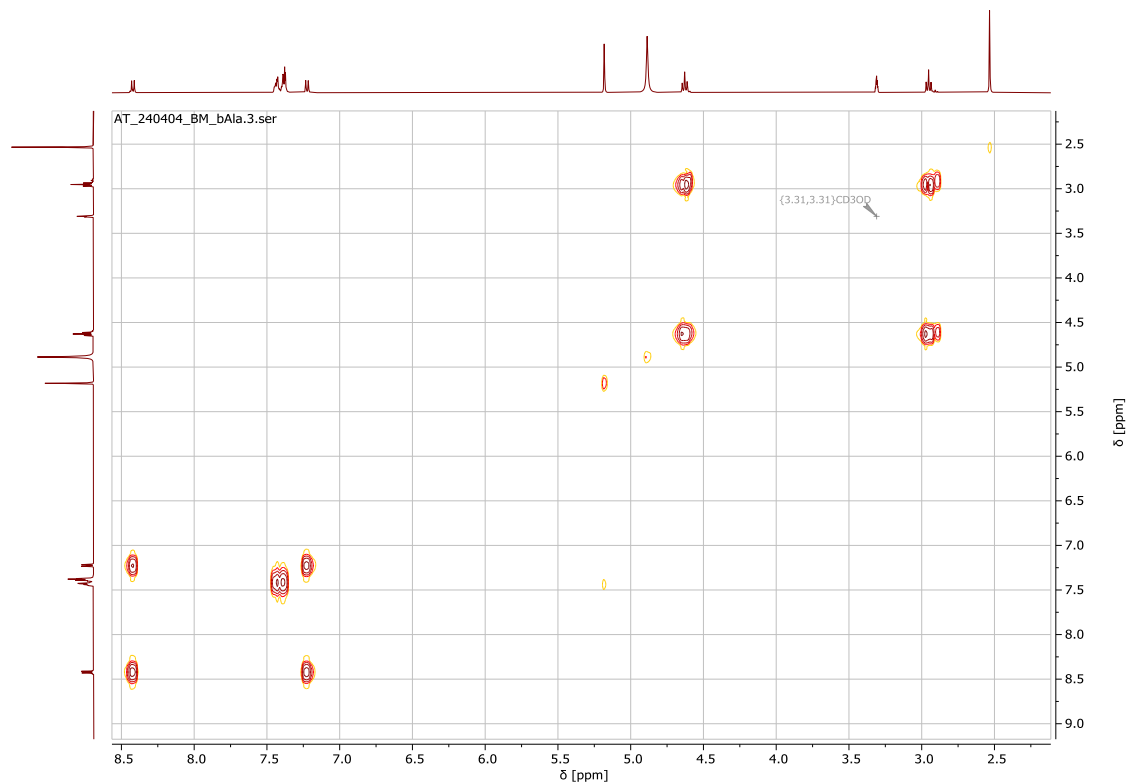
Obrázek 24 - Struktura látky 8 s  $^1\text{H}$  (kurzivou) a  $^{13}\text{C}$  posuny v jednotkách ppm.



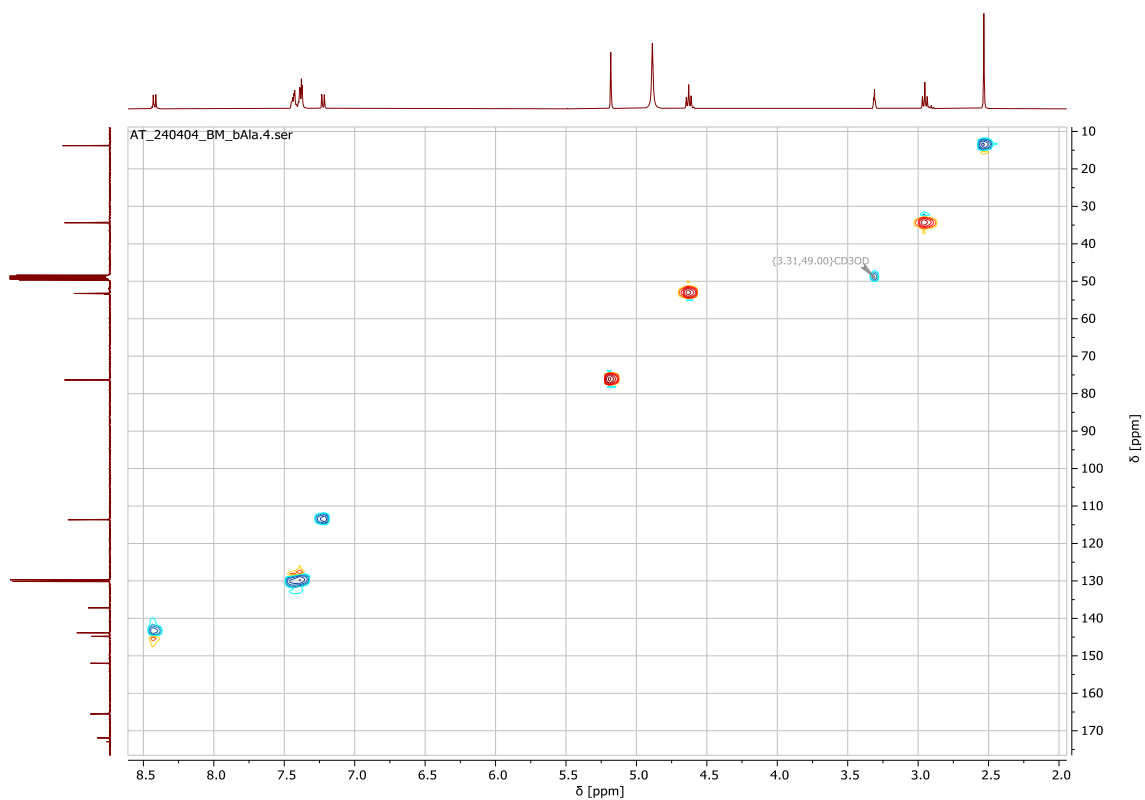
Obrázek 25 -  $^1\text{H}$  NMR spektrum látky 8, rozpouštědlo MeOD.



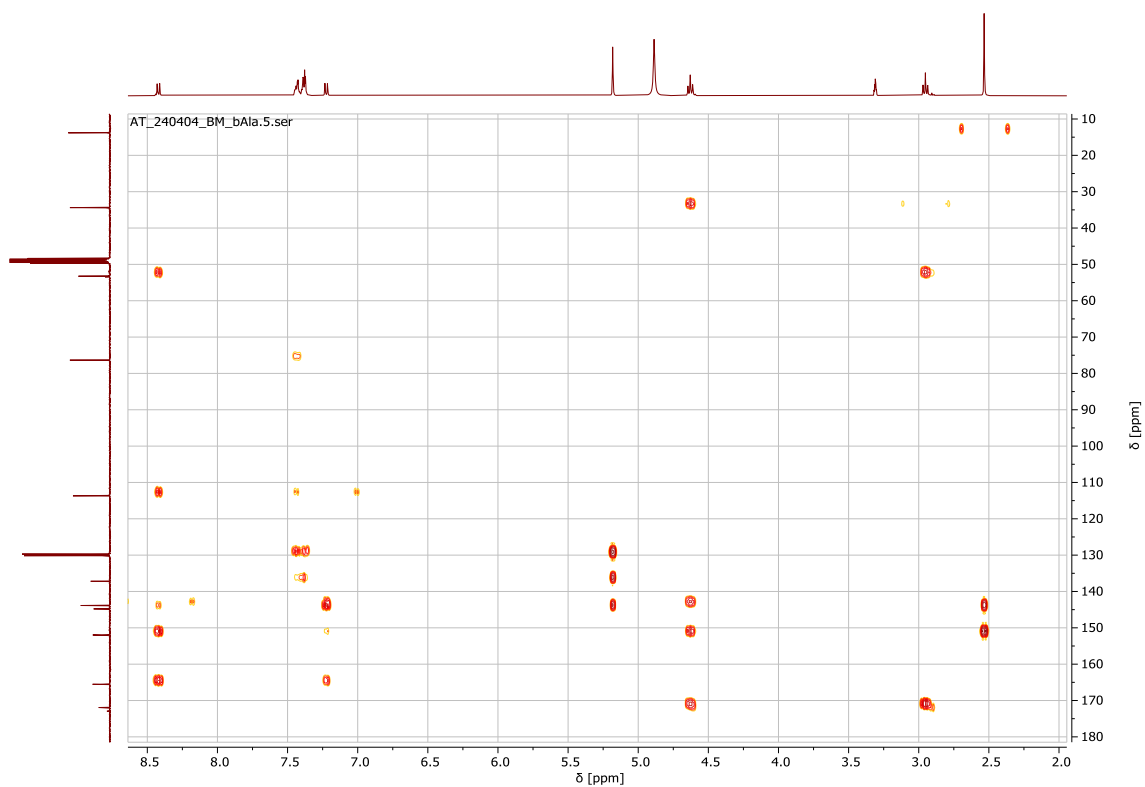
Obrázek 26 -  $^{13}\text{C}$  NMR spektrum látky **8**, rozpouštědlo MeOD.



Obrázek 27 - COSY NMR spektrum látky **8**, rozpouštědlo MeOD

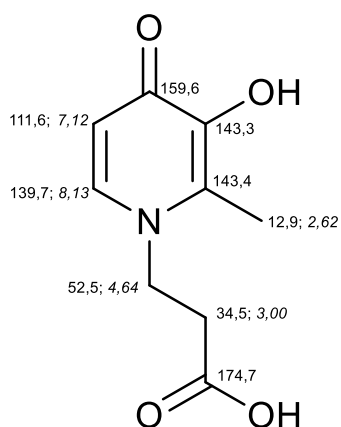


Obrázek 28 - HSQC NMR spektrum látky **8**, rozpouštědlo MeOD.

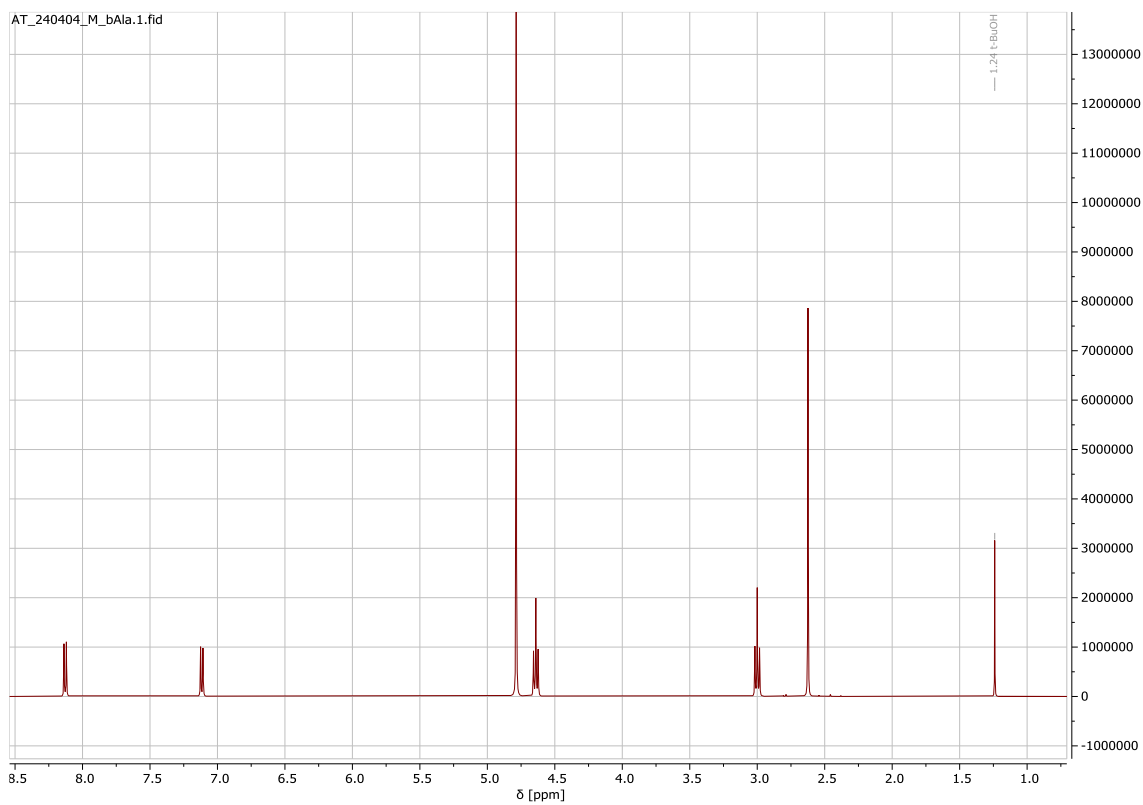


Obrázek 29 - HMBC NMR spektrum látky **8**, rozpouštědlo MeOD.

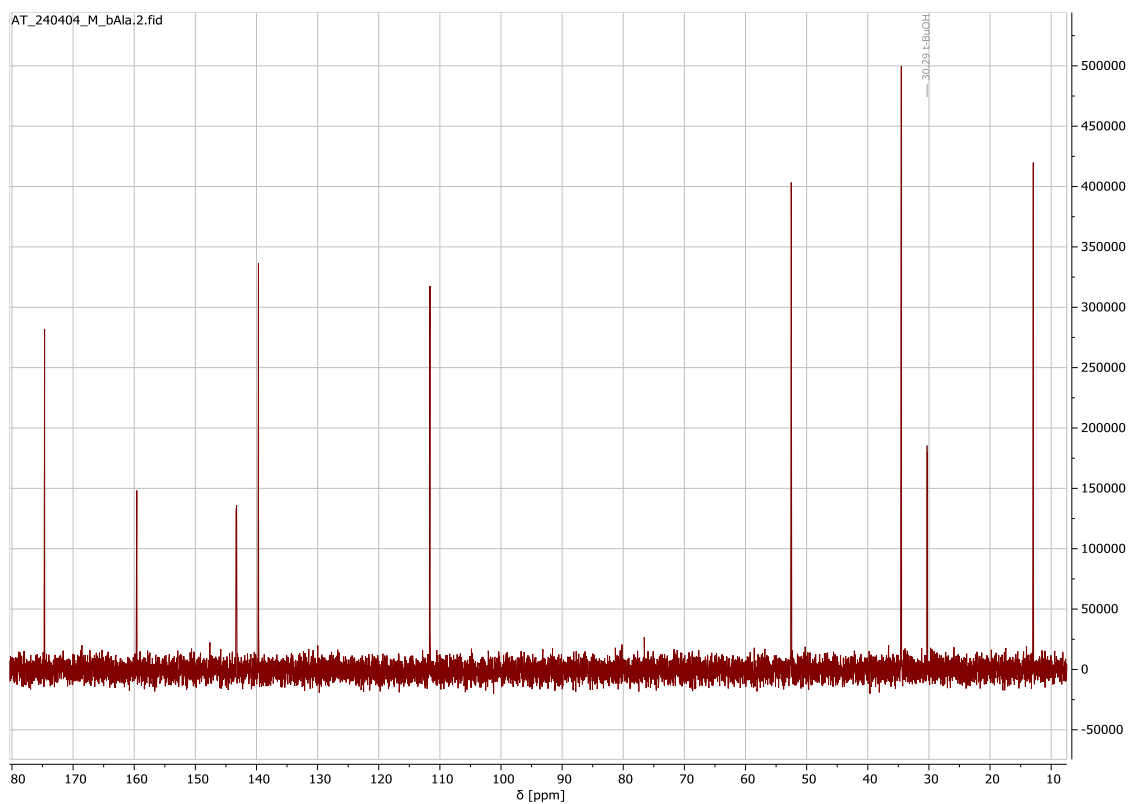
## Příloha 4 – NMR spektra látky 9



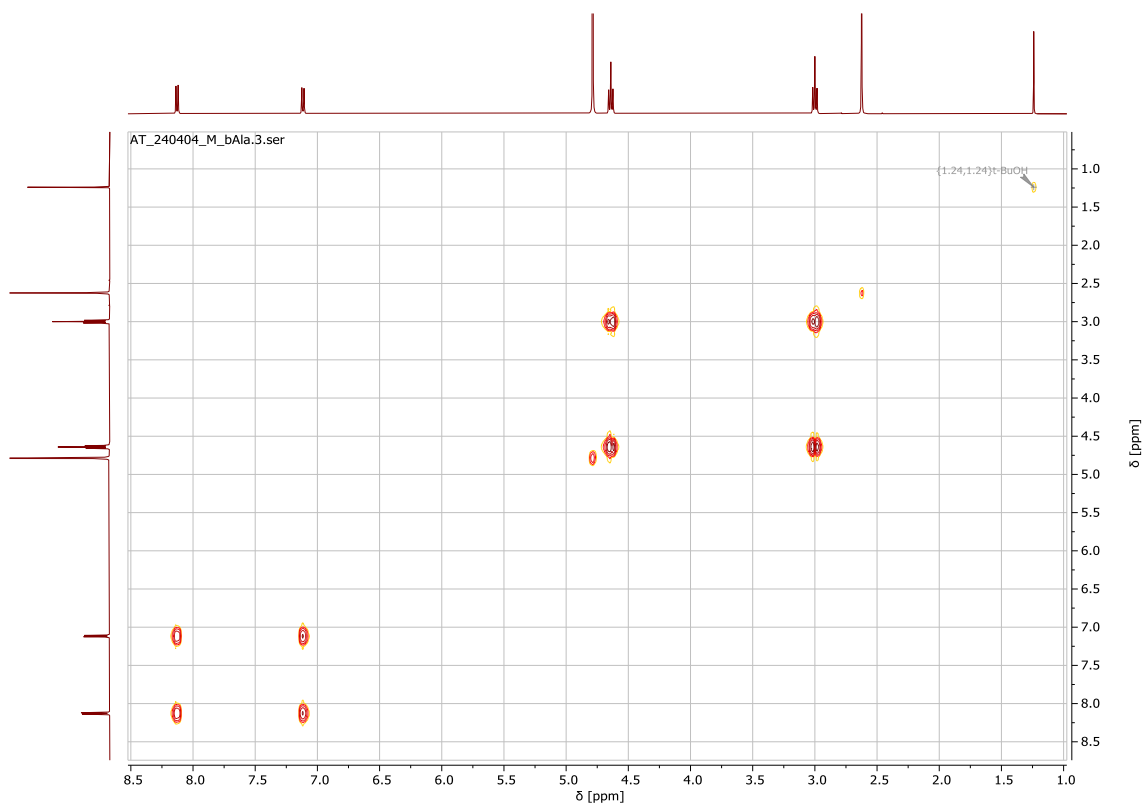
Obrázek 30 - Struktura látky 9 s  $^1\text{H}$  (kurzívou) a  $^{13}\text{C}$  posuny v jednotkách ppm.



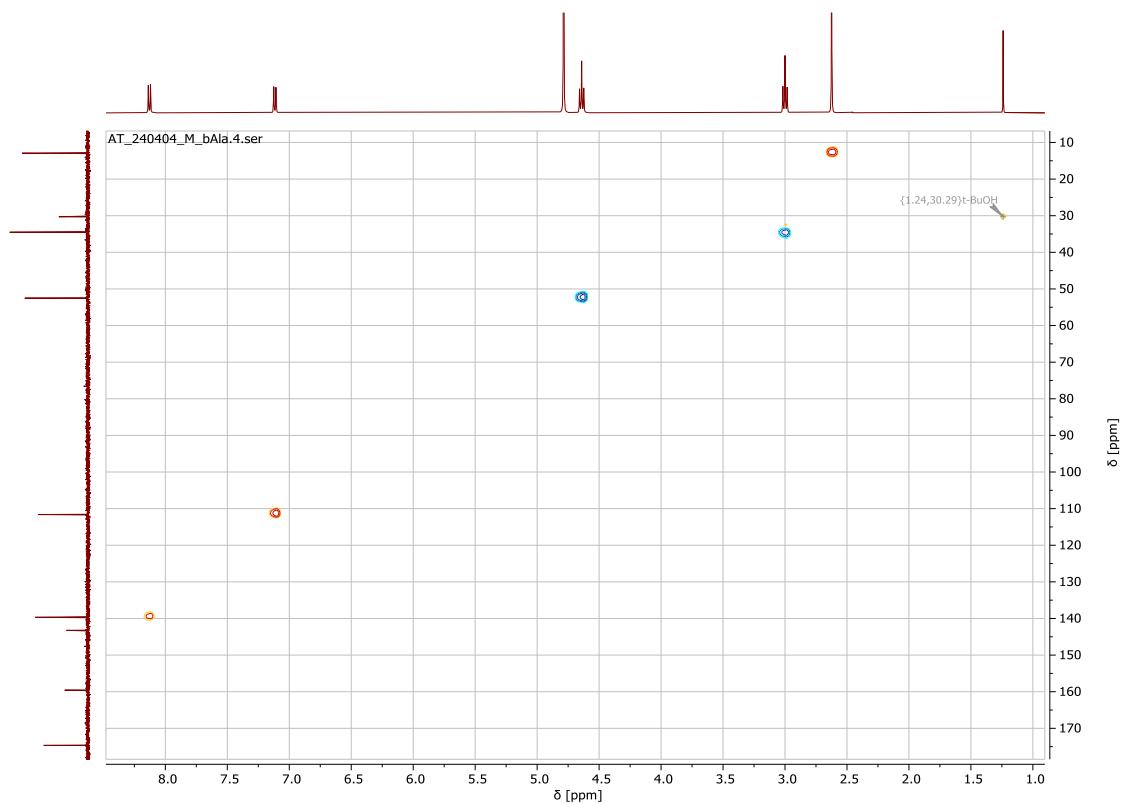
Obrázek 31 -  $^1\text{H}$  NMR spektrum látky 9, rozpouštědlo  $\text{D}_2\text{O}$ .



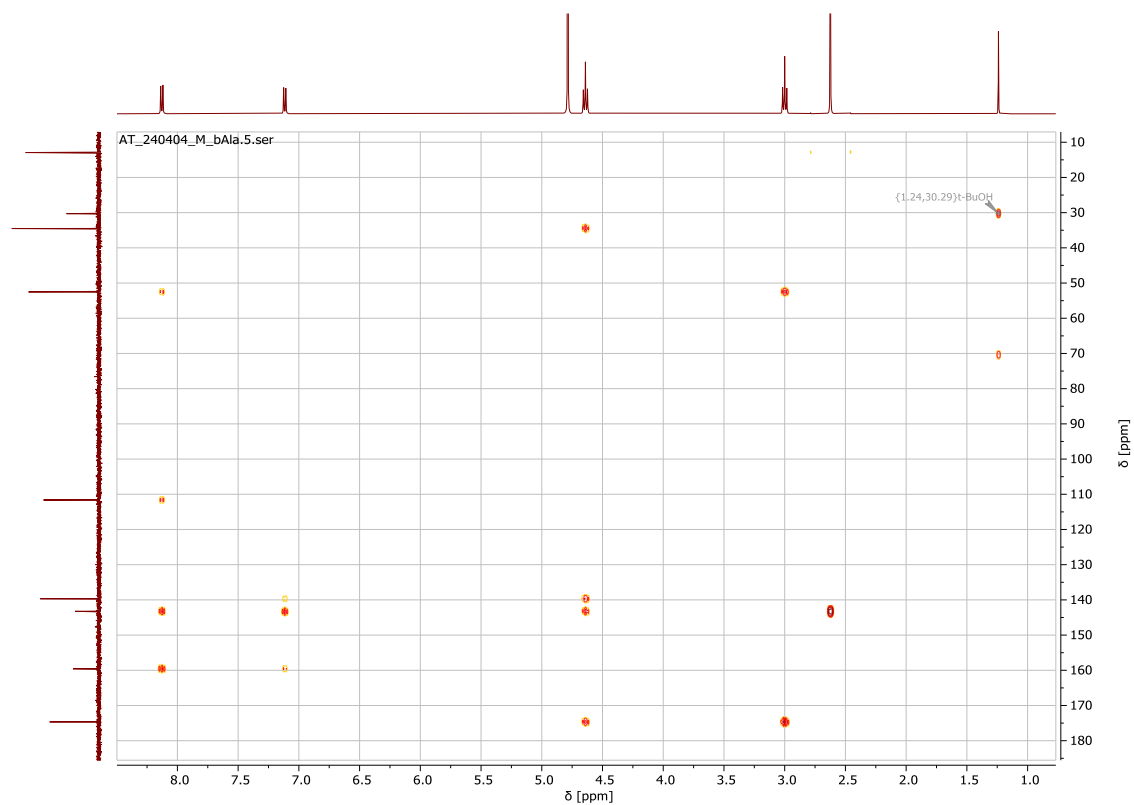
Obrázek 32 -  $^{13}\text{C}$  NMR spektrum látky **9**, rozpouštědlo  $\text{D}_2\text{O}$ .



Obrázek 33 - COSY NMR spektrum látky **9**, rozpouštědlo  $\text{D}_2\text{O}$ .

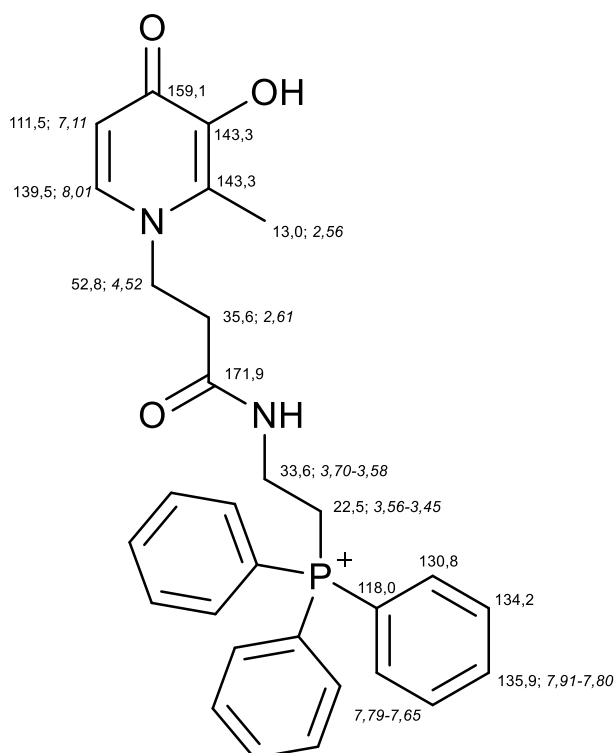


Obrázek 34 - HSQC NMR spektrum látky **9**, rozpouštědlo D<sub>2</sub>O.

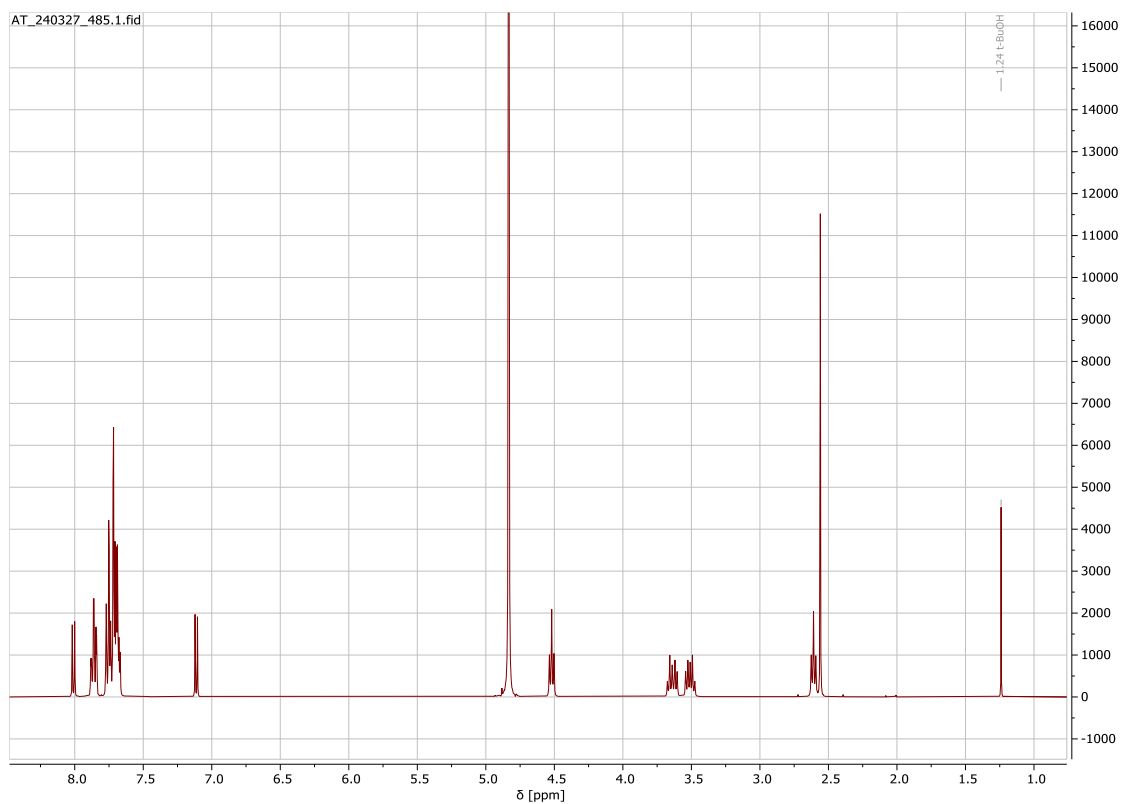


Obrázek 35 - HMBC NMR spektrum látky **9**, rozpouštědlo D<sub>2</sub>O.

## Příloha 5 – NMR spektra látky 10

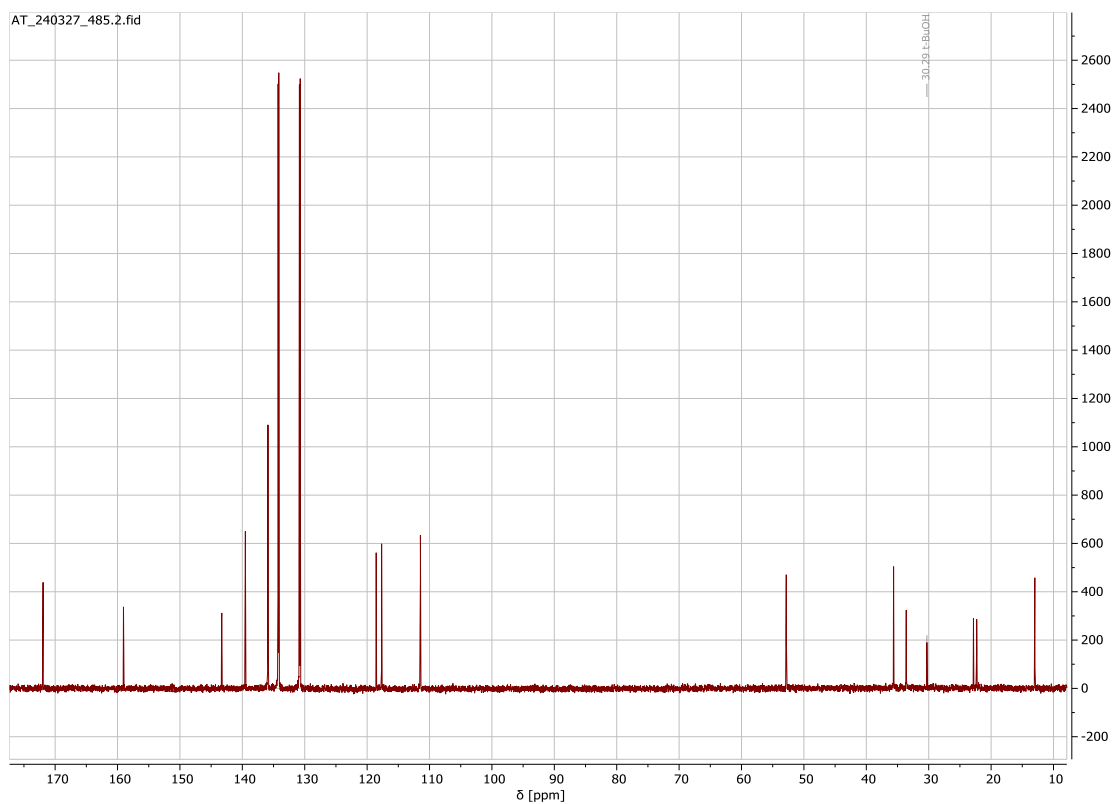


Obrázek 36 - Struktura látky 10 s  $^1\text{H}$  (kurzívou) a  $^{13}\text{C}$  posuny v jednotkách ppm.

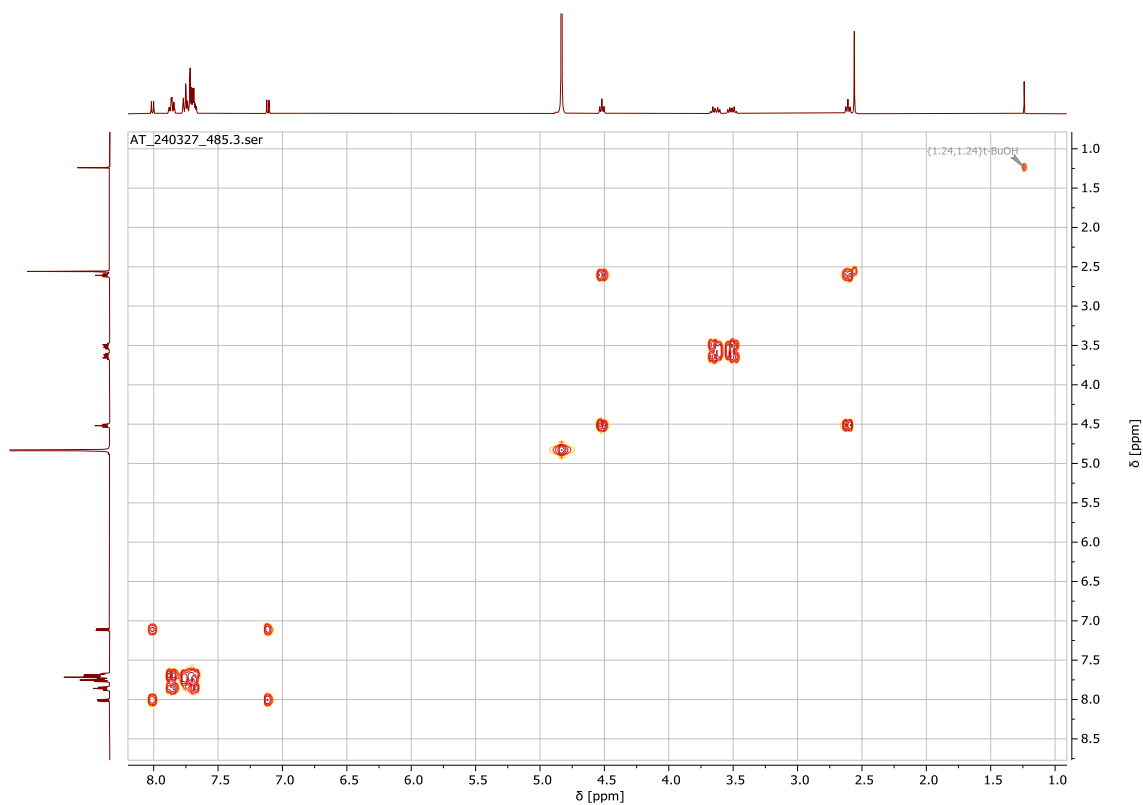


Obrázek 37 -  $^1\text{H}$  NMR spektrum látky 10, rozpouštědlo  $\text{D}_2\text{O}$ .

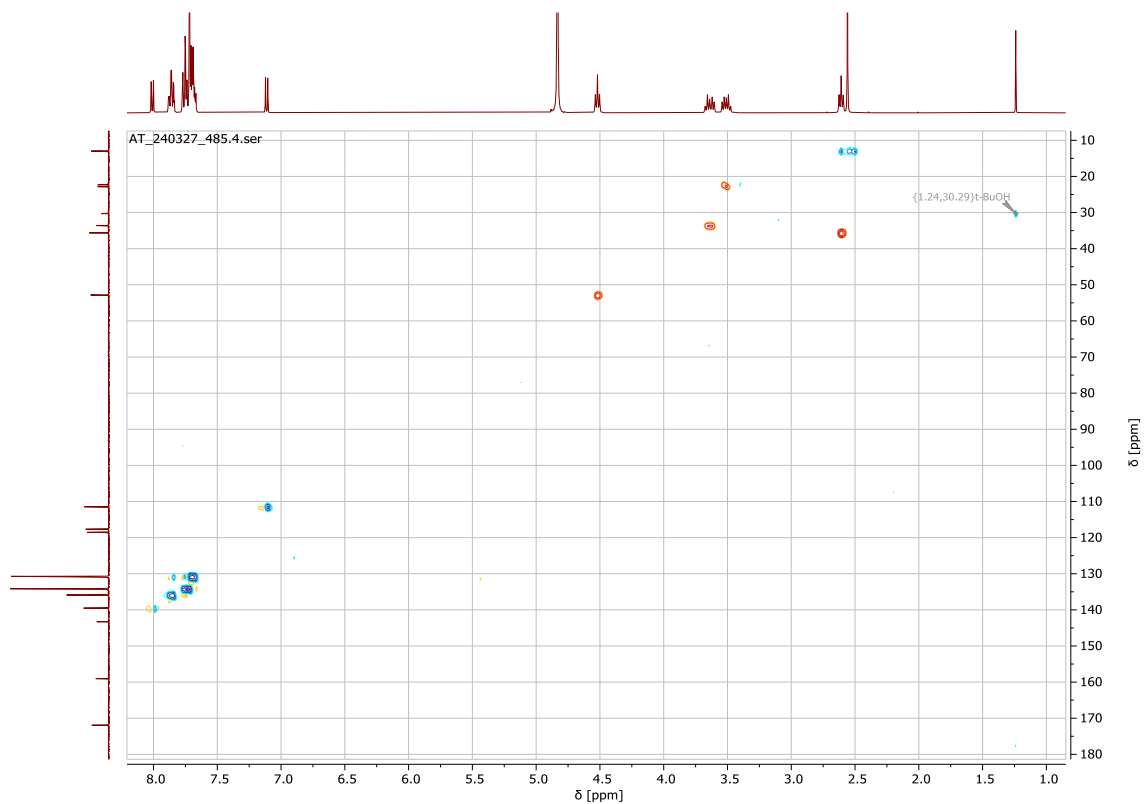




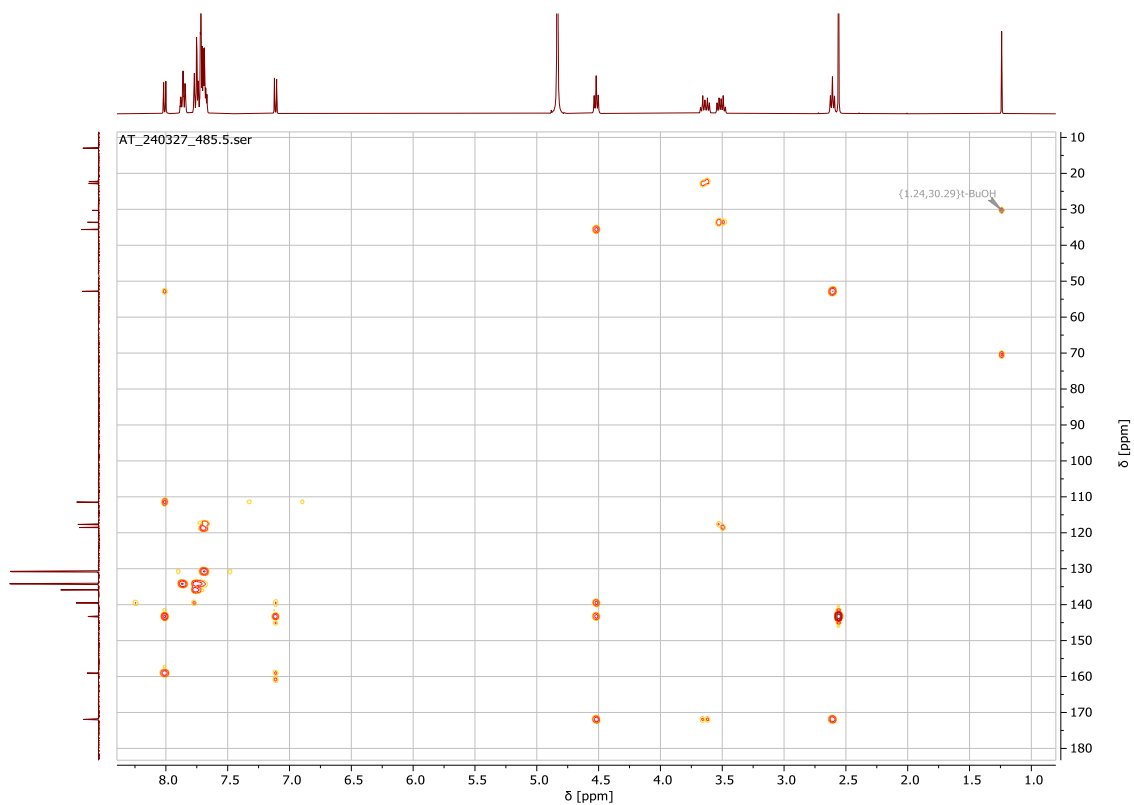
Obrázek 38 -  $^{13}\text{C}$  NMR spektrum látky **10**, rozpouštědlo  $\text{D}_2\text{O}$ .



Obrázek 39 - COSY NMR spektrum látky **10**, rozpouštědlo  $\text{D}_2\text{O}$ .

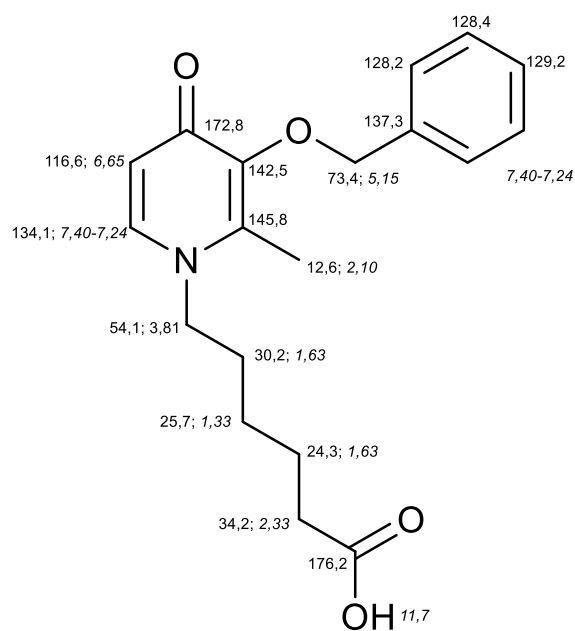


Obrázek 40 - HSQC NMR spektrum látky **10**, rozpouštědlo D<sub>2</sub>O.

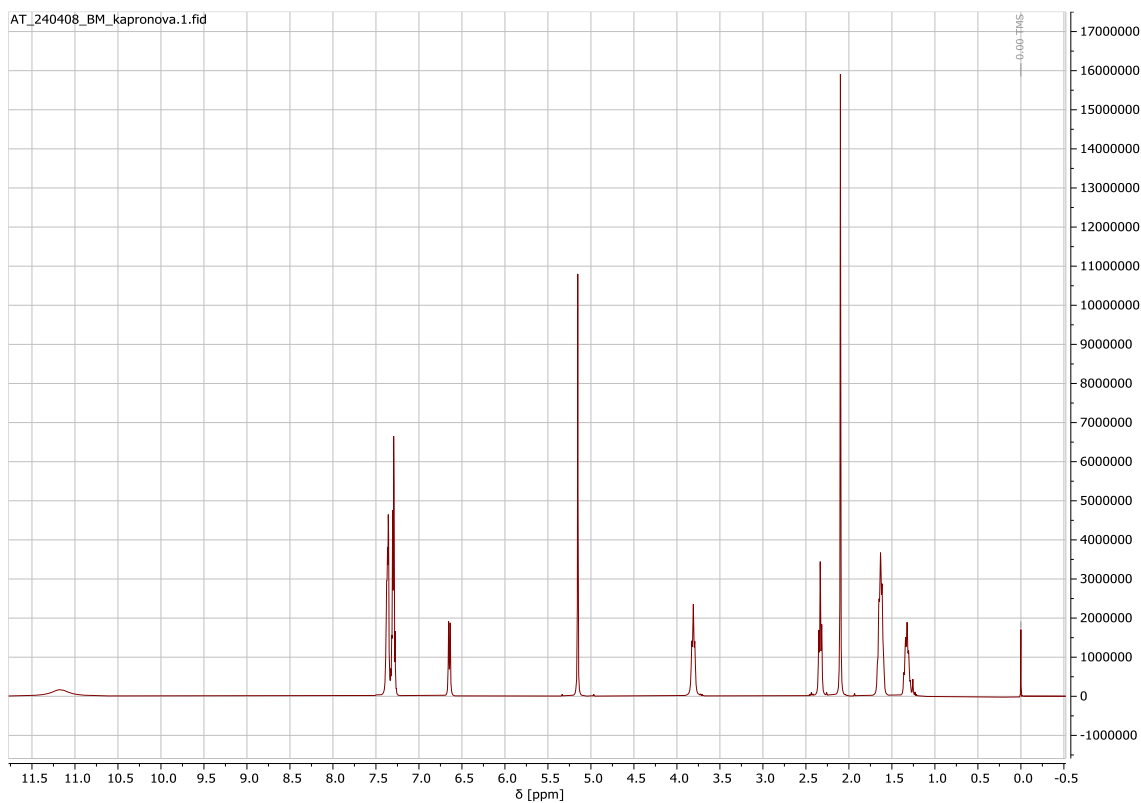


Obrázek 41 - HMBC NMR spektrum látky **10**, rozpouštědlo D<sub>2</sub>O.

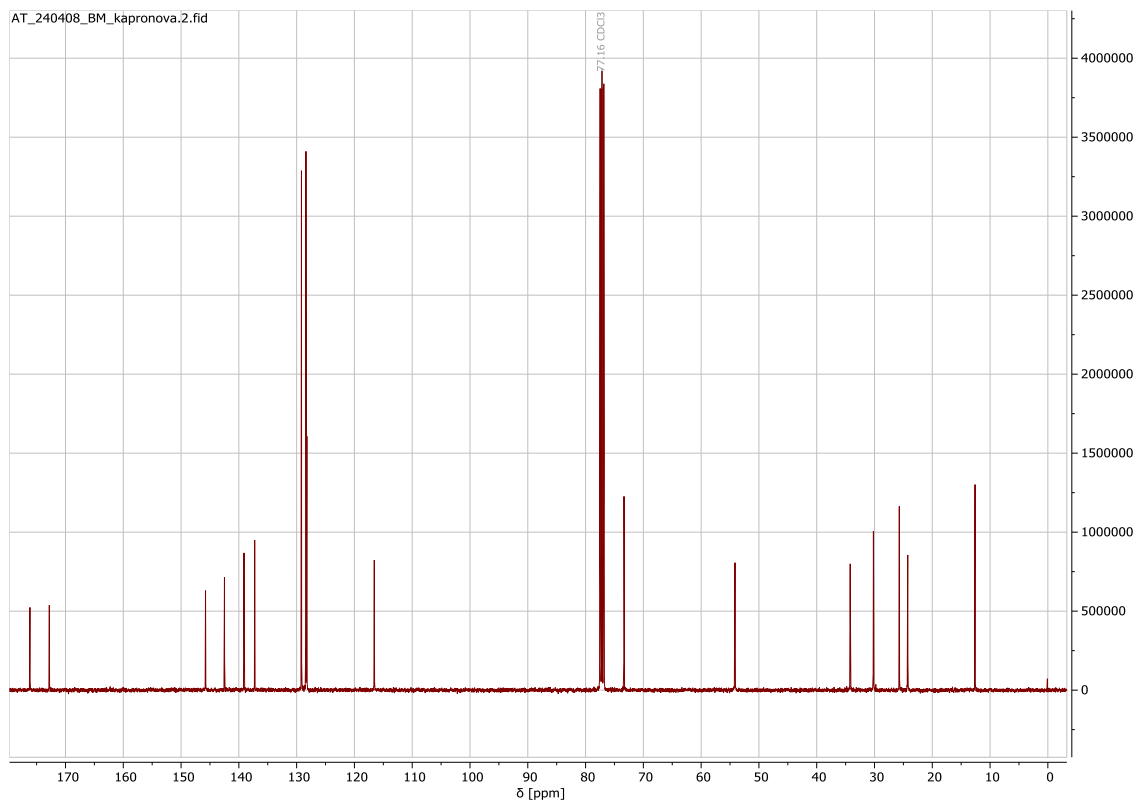
## Příloha 6 – NMR spektra látky 12



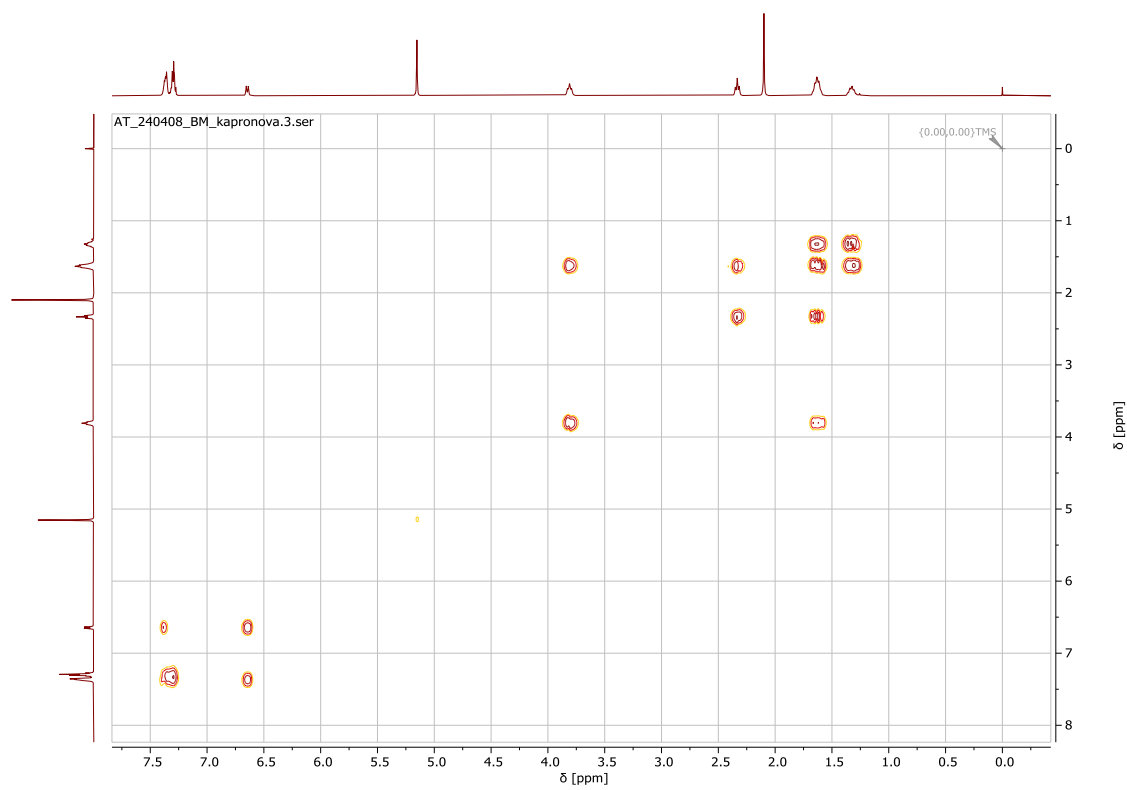
Obrázek 42 - Struktura látky 12 s  $^1\text{H}$  (kurzívou) a  $^{13}\text{C}$  posuny v jednotkách ppm.



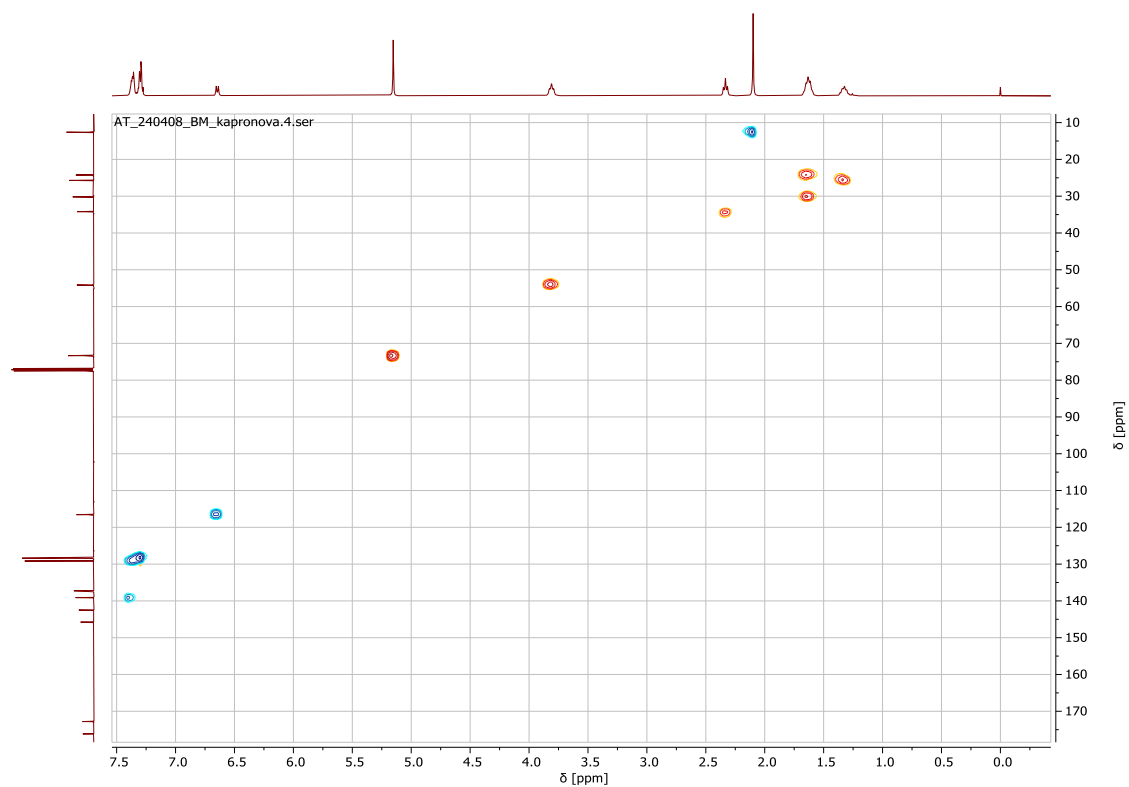
Obrázek 43 -  $^1\text{H}$  NMR spektrum látky 12, rozpouštědlo  $\text{CDCl}_3$ .



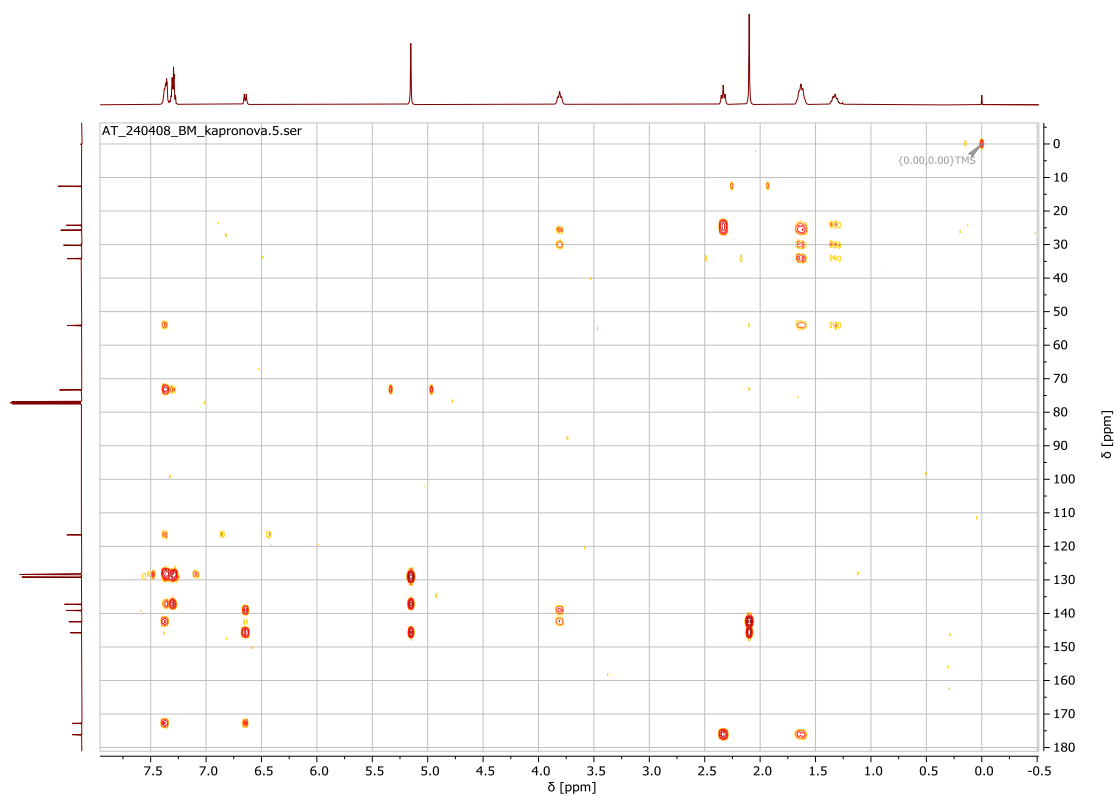
Obrázek 44 - <sup>13</sup>C NMR spektrum látky **12**, rozpouštědlo CDCl<sub>3</sub>.



Obrázek 45 - COSY NMR spektrum látky **12**, rozpouštědlo CDCl<sub>3</sub>.

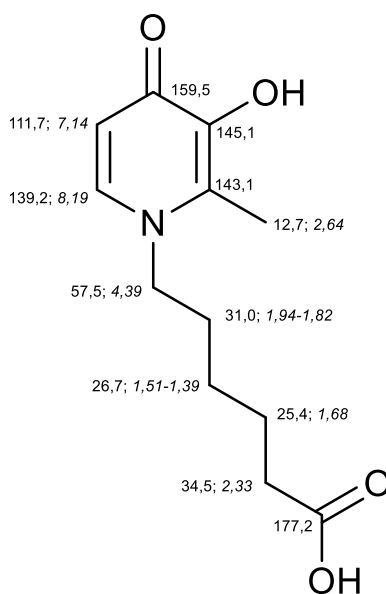


Obrázek 46 - HSQC NMR spektrum látky **12**, rozpouštědlo  $\text{CDCl}_3$ .

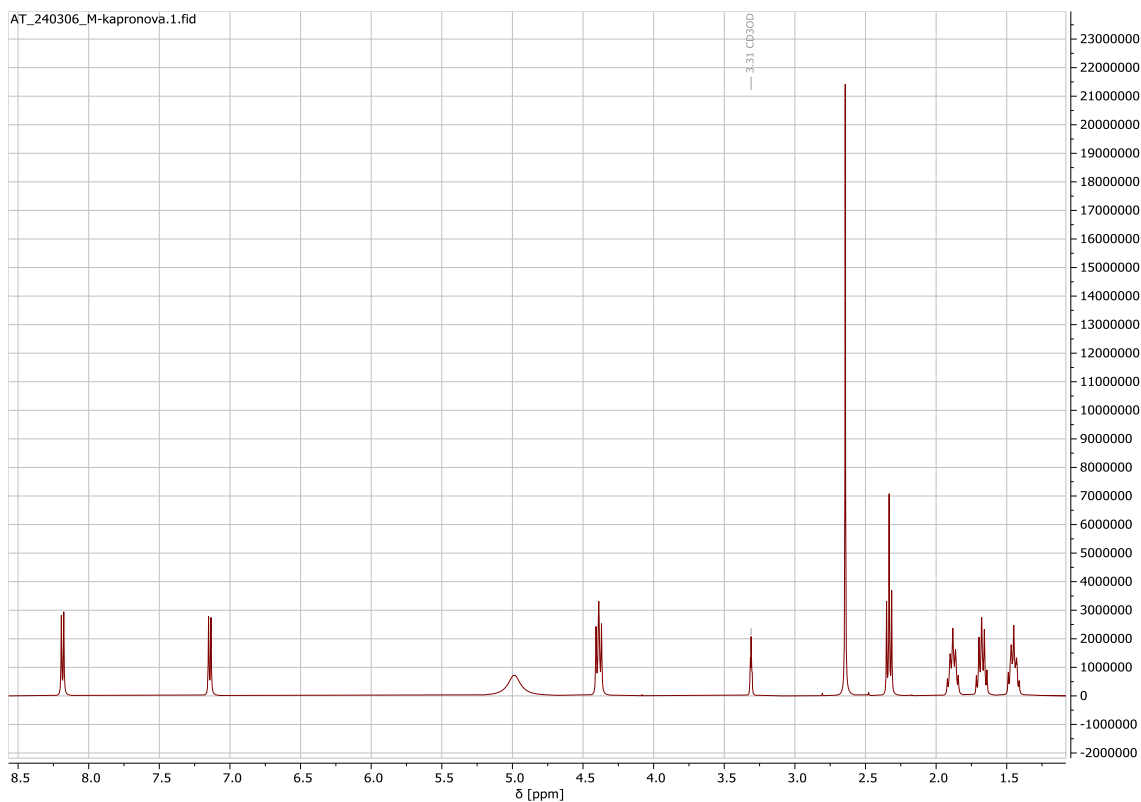


Obrázek 47 - HMBC NMR spektrum látky **12**, rozpouštědlo  $\text{CDCl}_3$ .

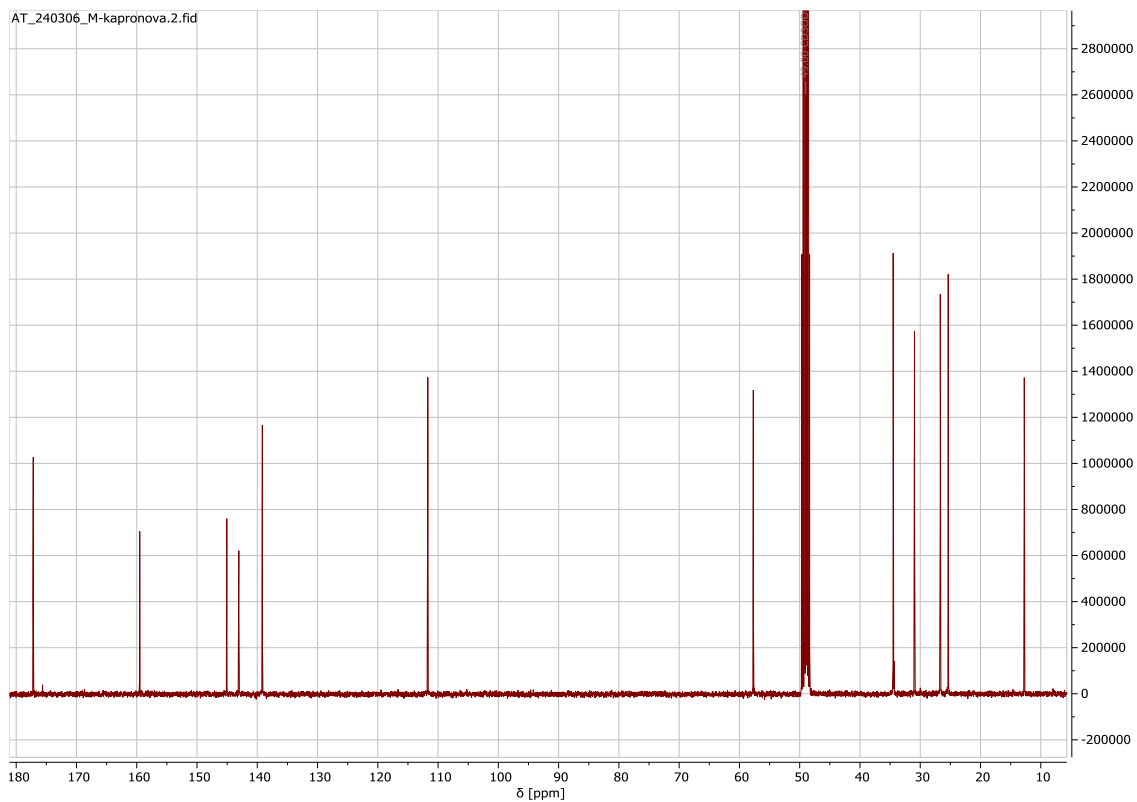
## Příloha 7 – NMR spektra látky 13



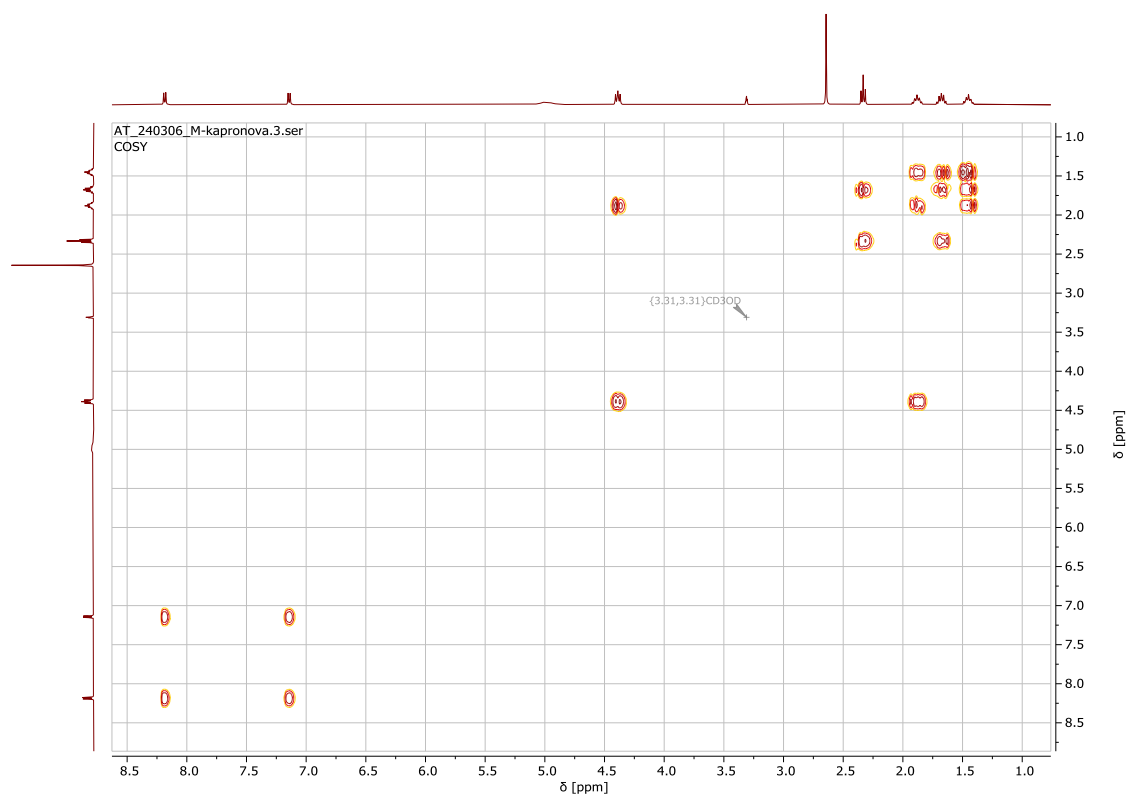
Obrázek 48 - Struktura látky 13 s  $^1\text{H}$  (kurzivou) a  $^{13}\text{C}$  posuny v jednotkách ppm.



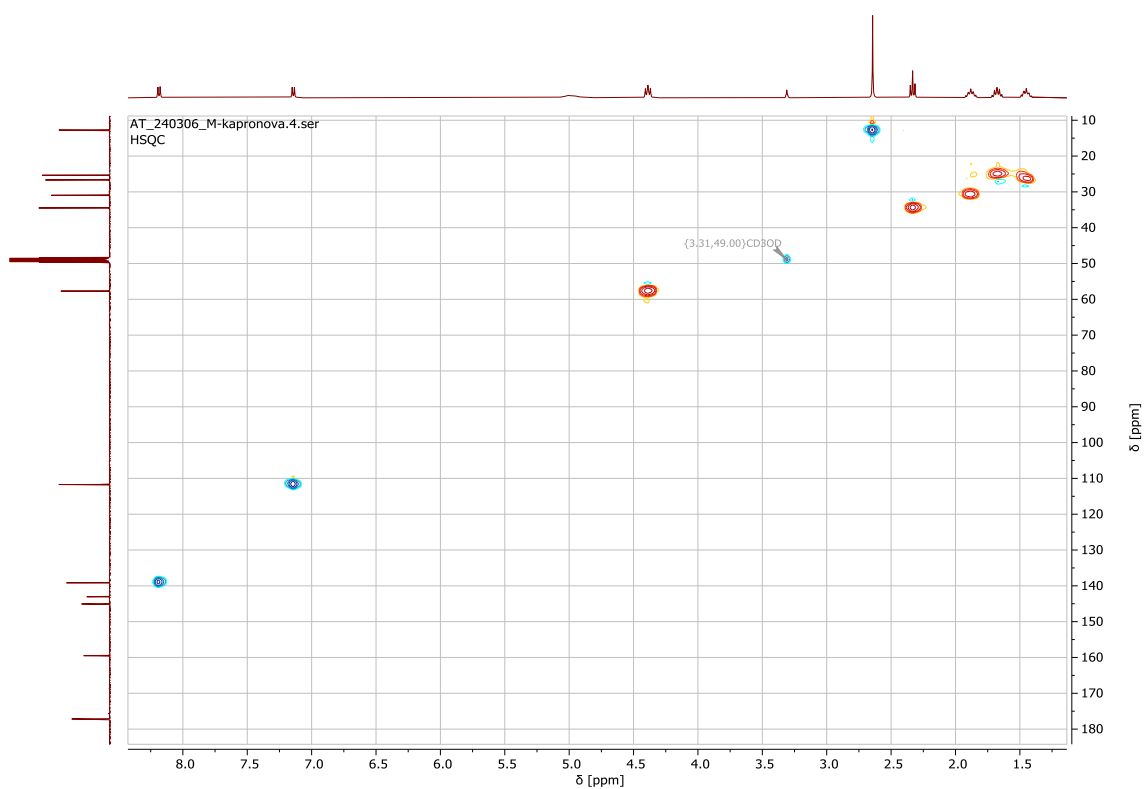
Obrázek 49 -  $^1\text{H}$  NMR spektrum látky 13, rozpouštědlo MeOD.



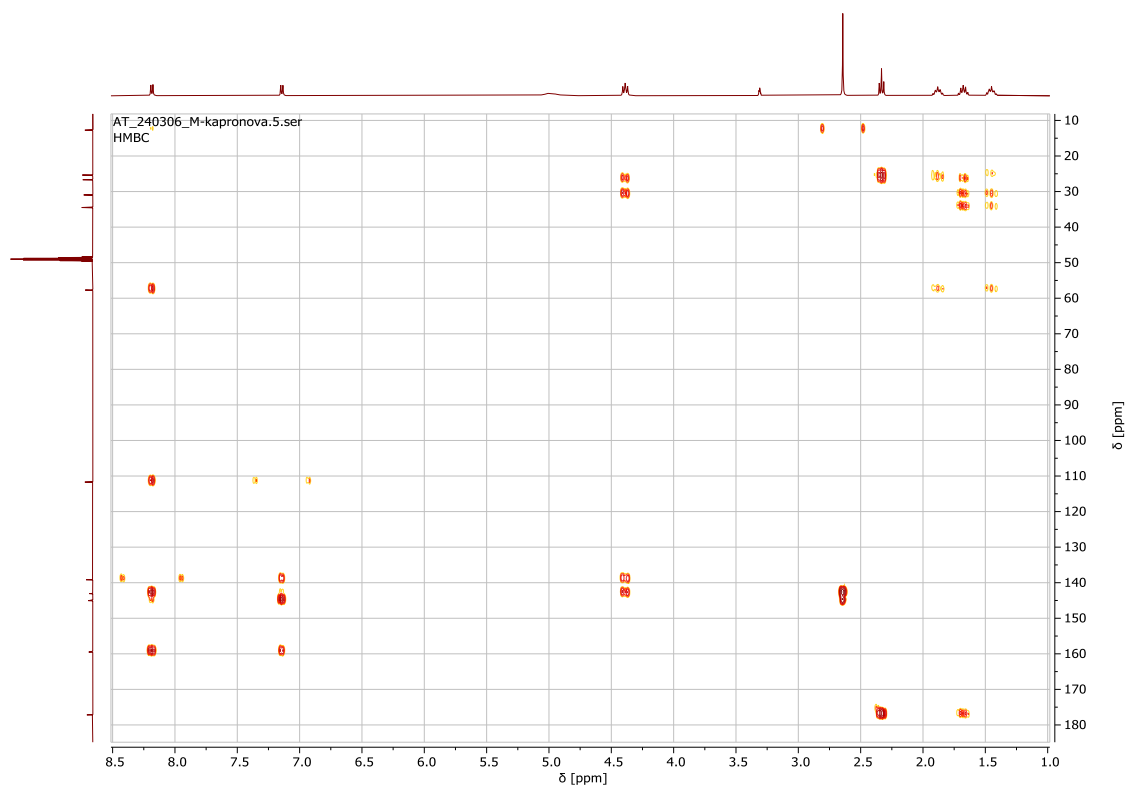
Obrázek 50 -  $^{13}\text{C}$  NMR spektrum látky **13**, rozpouštědlo MeOD.



Obrázek 51 - COSY NMR spektrum látky **13**, rozpouštědlo MeOD.



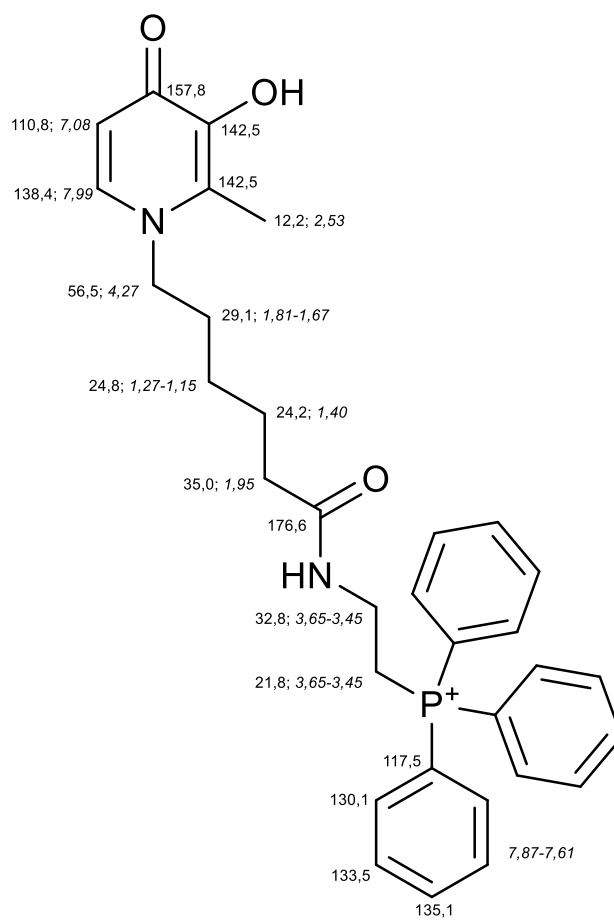
Obrázek 52 - HSQC NMR spektrum látky **13**, rozpouštědlo MeOD.



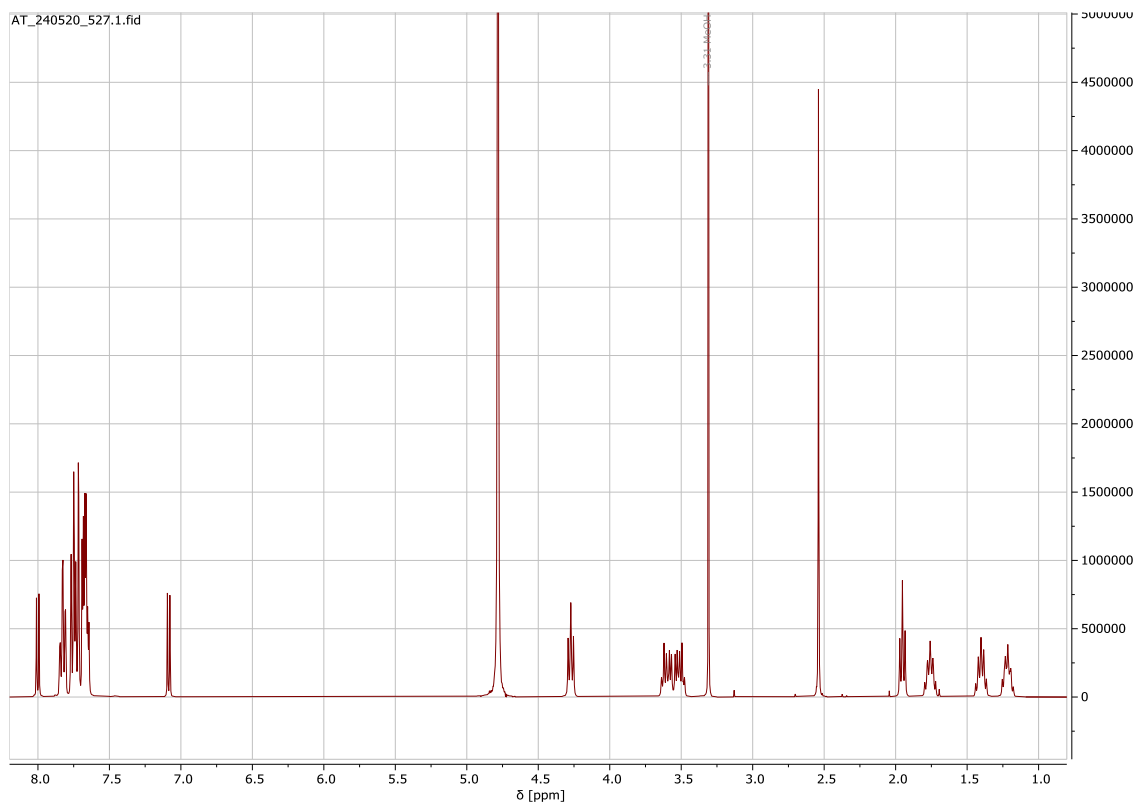
Obrázek 53 - HMBC NMR spektrum látky **13**, rozpouštědlo MeOD.



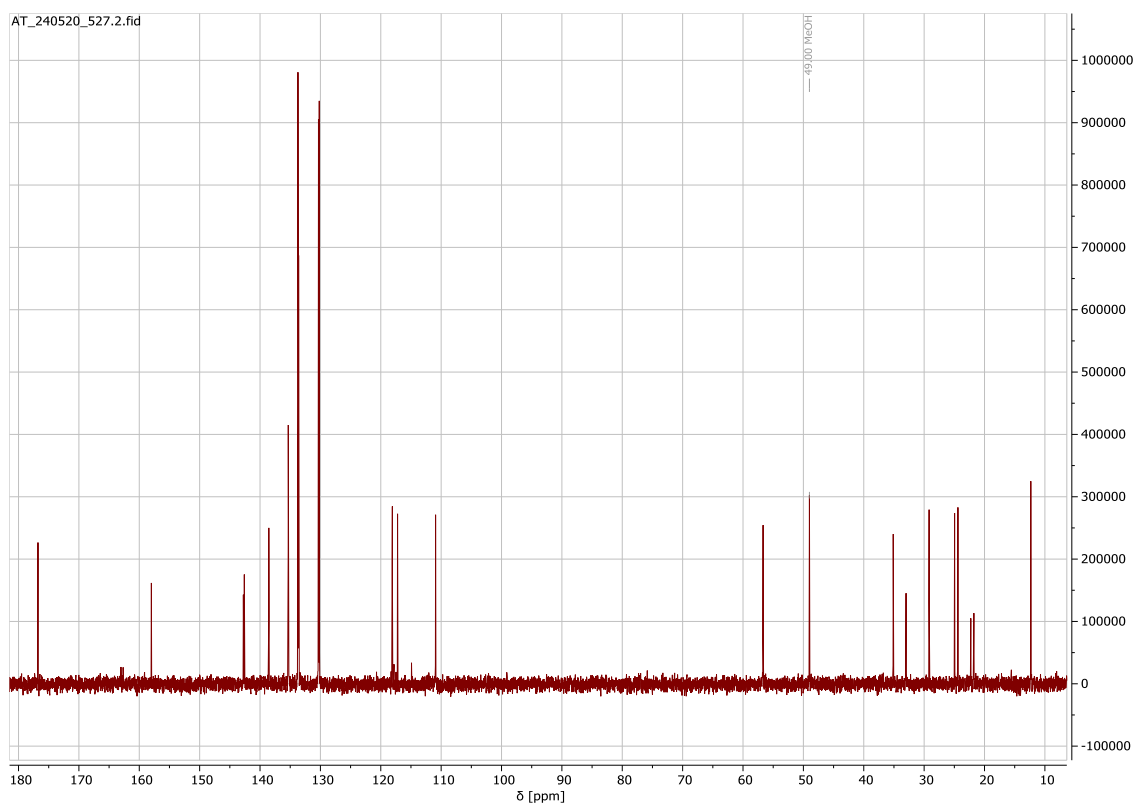
## Příloha 8 – NMR spektra látky 14



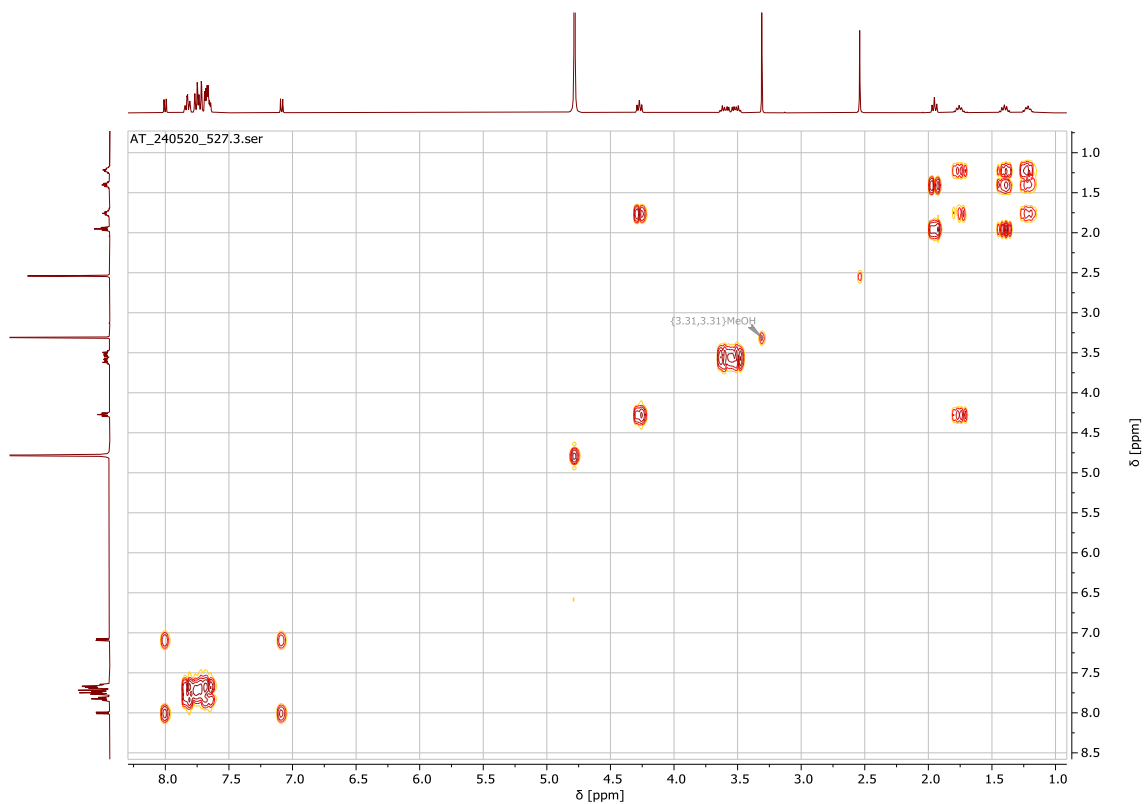
Obrázek 54 - Struktura látky 14 s <sup>1</sup>H (kurzívou) a <sup>13</sup>C posuny v jednotkách ppm.



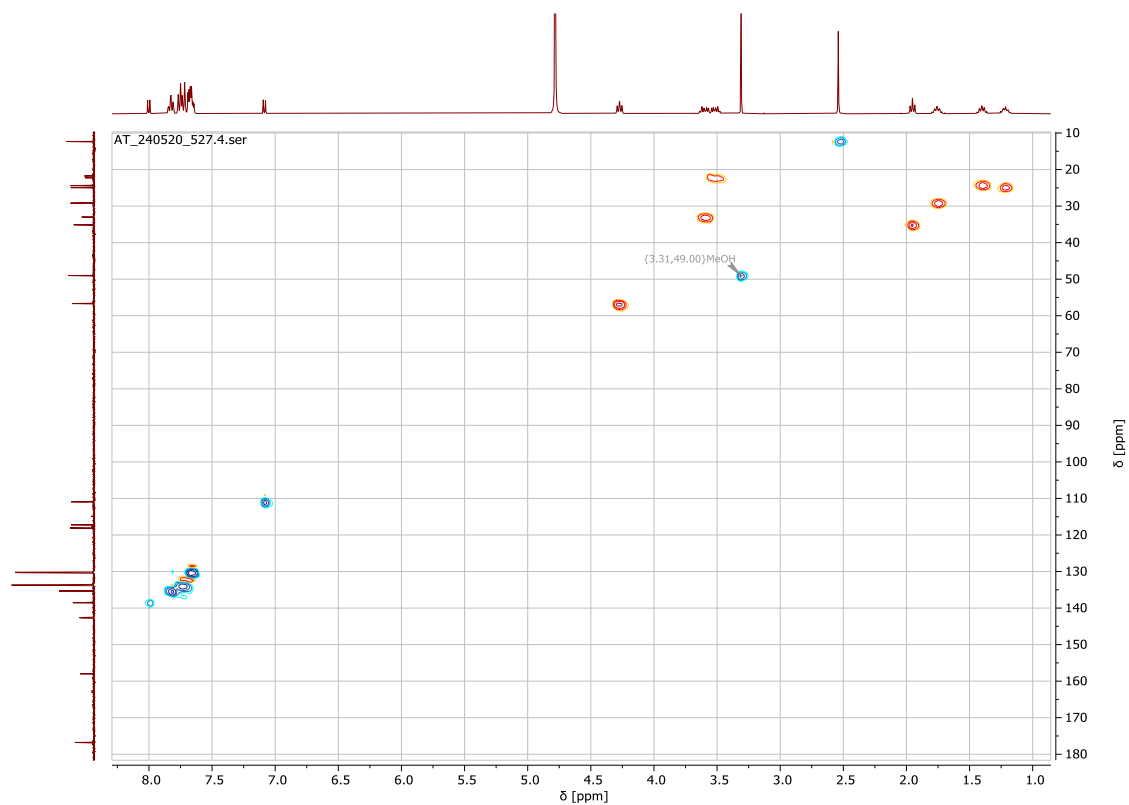
Obrázek 55 -  $^1\text{H}$  NMR spektrum látky **14**, rozpouštědlo  $\text{D}_2\text{O}$  (pro referenci přidán methanol).



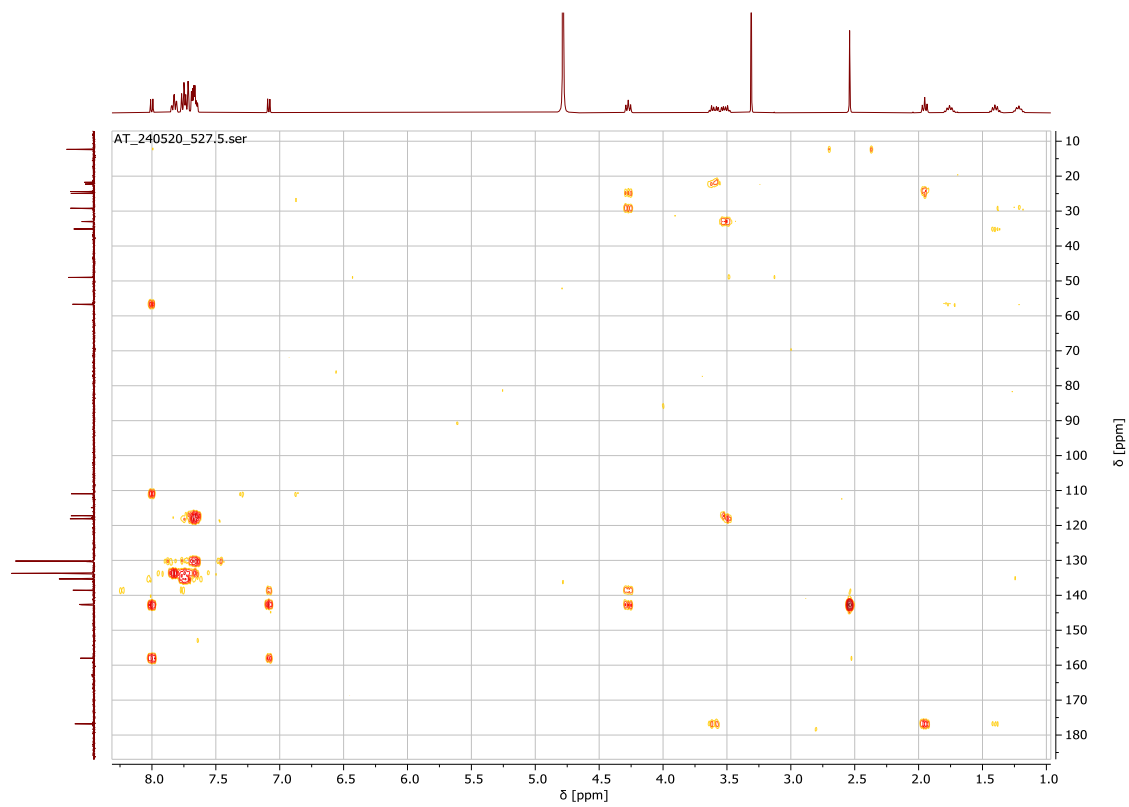
Obrázek 56 -  $^{13}\text{C}$  NMR spektrum látky **14**, rozpouštědlo  $\text{D}_2\text{O}$  (pro referenci přidán methanol).



Obrázek 57 – COSY NMR spektrum látky **14**, rozpouštědlo D<sub>2</sub>O (pro referenci přidán methanol).



Obrázek 58 – HSQC NMR spektrum látky **14**, rozpouštědlo D<sub>2</sub>O (pro referenci přidán methanol).



Obrázek 59 – HMBC NMR spektrum látky **14**, rozpouštědlo D<sub>2</sub>O (pro referenci přidán methanol).