

Univerzita Karlova v Praze
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv

Azaftalocyaniny jako nová skupina zhášečů fluorescence

Disertační práce



Studijní program: farmacie

Studijní program: farmaceutická chemie

Školitel:

doc. PharmDr. Martin Doležal, Ph.D.

Školitel specialista:

PharmDr. Miroslav Miletín, Ph.D.

Hradec Králové 2008

Mgr. Kamil Kopecký

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracoval samostatně. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpal, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci jsou řádně citovány.“

V Hradci Králové

Mgr. Kamil Kopecký

Rád bych poděkoval svému školiteli doc. PharmDr. Martinu Doležalovi, Ph.D. a svému školiteli specialistovi PharmDr. Miroslavu Miletínovi, Ph.D. za odborné vedení, všestrannou pomoc, trpělivost a cenné připomínky při vypracovávání této disertační práce. Můj dík patří také všem doktorandům, diplomantům a rigorozantům, kteří v době mého studia pracovali v laboratořích PharmDr. Miroslava Miletína, Ph.D. a PharmDr. Petra Zimčíka, Ph.D. Děkuji také všem pracovníkům Katedry farmaceutické chemie a kontroly léčiv za vytvoření příjemného pracovního prostředí.

Děkuji také pracovníkům Laboratoře struktury a interakcí biologicky aktivních molekul, jmenovitě prof. RND. Milanu Pourovi, Ph.D. a doc. PharmDr. Jiřímu Kunešovi, CSc. za změřeni a pomoc při interpretaci NMR spekter, paní Ivě Vencovské za změřeni IČ spekter, PharmDr. Lucii Novákové, Ph.D. a Mgr. Jurovi Lenčovi za změřeni MS spekter a dále pak RNDr. Daliboru Šatínském, Ph.D. za provedení HPLC analýz. Dále pak děkuji doc. RNDr. Petru Klemmerovi, CsC. za pomoc při výpočtu statistického zastoupení kongenerů ve směsi. Nemały dík patří firmě Generi Biotech s.r.o. Hradec Králové za syntézu oligonukleotidických sond.

Tato práce vznikla za finanční podpory Výzkumného záměru MSM0021620822, grantu GA AV KJB401100801 a grantu GA UK 41107/B/2007.

1 OBSAH

1	OBSAH	4
2	SEZNAM ZKRATEK.....	7
3	FORMULACE PROBLEMATIKY A ZPŮSOB ŘEŠENÍ	9
4	PŘEHLED SOUČASNÉHO STAVU ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	10
4.1	Teoretické předpoklady pro „zhášení“ fluorescence.....	10
4.2	Molekulární sondy	13
4.3	Přehled nejčastěji využívaných fluorescenčních barviv	18
4.4	Přehled používaných quencherů	25
5	ZVOLENÉ METODY ŘEŠENÍ	30
5.1	Nukleofilní substituce pyrazindikarbonitrilů	30
5.2	Charakterizace azaftalocyaninů	30
5.3	Syntéza ftalocyaninů	32
5.4	Příprava nesymetrických ftalocyaninů	34
5.5	Příprava amidů a esterů	40
5.6	Protektce hydroxylové skupiny	42
6	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	44
6.1	Syntéza pyrazin-2,3-dikarbonitrilů	45
6.1.1	5,6-Bis-[2-(2-hydroxyethoxy)-ethylamino]-pyrazin-2,3-dikarbonitril (2)45	
6.1.2	5,6-Bis-(2-hydroxyethylamino)pyrazin-2,3-dikarbonitril (3).....	46
6.1.3	5-Chlor-6-diethylaminopyrazin-2,3-dikarbonitril (4).....	46
6.1.4	5-Diethylamino-6-(2-hydroxyethylamino)pyrazin-2,3-dikarbonitril (5)47	
6.1.5	5-Diethylamino-6-[2-(2-hydroxyethoxy)ethylamino]pyrazin-2,3-dikarbonitril (6).....	47
6.1.6	5-[Bis-(2-hydroxyethyl)amino]6-diethylaminopyrazin-2,3-dikarbonitril (7)	48
6.1.7	6-[(5,6-Dikyan-3-{[2-(2-hydroxyethoxy)ethyl]amino}pyrazin-2-yl)amino]hexanová kyselina (10).....	48

6.1.8	5,6- <i>Bis</i> -(diethylamino)pyrazin-2,3-dikarbonitril (11).....	49
6.1.9	5-(Diethylamino)-6-[(2-hydroxyethyl)methylamino]pyrazin-2,3-dikarbonitril (25).....	50
6.1.10	4-[(3-Chlor-5,6-dikyanpyrazin-2-yl)methylamino]benzoová kyselina (26)	50
6.1.11	4-[(5,6-Dikyan-3-diethylaminopyrazin-2-yl)methylamino]benzoová kyselina (27).....	51
6.2	Syntéza vedlejších produktů nukleofilní substituce pyrazin-5,6-dikarbonitrilů	52
6.2.1	4-(2-Hydroxyethyl)-3,4-dihydro-2H-pyrazino[2,3-b][1,4]oxazin-6,7-dikarbonitril (19).....	52
6.2.2	4-Methyl-3,4-dihydro-2H-pyrazino[2,3-b][1,4]oxazin-6,7-dikarbonitril (21)	52
6.3	Syntéza AzaPc metodou statistické kondenzace.....	53
6.3.1	2,3- <i>Bis</i> -[2-(2-hydroxyethoxy)ethylamino]-9,10,16,17,23,24- <i>hexakis</i> -(diethylamino)-1,4,8,11,15,18,22,25-(oktaaza)ftalocyanin (12).....	54
6.3.2	2-(2-Hydroxyethylamino)-3,9,10,16,17,23,24- <i>heptakis</i> -(diethylamino)-1,4,8,11,15,18,22,25-(oktaaza)ftalocyanin (13).....	55
6.3.3	2-(2-Hydroxyethylamino)-3,9,10,16,17,23,24- <i>heptakis</i> -(diethylamino)-1,4,8,11,15,18,22,25-(oktaaza)ftalocyanin (14).....	55
6.3.4	2-[2-(2-Hydroxyethoxy)-ethylamino]-3,9,10,16,17,23,24- <i>heptakis</i> -(diethylamino)-1,4,8,11,15,18,22,25-(oktaaza)ftalocyanin (15).....	56
6.3.5	2-(5-Karboxypentylamino)-3,9,10,16,17,23,24- <i>heptakis</i> -(diethylamino)-1,4,8,11,15,18,22,25-(oktaaza)ftalocyanin (16).....	57
6.3.6	2,3,9,10,16,17,23,24- <i>Oktakis</i> -(diethylamino)-1,4,8,11,15,18,22,25-(oktaaza)ftalocyanin (17)	58
6.3.7	Příprava azaftalocyaninů 22-24	59
6.3.8	2,9- <i>Bis</i> -(5-karboxypentylamino)-3,10,16,17,23,24- <i>hexakis</i> -(diethylamino)-1,4,8,11,15,18,22,25-(oktaaza)ftalocyanin (22).....	59
6.3.9	2,9,16- <i>Tris</i> -(5-karboxypentylamino)-3,10,17,23,24- <i>pentakis</i> -(diethylamino)-1,4,8,11,15,18,22,25-(oktaaza)ftalocyanin (23).....	60
6.3.10	2,9,16,23- <i>Tetrakis</i> -(5-karboxypentylamino)-3,10,17,24- <i>tetrakis</i> -(diethylamino)-1,4,8,11,15,18,22,25-(oktaaza)ftalocyanin (24).....	61
6.3.11	2-[(4-Karboxyfenyl)methylamino]-3,9,10,16,17,23,24- <i>heptakis</i> -(diethylamino)-1,4,8,11,15,18,22,25-(oktaaza)ftalocyanin (29).....	62
6.4	Modifikace AzaPc pro navázání na pevnou fázi.....	63

6.4.1	Azaftalocyanin (30)	63
6.4.2	Azaftalocyanin (31)	64
6.4.3	Azaftalocyanin (32)	65
6.4.4	Azaftalocyanin (32) vázaný na pevnou fázi (33).....	66
6.5	Optimalizace syntézy AzaPc pomocí HPLC analýzy	67
6.6	Měření stability AzaPc v reagenčních pro syntézu oligonukleotidů.....	68
6.7	Měření produkce singletového kyslíku a fluorescence	69
6.8	Měření účinnosti zhášení fluorescence AzaPc	70
6.9	Měření tvorby komplexu s pyridinem.....	71
7	VÝSLEDKY A DISKUZE	72
7.1	Syntéza pyrazin-2,3-dikarbonitrilů nukleofilní substitucí.....	73
7.2	Syntéza AzaPc metodou statistické kondenzace.....	76
7.3	Optimalizace syntézy AzaPc pomocí HPLC analýzy	77
7.4	Měření stability AzaPc v reagenčních pro syntézu oligonukleotidů.....	81
7.5	Měření produkce singletového kyslíku a fluorescence	88
7.6	Modifikace AzaPc pro přípravu značené pevné fáze	89
7.7	Měření účinnosti zhášení fluorescence AzaPc	92
7.8	Měření tvorby komplexu s pyridinem.....	93
8	ZÁVĚR	97
9	SOUHRN	99
10	SUMMARY	100
11	SEZNAM PUBLIKOVANÝCH PRACÍ.....	101
11.1	Práce v odborných časopisech	101
11.2	Patentová přihláška	103
11.3	Abstrakty ze symposií a konferencí	103
12	PŘÍLOHA	105
13	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	106

2 SEZNAM ZKRATEK

- AMA – směs amoniak/methylamin
- AUC – plocha pod křivkou (area under curve)
- AzaPc – azaftalocyanin
- BHQ – Black Hole Quencher™
- Cy5[®] - indocyaninové barvivo používané jako fluorofor
- DBU – 1,8-diazabicyklo[5.4.0]undec-7-en
- DCC – dicyklohexylkarbodiimid
- DMF – dimethylformamid
- DMSO – dimethylsulfoxid
- DMTr - dimethoxytrityl
- DNA – deoxyribonukleová kyselina
- DPBF -1,3-difenylisobenzofuran
- Fmoc – 9-fluorenylmethylkarbamát
- FRET – „Förster-resonance energy transfer“
- HBTU – *O*-(benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorofosfát
- HOSu – *N*-hydroxysukcinimid
- HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie (high performance liquid chromatography)
- lcaa CPG – dlouhý alifatický alkylový řetězec vázaný na pevné fázi s kontrolovanou velikostí pórů (long chain alkyl amine-controlled pore glass)
- MMTr – monomethoxytrityl
- Pc – ftalocyaniny (phthalocyanines)
- PCR – polymerasová řetězová reakce
- PDT – fotodynamická terapie (photodynamic therapy)
- PET – přenos energie indukovaný světlem (photo-induced elektron transfer)
- PNA – peptidická nukleová kyselina
- RNA – ribonukleová kyselina
- SARS-CoV – coronavirus způsobující syndrom akutního respiračního selhání
- SubPc – subftalocyaniny (subphthalocyanines)
- TAMRA – tetramethylrhodamin

Taq polymerasa – polymerasa izolovaná z bakterie *Thermus aquaticus*

TFA – kyselina trifluoroctová

THF – tetrahydrofuran

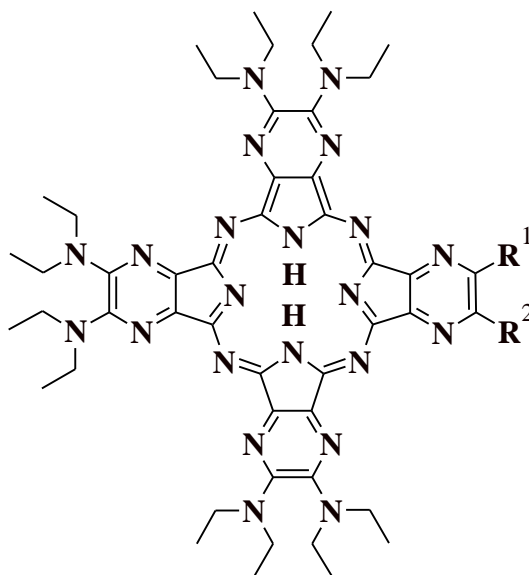
TLC – tenkovrstvá chromatografie (thin-layer chromatography)

TPP – tetrapyrazinoporfyrazin

3 FORMULACE PROBLEMATIKY A ZPŮSOB ŘEŠENÍ

Vědní obory zabývající se výzkumem a posléze rutinními analýzami DNA, resp. RNA a proteinů využívají ke své práci fluorescenční barviva (fluorofory) nejrůznějších chemických struktur, a tím i variabilních odezev ve fluorescenčním spektru. V některých případech jsou používány metody, při kterých je fluorescence použitého fluorescenčního barviva „zhasnuta“ druhou použitou látkou nemající vlastní fluorescenci, příp. mající fluorescenční spektrum odlišné od použitého fluoroforu.

Počet, absorpční vlastnosti a nízká stabilita při chemických reakcích komerčně dostupných „zhasněčů“ (v anglicky psané literatuře označovány jako quenchers) nás vedl k syntéze alkylamino derivátů tetrapyrazinoporfyrazinů (TPP) – azaftalocyaninů (AzaPc). Spektrální, fotofyzikální a fotochemické vlastnosti těchto látek, zjištěné při předchozích syntézách AzaPc substituovaných alkylovými řetězci vázanými přes různé heteroatomy (kyslík, síra, dusík)[1] byly rozhodujícím předpokladem pro možné využití těchto látek jako potenciální „zhasněče“ fluorescence fluoroforů emitujících světlo v oblasti 630-700 nm. Právě tato oblast je tou nejproblematictější z hlediska v současné době dostupných quencherů.



4 PŘEHLED SOUČASNÉHO STAVU ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

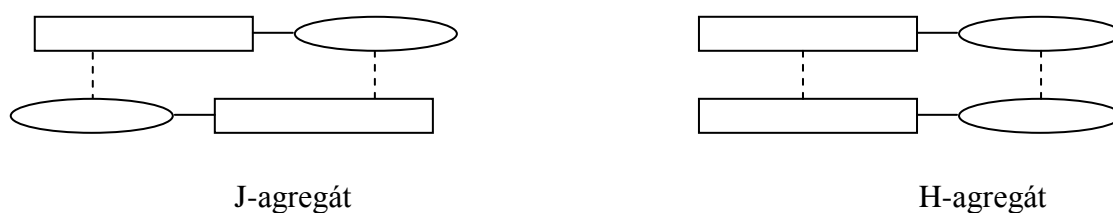
4.1 Teoretické předpoklady pro „zhášení“ fluorescence

Látky vykazující fluorescenci po přijetí určitého kvanta energie tuto energii opět vydávají ve formě fotonu do okolí a tuto energii je možné detekovat jako fluorescenci. Pokud je v dostatečně blízké vzdálenosti od fluorescenční molekuly jiná molekula, která je schopná toto kvantum energie přijmout, pak původní fluorescenci nemůžeme detekovat. O látce emitující energii ve formě fotonu poté mluvíme jako o donoru energie a o látce foton přijímající mluvíme jako o akceptoru energie. Akceptorem může být druhý fluorofor emitující foton o nižší energii nebo látka, která přijatou energii vyzáří jiným způsobem než ve formě fotonu, protože nemá schopnost fluorescence, např. ve formě tepla. Látky patřící do druhé skupiny akceptorů jsou označovány jako „dark quencher“. Při použití druhého fluoroforu jako akceptoru může být detekce „zhášení“ donoru ovlivněna několika faktory, z nichž nejdůležitější je překryv emisních spekter donoru a akceptoru energie, čímž může být snížen poměr signál/šum pozadí. Je také zapotřebí používat optické filtry a komplexní analýzu dat. Při použití „dark quencherů“ se tyto problémy nevyskytují právě díky nepřítomnosti vlastní fluorescence těchto látek. Navíc umožňují použití více fluorescenčních sond s různými fluorofory současně při jedné analýze

Energie může být mezi dvěma látkami (barvivy), které jsou konjugovány s biomolekulami, přenášena nezářivými procesy, a to buď statickým, nebo dynamickým zhášením. U nekonjugovaných fluoroforů (např. fluorescein, rhodaminy, cyaniny) vstupuje do hry další faktor, a to agregace. Ta způsobuje vytvoření „základního energetického stavu“ (ground state complex). Agregace fluoroforů nastává ve vodném prostředí a je zapříčiněna elektrostatickými, sterickými a hydrofobními silami[2-4].

Statické zhášení nastává při vytvoření komplexu v „základním energetickém stavu“. Donor a zhášející molekula se váží dohromady a tvoří komplex (intermolekulární dimer) v základním energetickém stavu, který má jiné vlastnosti než je prostý součet vlastností jeho součástí. Tento komplex je stabilizován

elektrostatickými silami a sterickými vlastnostmi fluoroforu[3]. Energetické stavy elektronových hladin v komplexu zúčastněných molekul se sčítají a výsledné elektronové vlastnosti pak závisí na orientaci dipólových momentů. Při tomto způsobu zhášení se rozeznávají dva druhy vzniklých komplexů (agregátů). H-agregáty mají absorpci posunutou k modré části spektra a fluorescence je snížena[5]. J-agregáty mají naopak absorpci posunutou k červené oblasti a kvantový výtěžek fluorescence je vyšší[6, 7].



Obrázek 1: Schématické znázornění H- a J-dimerů.

Z výše uvedeného vyplývá několik možných kombinací. Jedná-li se o homodimer složený ze dvou identických fluoroforů, může být výsledná fluorescence u H-typu tohoto dimeru nulová, protože při opačných dipólových momentech stejné velikosti dojde k vykompenzování energií. U heterodimerů H-typu složených ze dvou různých fluorescenčních barviv je nepravděpodobné, že by došlo k absolutnímu vykompenzování dipólových momentů, a proto je výsledná fluorescence pouze snížena. Ke kompletnímu zhášení fluorescence může však dojít i v případě, že je heterodimer tvořen fluoroforem a „dark quencherem“[8].

Dynamické zhášení je označováno také jako „fluorescence-resonance energy transfer“ (FRET). Je dělen na dva mechanismy, a to na Försterův a Dexterův mechanismus přenosu energie. Försterův mechanismus[9] (nebo též Coulombův) je založen na interakci dipól-dipól mezi transitorními dipóly donoru a akceptoru. Je závislý na vzdálenosti donor-akceptor a snižuje se se vzdáleností (R) v poměru $1/R^6$. Limitní vzdálenost akceptoru a donoru je udávána v rozmezí 2-10 nm (20-100 Å), ale je specifická pro každý pár donor-akceptor. Z tohoto vztahu vyplývá, že při vzdálenosti do 70 % Försterova poloměru je přenos energie přibližně 90 %, při zvětšení vzdálenosti na 140 % Försterova poloměru se přenos energie snižuje na přibližně 10 % hodnoty[10]. Försterův poloměr (R_0) je definován jako vzdálenost, při které je efektivita

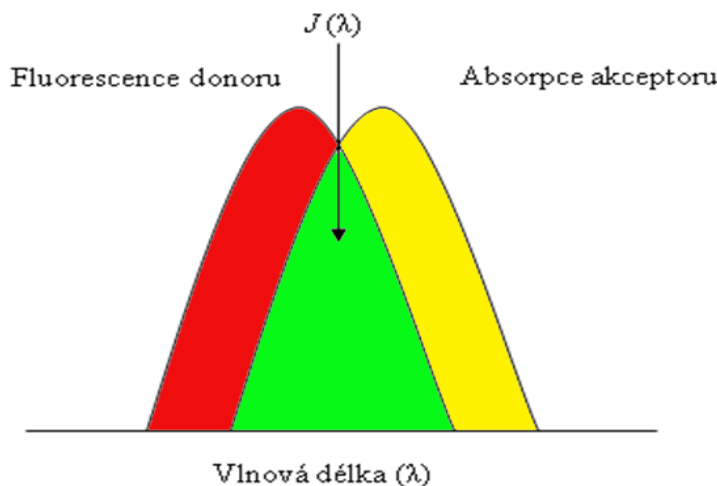
energetického přenosu právě 50 %, tzn. 50 % excitovaných donorů je deaktivováno FRET. Försterův poloměr lze vypočítat ze vztahu (1)

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

kde κ^2 je faktor dipólového momentu (rozsah 0-4; $\kappa^2 = 2/3$ pro náhodně orientovanou dvojici donor-akceptor), QY_D je fluorescenční kvantový výtěžek donoru bez přítomnosti akceptoru, n je refrakční index prostředí, $J(\lambda)$ je integrál spektrálního překryvu, který se vypočítá ze vztahu (2)

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

kde ε_A je extinkční koeficient akceptoru, F_D je intenzita emitované fluorescence donoru jako frakce celkové integrované intenzity. Limitujícím prvkem je také relativní orientace transitního dipólového momentu a také spektrální překryv emisního spektra donoru a absorpčního spektra akceptoru[11] (viz obrázek 2). Akceptorem může být pouze molekula, jejíž absorpční spektrum překrývá emisní spektrum donoru. Jestliže absorpční spektrum akceptoru nepřekrývá emisní spektrum donoru, emitovaná energie nemůže excitovat molekulu potenciálního akceptoru.



Obrázek 2: Překryv emisního spektra donoru a absorpčního spektra akceptoru.

Dexterův[12] (nebo též kolizní nebo výměnný přenos energie) mechanismus je jev, který se vyskytuje na krátkou vzdálenost a je závislý na prostorovém překryvu molekulových orbitalů akceptoru a donoru. Efektivita tohoto typu přenosu je dána vztahem e^{-R} , kde R je vzdálenost mezi donorem a akceptorem. Ve většině dvojic donor-akceptor je důležitějším jevem Försterův než Dexterův mechanismus[13].

Další mechanismy zhášení fluorescence zahrnují tvorbu „exciplexu“ (excited-stated complex) a přenos elektronů. Tvorba „exciplexu“ zahrnuje agregaci poté, co donor energie přejde do excitovaného stavu. Tento jev nastává pouze tehdy, pokud je donor a akceptor v těsné blízkosti nebo pokud fluorofor zůstává dlouho v excitovaném stavu, což zvyšuje pravděpodobnost setkání fluoroforu a quencheru[14]. Zhášení fluorescence elektronovým přenosem způsobuje fotobleaching ve větší míře než přenos energie jiným způsobem[13]. Fotobleaching je ireverzibilní oxidace nebo redukce fluoroforu.

4.2 Molekulární sondy

Molekulární sondy založené na FRET jsou používány v mnoha aplikacích k monitorování DNA a RNA[15] reakcí, včetně PCR[16, 17], hybridizace[18, 19], ligace[20-22], štěpení[23-25], rekombinace[26, 27] a syntézy. Jsou používány k metodám *in vitro* a *in vivo*. Hrají také důležitou roli při sekvenaci DNA, detekci mutací[28-30] a jako součást biosenzorů sloužících např. ke stanovení koncentrace olova[31], DNA/RNA[32] a proteinů[33].

Část těchto metod využívá zhášení fluorescence použitého fluoroforu k detekci přítomnosti či naopak nepřítomnosti sekvence DNA komplementární k sekvenci použité v sondě. Takto navržená sonda se ve většině případů skládá ze tří částí: donoru fluorescence (fluoroforu), akceptoru fluorescence (druhého fluoroforu nebo quencheru) a sekvence DNA komplementární k sekvenci analyzovaného vzorku. Výjimku tvoří tzv. light-up probes, které se skládají pouze z fluoroforu a komplementární sekvence (viz. níže).

Hlavním rozdílem mezi různými sondami pro monitorování PCR reakce je, jestli jsou nebo nejsou inkorporovány do konečného produktu. „Molecular beacons“ a „dual-labeled probes“ nejsou inkorporovány na rozdíl od „scorpion primer“, což jim dává výhodu, kterou je možnost navázání a rozpoznání specifické sekvence produktu.

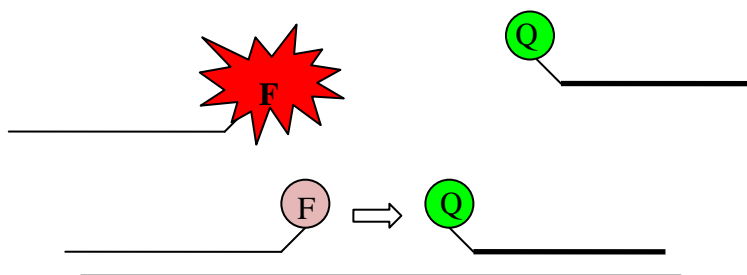
Ke konstruování molekulárních sond, ve kterých se využívá zhášení fluorescence použitého fluorescenčního barviva, může být přistoupeno několika základními způsoby. Jednak se využívá dvou sekvencí nukleové kyseliny, kde na jedné z nich je vázán fluorofor a na druhé quencher (mono-labeled probes). Druhou možností

je navázání fluoroforu i quencheru na jedno vlákno (dual-labeled probes). Podle výše uvedeného se nejčastěji používané sondy dají rozdělit do šesti skupin:

1. „adjacent probes“
2. „competitive hybridization probes“
3. „dual-labeled probes“
4. „molecular beacons“
5. „scorpion primers“
6. „light-up probes“

Ad 1) „Adjacent probes“

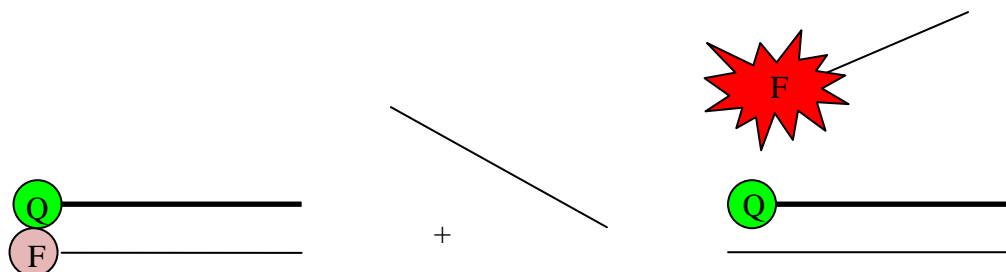
Tato nejstarší metoda využívá dvou komplementárních řetězců, z nichž jeden nese donor (fluorofor) a druhý akceptor (quencher) energie. Tato metoda využívá vazbu donoru na 3'-konec oligonukleotidu a akceptoru na 5'-konec, ale bylo prokázáno, že mohou být i v inverzních polohách[19]. Sekvence obou sond je vybírána tak, aby po hybridizaci s cílovým vláknem jejich vzdálenost byla minimální a docházelo k přenosu energie co možná nejefektivněji. Pro nejčastěji používaný pár fluorescein-rhodamin byla experimentálně změřena vzdálenost mezi donorem a akceptorem pro nejefektivnější přenos energie. Tato vzdálenost je čtyři až pět bazí[19]. Při menší vzdálenosti narůstá vliv kontaktního typu zhášení. V současné době jsou „adjacent probes“ využívány v klinické praxi k detekci amplifikací a ke genotypizaci lokusu F508del pro cystickou fibrózu a to v čase kratším než 30 minut[34].



Ad 2) „Competitive hybridization probes“

Druhý typ sond využívající dvě komplementární vlákna oligonukleotidů je konstruován tak, že donor i akceptor jsou opět každý na jednom vlákně. Tato vlákna jsou v intaktním stavu hybridizována a přenos energie je maximální. Po přidání

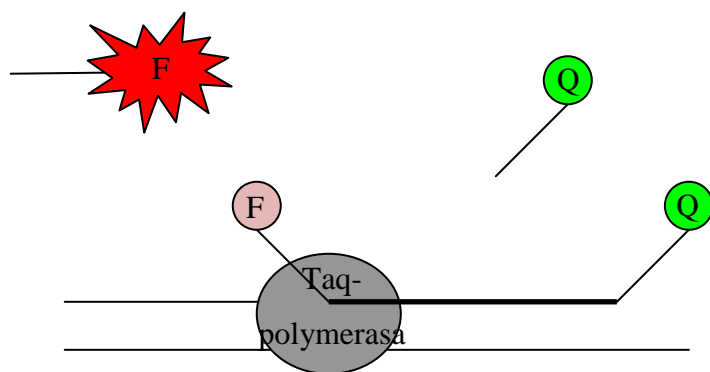
sekvence komplementární k použité sondě a zahřátí je sonda dehybridizována a po ochlazení spontánní hybridizací se jedno vlákno naváže na templátovou sekvenci a druhé zůstane volně v roztoku. Tím je přenos energie přerušen a fluorescence, která byla na začátku zhasena, může být detekována. Sondy této konstrukce jsou používány pro detekci hybridizace probíhající v živých buňkách[35].



Ad 3) „Dual-labeled probes“

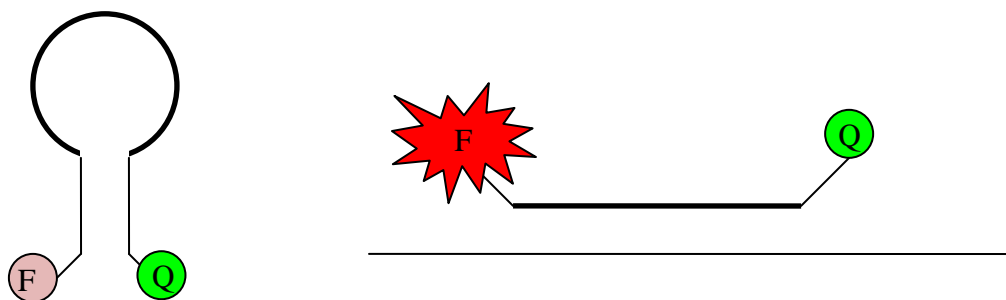
V literatuře jsou běžně označovány jako „Taq-man probes“ a to podle polymerasy používané při polymerasové řetězové reakci (polymerase chain reaction – PCR). Ta je izolována z bakterie *Thermus aquaticus* a má zkrácený název Taq polymerasa.

Vývoj tohoto typu sondy doznal od začátku 90. let 20. století značného pokroku. Z počátku byla na 5'-konec vázána příslušná base značená radioaktivním fosforem[16] (γ - ^{32}P). Posléze byl tento radioaktivní fosfor nahrazen fluorescenčním barvivem a quencherem vázaným na jednom vláknu DNA[17]. Velikost sondy je obvykle 20-30 bází. V roztoku je sonda ve formě náhodného klubka, kdy je vzdálenost fluoroforu od quencheru pro přenos energie dostatečně malá na to, aby nebyla detekovatelná fluorescence. V tuto chvíli se uplatňuje především statické zhasení. Po hybridizaci s komplementárním řetězcem DNA dojde k oddálení fluoroforu a zhasěče, ale fluorescence v ideálním případě stále není měřitelná, a to díky zhasení založeném na FRET. Po hybridizaci s templátovou strukturou DNA a následně proběhlé polymerasové reakci dojde k enzymatickému odštěpení terminálního nukleotidu z 5'-konce „dual-labeled probe“ exonukleasovou aktivitou DNA polymerasy (Taq polymerasa) a tím pádem k dostatečnému oddálení fluoroforu a quencheru a k měřitelnému nárůstu fluorescence. Tento typ sondy je dnes pravděpodobně nejpoužívanějším nástrojem k monitorování průběhu syntézy DNA při real-time PCR. V dřívější práci[36] je popsán způsob rozlišení mezi divokou a zmutovanou sekvencí genu cystické fibrózy pomocí dvou různým Taq-man sond během jedné PCR.



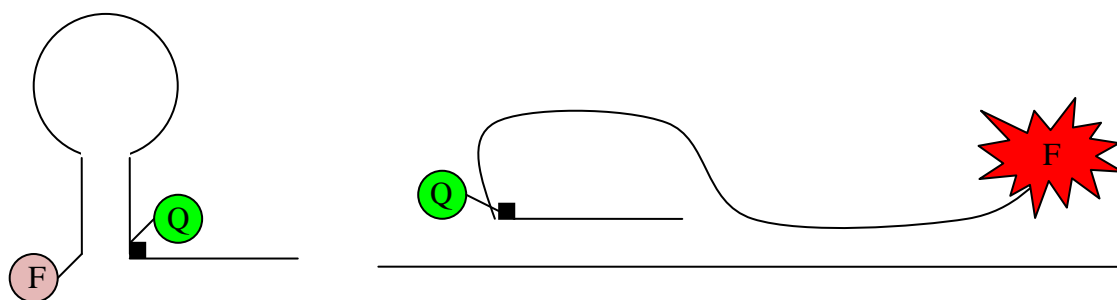
Ad 4) „Molecular beacons“

Druhý, novější typ sondy s navázaným donorem a akceptorem energie na jednom vlákně DNA, který má specifickou strukturu připomínající vlásenku, je označován jako „molecular beacons“[37]. Paradoxně, sám o sobě nepatří tento typ mezi FRET sondy, ale je mezi ně obecně zařazován. Konstrukce sondy je tvořena ze dvou částí. První je stopka tvořená krátkou sekvencí komplementárních bazí (obvykle 5-8), které dávají sondě její tvar a udržuje donor a akceptor fluorescence v intaktním stavu sondy v těsné blízkosti. Druhou částí je smyčka tvořená sekvencí bazí komplementárních s templátovou sekvencí o délce 15 až 35 bazí. Po kontaktu s komplementárním templátem dojde k hybridizaci sondy a uvolnění stopky a tím k obnovení detekovatelnosti fluorescence fluoroforu. Vazba mezi smyčkou sondy a templátovou strukturou je pevnější než mezi sekvencí bazí tvořících stopku. Nespornou výhodou této sondy je absence fluorescence v nehybridizovaném stavu, což je zapříčiněno statickým mechanismem zhášení. „Molecular beacons“ se osvědčily hlavně v situacích, kde je obtížné izolovat hybrid mezi sondou a jejím cílem, jako je např. detekce cílů v živých buňkách, našly uplatnění v biosenzorech[32, 38] nebo genotypizaci alel lidských genů[18]. V jednom analyzovaném vzorku může být použito i více sond vedle sebe s různými fluorofory[18].



Ad 5) „Scorpion primers“

Poslední skupinou častěji používaných FRET sond jsou tzv. „scorpion primers“. Ty jsou konstruovány tak, že ve své struktuře spojují sondu a primer, který je u jiných typů sond potřebné při PCR přidávat do reakční zkumavky. Jejich konstrukce je většinou blízka „vláseňkovým“ sondám „molecular beacons“ na jejichž 3'-konec je neštěpitelnou vazbou navázán primer[39-41]. Po přidání do reakce je celá sonda inkorporována do produktu PCR. Při ochlazení se sonda „ohne“ a hybridizuje ke komplementární sekvenci nově vzniklého vlákna DNA. Tím dojde k oddálení fluoroforu a quencheru a ke zvýšení signálu fluorescence. Takováto hybridizace probíhá rychleji než intermolekulární hybridizace. Výhody těchto sond v porovnání s „dual-labeled probes“ a „molecular beacons“ jsou především při podmínkách zrychleného cyklu PCR. Jsou využitelné např. při screeningu mutací[42-48].

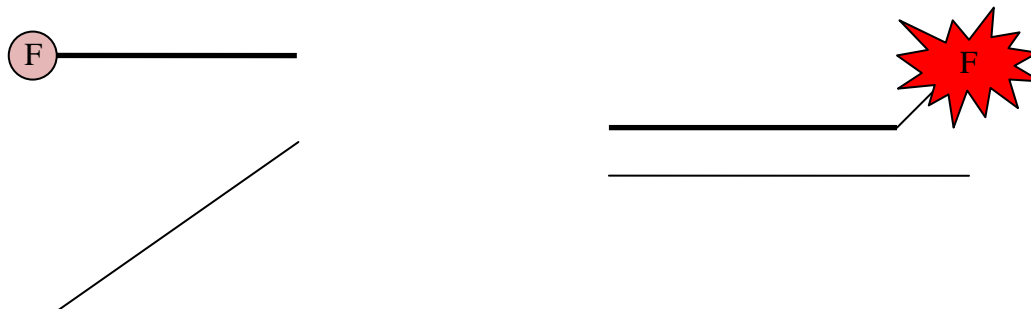


Ad 6) „Light-up probes“

Tento speciální případ molekulární sondy používá pouze fluorescenční barvivo bez přítomnosti zhášedce. Oligonukleotidové části sond jsou tvořeny analogem DNA - peptidickou nukleovou kyselinou (PNA) a jsou velice krátké, typická je pro ně délka 8-12 párů bazí. To je umožněno vyšší vazebnou afinitou PNA[17, 49, 50], která je dále zvýšena interakcí mezi fluoroforem a DNA. Jako fluorofory jsou používány thiazolová oranž a asymetrické cyaniny, např. SYBR[®] Green I nebo BOXTO[51, 52]. Použití PNA je nezbytné pro správnou funkci sondy[53]. Pokud je sonda volně v roztoku, tak prakticky nefluoreskuje, fluorescence se projeví až po vytvoření duplexu nebo triplexu s komplementárním řetězcem DNA[54]. Dojde k omezení volného otáčení vazby mezi aromatickým systémem thiazolové oranže, což eliminuje možnost nezářivého přenosu energie. Tato technika je omezena nespecifickou fluorescencí, která vzrůstá během PCR reakce a je tedy omezena dosažitelnou sensitivitou. Tyto sondy jsou poměrně levné a

jsou snadno připravitelné. Na druhou stranu je problematické měření poklesu signálu, především během exponenciální fáze, kdy je zhášeno pouze velmi málo sond.

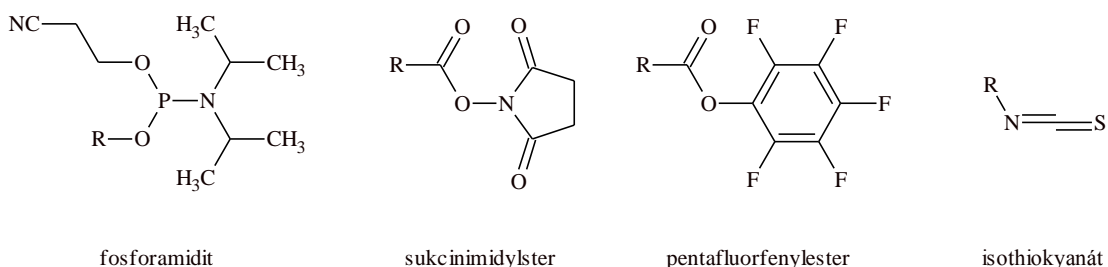
Jsou používány především ve virologii, kde se projevuje výhoda plynoucí z krátké sekvence. Komerčně jsou dostupné sety pro *in vitro* diagnostiku např. cytomegalovirových onemocnění[55-57], syndromu akutního respiračního selhání způsobeného koronavirem (SARS-CoV)[58-61] nebo non-Hodgkinova lymfomu[62, 63]. Dále mohou být využity k identifikaci specifické mRNA v živých buňkách.



Dále jsou spíše výjimečně používány i jiné typy sond, které jsou více či méně modifikacemi výše zmíněných sond. Jako příklad lze uvést sunrise primers[39], duplex scorpion primer[64], Plexor[65], HyBeacons[66], Yin-Yang probes[67], Cyclicons[68] a mnoho dalších.

4.3 Přehled nejčastěji využívaných fluorescenčních barviv

Nejčastěji používaná fluorescenční barviva v biologicky zaměřených vědních oborech se dají rozdělit podle mnoha hledisek, např. podle vlnové délky emitovaného záření, podle možného použití, podle základního strukturního skeletu, podle výrobce. Dále se v nabídkách firem můžeme setkat s několika formami jednoho fluoroforu. To je zapříčiněno různými reaktivními formami daných barviv. Nejčastěji se vyskytují fosforamidity, aktivní estery (sukcinimidylestery a pentafluorfenylestery), případně isothiokyanáty.



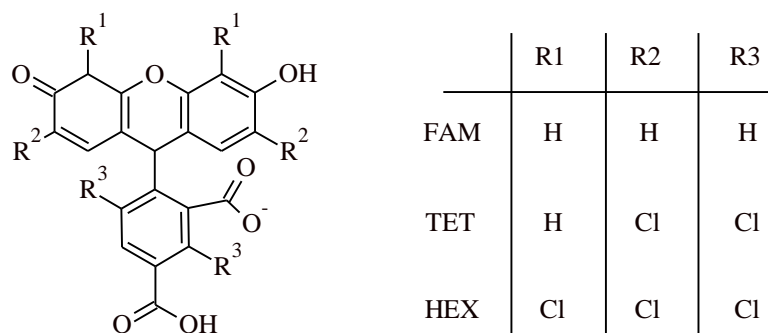
Obrázek 3: Přehled nejčastěji používaných reaktivních skupin komerčně dostupných fluoroforů. Substituent R ve vzorcích představuje navázaný fluorofor.

Nejpřehlednější dělení je nejspíše podle společného strukturního základu. Jako společný základ u většiny fluoroforů můžeme nalézt:

1. skelet odvozený od xanthenu
2. indocyaninový skelet
3. 4,4-difluor-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacenový skelet
4. další strukturní typy

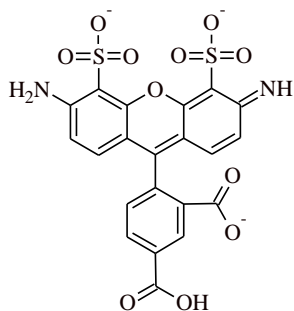
Ad 1) skelet odvozený od xanthenu

Základem největšího počtu fluorescenčních barviv je různě substituovaný xanthen. Od tohoto společného základu je odvozen základ fluoresceinový a rhodaminový (viz obrázek 4). Společný základ je pak dále konjugován s dalšími benzenovými jádry, čímž se posouvá vlnová délka emisního maxima k červené oblasti spektra. Dalšími substitucemi je pak dosahováno dalšího posunu spektrálních vlastností. V praxi se uplatňují hlavně substituenty ze skupiny halogenů (F, Cl), methoxy-, amino-, methyl- a sulfoskupina. Tyto fluorofory mají velice rozdílné spektrální vlastnosti, emisní maximum mají v rozsahu 350-750 nm. Pro zamýšlené použití je také důležité vědět, jaký je vliv pH na dané barvivo.

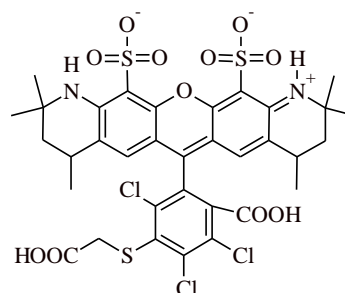


Obrázek 4: Struktura fluoresceinu (FAM), tetrachlorfluoresceinu (TET) a hexachlorfluoresceinu (HEX).

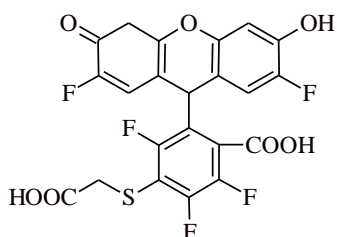
Výhody samotného fluoresceinu jsou vysoký extinkční koeficient, vynikající kvantový výtěžek fluorescence a dobrá rozpustnost ve vodě. Fluorescein má své excitační maximum (494 nm) velice blízko spektrální linii argonového laseru (488 nm), což z něj činí důležitý fluorofor pro konfokální laserovou skenovací mikroskopii a aplikace založené na průtokové cytometrii[69]. Navíc konjugáty fluoresceinu s proteiny jsou velice málo náchylné k precipitaci. Na druhou stranu má fluorescein i mnoho nevýhod jako je relativně vysoký fotobleaching, fluorescence citlivá na hodnotu pH[70] (vzhledem k $pK_a \sim 6,4$ se fluorescence výrazně snižuje při poklesu pH pod 7) a relativně široké emisní spektrum. Fluorescein vykazuje vysokou tendenci ke zhášení fluorescence při konjugaci s biopolymery, především při vyšším stupni substituce[71, 72]. Tyto problémy byly vyřešeny syntézou fluoroforů podobných spektrálních vlastností se stejným strukturálním základem[73-76]. Jsou to fluorofory Oregon Green 488, Oregon Green 514 (fluorované deriváty fluoresceinu)[77] a Rhodamine Green, Alexa Fluor 488 (sulfonovaný derivát rhodaminu) (viz. obrázek 5). Tato barviva mají mnohem vyšší fotostabilitu a vliv fyziologických hodnot pH je minimální.



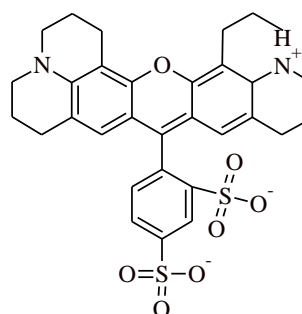
Alexa Fluor 488



Alexa Fluor 546



Oregon Green 514



Texas Red

Obrázek 5: Struktury vybraných fluorescenčních barviv odvozených od xanthenu.

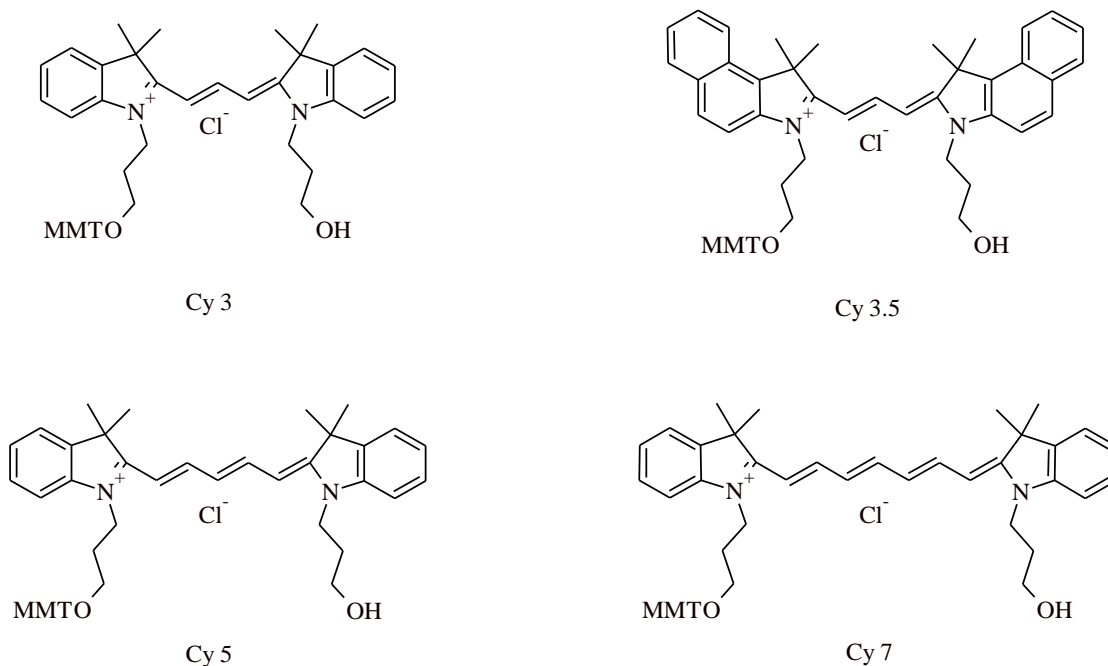
Rhodaminové fluorofory jsou odvozeny od fluoresceinového skeletu záměnou fenolických skupin za aminoskupiny. Výsledkem jsou fotostabilnější deriváty s vysokým extinkčním koeficientem ($\epsilon > 75\,000\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$) a dobrým kvantovým výtěžkem fluorescence.

Barviva této rozsáhlé skupiny jsou komerčně dostupná pod mnoha obchodními názvy a značkami, např. Alexa[®], Oregon Green[®], Texas Red[®], FAM[®], TET[®], HEX[®].

Ad 2) indocyaninový skelet

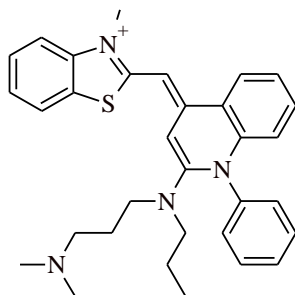
Pro skupinu indocyaninových fluoroforů je společné spojení terciárního a kvarterního dusíku dvou indolových jader pomocí konjugovaného systému dvojných vazeb (viz obrázek 6)[78-81]. Do této skupiny patří tři zástupci: Cy3[®], Cy5[®] a Cy7[®]. V praxi se používají i jejich deriváty, u kterých je přikondenzováno benzenové jádro k základnímu indolovému seskupení. Tyto látky, které se vyznačují posunutím absorpčního i emisního spektra k vyšším vlnovým délkám mají označení Cy3.5[®], Cy5.5[®]. Indocyaninová barviva mají poměrně vysoký molární extinkční koeficient

(120000-250000 $M^{-1} \text{ cm}^{-1}$), ale také podléhají celkem snadno fotobleachingu. Tento fotobleaching je u indocyaninových barviv vyšší než u látek s označením Alexa[®], a to o 15-35 % při ozařování po dobu 95 sekund[82]. Tato barviva se běžně používají ve fluorescenční mikroskopii, průtokové cytometrii a v detekčních metodách založených na identifikaci nukleové kyseliny[83-87].



Obrázek 6: Struktura indocyaninových fluoroforů. MMT ve vzorcích představuje monomethoxytrytylovou chránící skupinu.

Za jejich určitou podskupinu můžeme považovat tzv. asymetrická cyaninová barviva. Jako příklad můžeme uvést SYBR Green I[®], BOXTO nebo Tiazole Orange (TO)[88]. Jejich společný strukturní základ je 3-methyl-2-[(*E*)-chinolin-4(1*H*)-ylidenmethyl]-1,3-benzothiazol-3-ium a jsou používány pro přípravu Light-up probes (viz. obrázek 7).



SYBR Green I

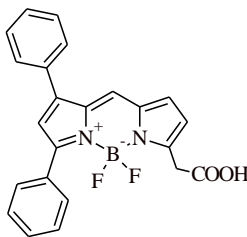
Obrázek 7: Struktura asymetrického cyaninu.

Ad 3) 4,4-difluor-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacenový skelet

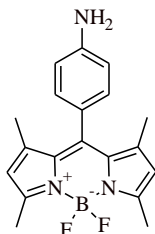
Skupina téměř dvou desítek látek, jejichž společným základem je 4,4-difluor-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen (viz obrázek 8), který je nejčastěji substituován v polohách 1, 3, 5 a 7[89], je na trhu dostupná pod jednotným označením BODIPY[®]. K tomuto názvu je pak většinou doplněno číslo označující absorpční/emisní maximum dané látky, např. 499/508, 630/650. Výhodné vlastnosti této skupiny můžeme demonstrovat na fluoroforu BODIPY FL, je to především vysoký extinkční koeficient ($\epsilon > 80\,000\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$), vysoký kvantový výtěžek fluorescence (téměř 1,0 ve vodě), spektra relativně nezávislá na polaritě rozpouštědla a pH a dále pak úzké emisní spektrum[90]. Oproti fluoresceinu mají BODIPY vyšší fotostabilitu[91]. Tyto fluorofory nejsou příliš často používané pro sondy FRET[92], pro své vlastnosti (nepolární molekula bez elektrického náboje) jsou v praxi využívány především k lokalizaci subcelulárních partikul[90, 93, 94]. Dále jsou využívány pro značení látek, které obsahují volné aminoskupiny, a jejich následnou detekci pomocí HPLC a kapilární elektroforézou[95].



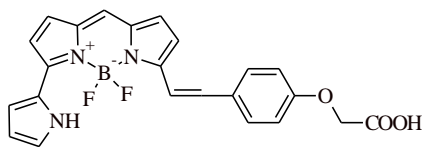
BODIPY 493/503



BODIPY 530/550



BODIPY 499/508

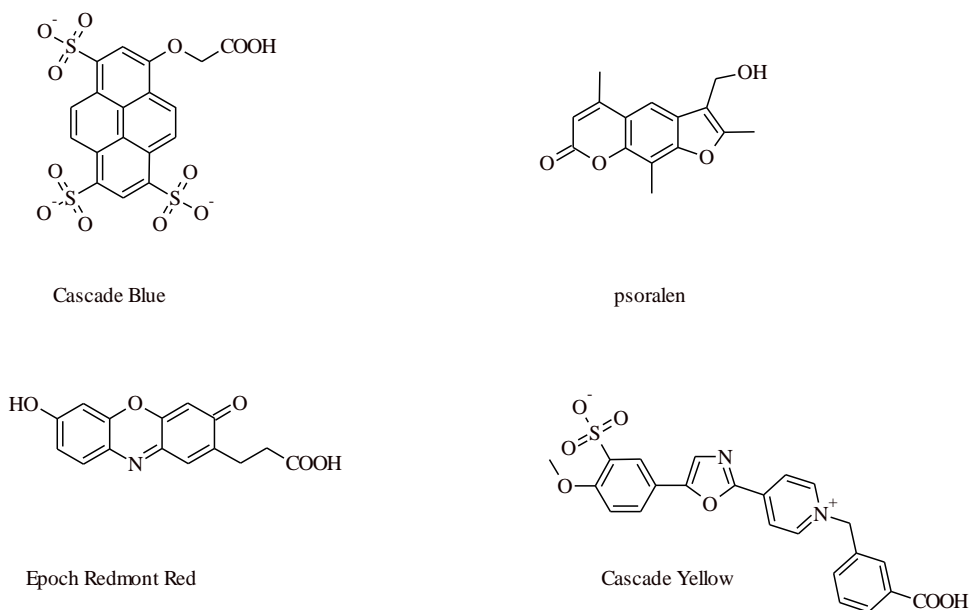


BODIPY 650/665

Obrázek 8: Struktura vybraných fluoroforů odvozených od 4,4-difluor-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacenu.

Ad 4) další strukturní typy

V praxi jsou dále využívány i barviva dalších strukturních základů. Jejich emisní spektra zasahují jak do viditelné oblasti spektra, tak do ultrafialové oblasti. Jako příklad mohou sloužit derivát pyrenu (Cascade Blue[®]), furo[2,3-g]-chromenu (psoralen), deriváty akridinu, 10H-fenoxazinu (Epoch Redmont Red[™]) nebo 4-(5-fenyloxazol-2-yl)-pyridinu (Cascade Yellow[®], Dapoxyl[®]). Jejich názvy jsou mnohdy vytvářeny podle firmy, pro kterou byly připraveny nebo dokonce podle místa, kde byla umístěna daná výzkumná laboratoř (takto vznikl název strukturálně rozdílných látek Cascade[®], ty byly poprvé syntetizovány v laboratořích v americkém pohoří Cascade Mountains).



Obrázek 9: Struktury některých fluoroforů s různou strukturou.

4.4 Přehled používaných quencherů

Použití quencherů je limitováno kromě vzdálenosti mezi donorem a akceptorem energie dvěma hlavními faktory. Prvním z nich jsou jejich spektrální vlastnosti. Pro efektivní přenos energie z fluoroforu na quencher je nutný dostatečný překryv emisního spektra fluoroforu a absorpčního spektra quencheru. Druhým faktorem je dostatečná chemická stabilita při standardních podmínkách syntézy a následného zpracování oligonukleotidu, příp. peptidu. V praxi používané quencherky se dají rozdělit podle několika kritérií.

První způsob rozdělení je na tzv. generace. Je to dělení spíše orientační. Do první, starší skupiny patří látky vykazující vlastní fluorescence, která snižuje citlivost používaných metod, např. tetramethylrhodaminy (TAMRA). Dále potom nefluoreskující quencherky, jejichž nevýhodou je absorpce záření při nízkých vlnových délkách, z čehož plyne možnost použití pouze pro omezenou skupinu fluorescenčních barviv. Představiteli těchto látek jsou deriváty 4-(fenyldiazenyl)anilinu (DABCYL, DABSYL, Epoch Eclipse™ Quencher). Stále jsou používány, ale postupně se přechází ke druhé generaci, která má mnohé výhody.

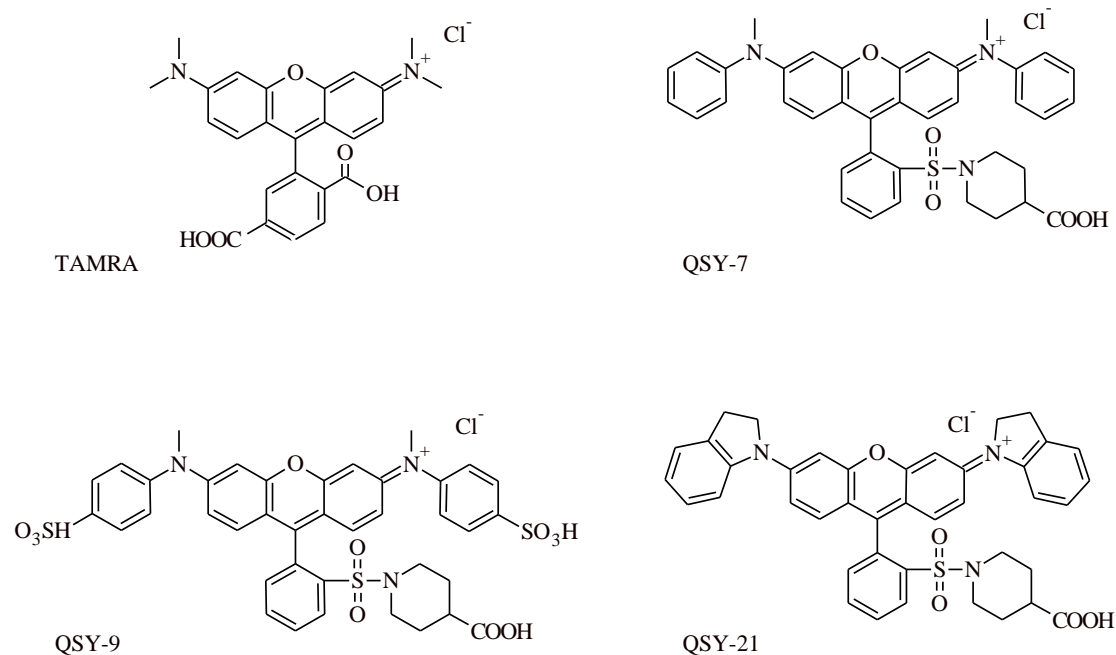
Druhou, novější a větší skupinu tvoří tzv. „dark quenchery“. Jsou to látky s nulovou nebo téměř nulovou fluorescencí. Absence vlastní fluorescence zvyšuje poměr signál/šum a tím zvyšuje citlivost metod, ve kterých jsou používány. Rozsahem absorpce pokrývají téměř celou škálu používaných fluorescenčních barviv. Problémem ale stále zůstávají fluorofory emitující světlo o vysoké vlnové délce, např. Cy5.5[®], Cy7[®]. Mezi quenchery druhé generace se řadí především skupiny látek se souhrnými označeními Black Hole Quenchers[®] (BHQ), QSY[™] a Iowa Black Quenchers[™].

Druhým kritériem pro rozdělení quencherů může být chemická struktura. To je objektivnější dělení. Jako základ používaných quencherů můžeme rozeznat tři společné znaky:

1. xanthen
2. difenyldiazen
3. jiná struktura

Ad 1) xanthen

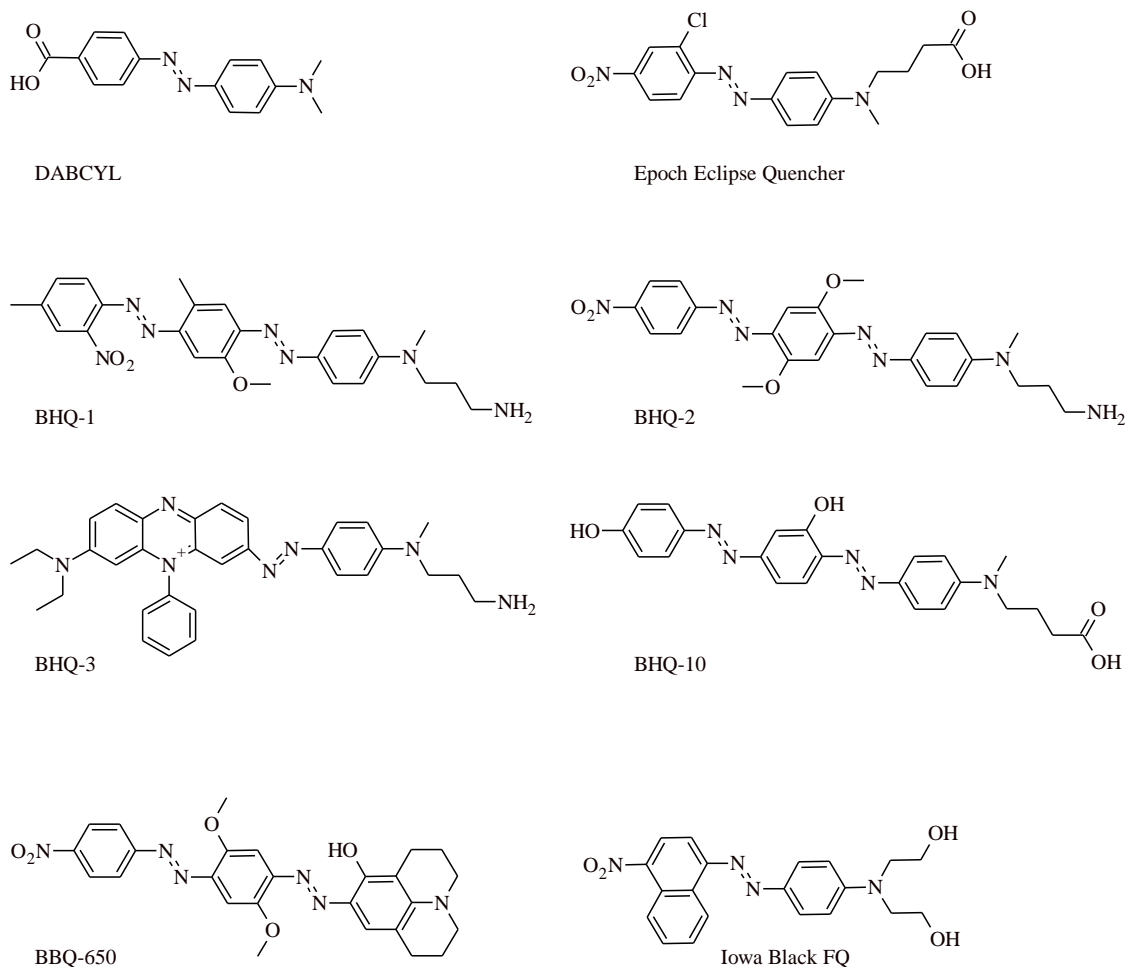
Do této skupiny patří fluorescenční tetramethylrhodamin (TAMRA)[92, 96, 97], první do praxe zavedený quencher. Limitujícím faktorem pro jeho použití je přítomnost dvou absorpčních maxim v oblasti 520 a 550 nm[98]. Dále se pak do této skupiny řadí nefluoreskující quenchery QSY[™] 7, QSY[™] 9 a QSY[™] 21[99]. Jsou to *N,N'*-diarylderiváty rhodaminu. Tato substituce vede k potlačení fluorescence, která se u tohoto strukturního základu jinak vyskytuje a je využívána pro přípravu fluoroforů. Mezi výhody QSY[™] patří vysoký extinkční koeficient (více než 90 000 M⁻¹ cm⁻¹), absorpční spektra nezávislá na pH prostředí a kvantový výtěžek fluorescence < 0,001 ve vodném roztoku a také vysoká chemická stabilita a nízký fotobleaching[100].



Obrázek 10: Struktura quencherů odvozených od 2H-chromenu.

Ad 2) difenyldiazen

Strukturálním znakem zastoupeným u největšího počtu quencherů je přítomnost difenylazoskupiny, a to jedné (např. Dabcyl, Dabsyl, Epoch Eclipse™ Quencher[101], Iowa Black FQ™, BHQ[®]-3[102]) nebo dvou (např. BHQ-1[®], BHQ-2[®], BlackBerry™ Quencher 650 (BBQ-650)). Mezi zástupce patří zhášecí jak z první generace (Dabsyl, Dabcyl), tak z druhé generace (např. BHQ[®]). Jsou to také nejčastěji používané quenchery. Absorpční maxima těchto látek se pohybují v rozmezí 478-672 nm, ale quenchery absorbující při vyšších vlnových délkách mají podle některých autorů nižší chemickou stabilitu při syntéze a purifikaci oligonukleotidického řetězce, což omezuje jejich použití. Za touto nestabilitou může stát konjugovaný systém π -vazeb a/nebo použití silných donor-akceptorových funkčních skupin. To může vést k rozkladu quencherů používanými roztoky, např. roztokem jódu nebo amoniaku a methyloaminu. Vyšší chemickou stabilitu by měl mít quencher s označením BBQ-650, který je konjugován s 8-alkoxyjulolidinem, který překvapivě vykazuje bathochromní posun absorpce v porovnání s podobnými strukturami.

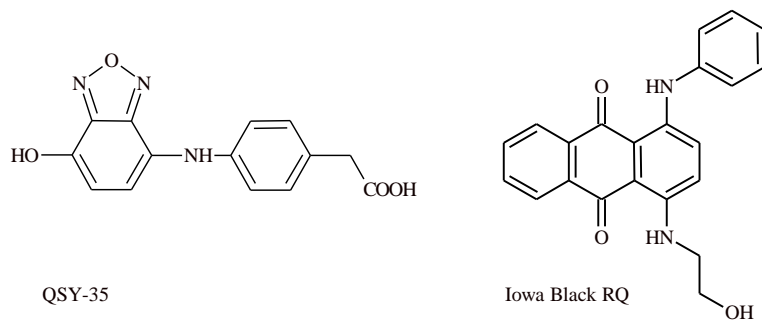


Obrázek 11: Struktury quencherů odvozených od difenyldiazosloučenin.

Ad 3) jiná struktura

Mezi jiné strukturální základy můžeme uvést skelet založený na 1,4-diamino-9,10-antrachinonu. Tento strukturální základ je přítomen pouze u jednoho komerčně dostupného quencheru, a to u Iowa Black Quencher RQ™. Jeho absorpční maximum je 656 nm a je použitelný pro fluorofory v rozsahu 500-700 nm. Tedy v červené oblasti viditelného spektra.

Dalším použitelným strukturálním základem je (2,1,3-benzoxadiazol-4-yl)aminobenzenové uskupení. To je základem používané látky s označením QSY® 35.

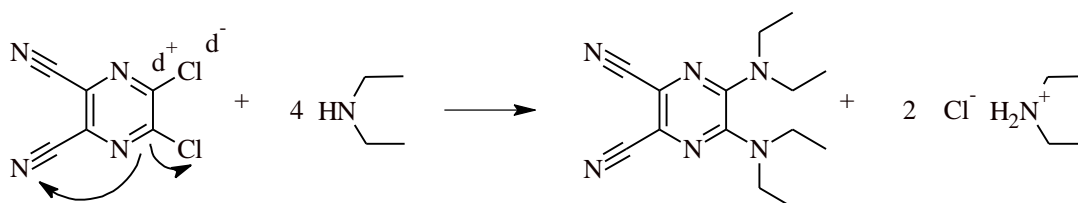


Obrázek 12: Struktura quencherů s odlišnou strukturou.

5 ZVOLENÉ METODY ŘEŠENÍ

5.1 Nukleofilní substituce pyrazindikarbonitrilů

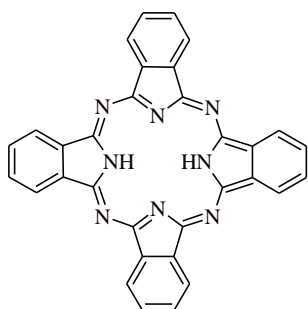
Aminoderiváty pyrazindikarbonitrilu byly připraveny nukleofilní substitucí 5,6-dichlorpyrazin-2,3-dikarbonitrilu. Nukleofilní substituce na pyrazinovém jádře je v tomto případě usnadněna přítomností elektron-odtahující karbonitrilové skupiny a odstupujícího atomu chlóru. Jako nukleofily mohou vystupovat aminy, alkoholáty nebo thioláty. Při reakci s aminem je vznikající molekula chlorovodíku neutralizována druhou molekulou aminu a vzniká příslušný ammonium hydrochlorid, který je v organickém rozpouštědle málo rozpustný. Toho lze dosáhnout také přidáním uhličitanu draselného nebo organické baze (např. pyridin, triethylamin). Tím je posunována rovnováha reakce ve prospěch produktu.



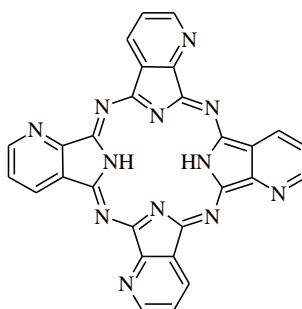
5.2 Charakterizace azaftalocyaninů

Struktura oktaazaftalocyaninů (AzaPc) je odvozena od ftalocyaninů (Pc) izosterní záměnou methinové skupiny $-\text{CH}=\text{}$ v benzenovém kruhu atomy dusíku. Podle počtu a polohy zaměněných methinových skupin se rozeznávají[103]:

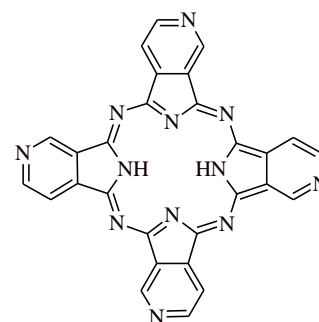
Výchozí látka	Produkt
pyridin-2,3-dikarbonitril	α -tetrapyridoporfyrazin
pyridin-3,4-dikarbonitril	β -tetrapyridoporfyrazin
pyridazin-3,4-dikarbonitril	α -tetrapyridazinoporfyrazin
pyridazin-4,5-dikarbonitril	β -tetrapyridazinoporfyrazin
pyrimidin-4,5-dikarbonitril	tetrapyrimidinoporfyrazin
pyrazin-2,3-dikarbonitril	tetrapyrazinoporfyrazin



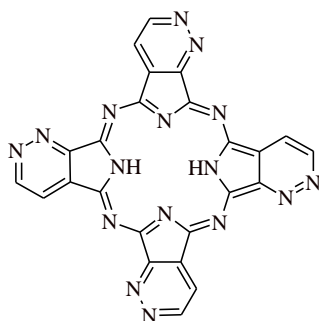
ftalocyanin



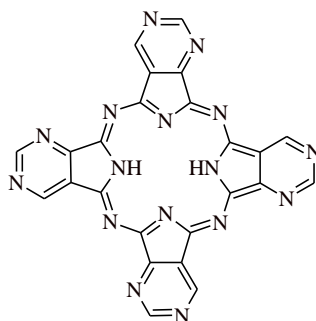
a- tetrapyridoporfyrazin



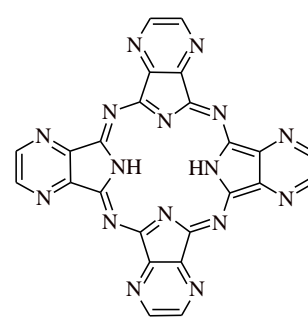
b- tetrapyridoporfyrazin



tetrapyridazinoporfyrazin



tetrapyrimidinoporfyrazin



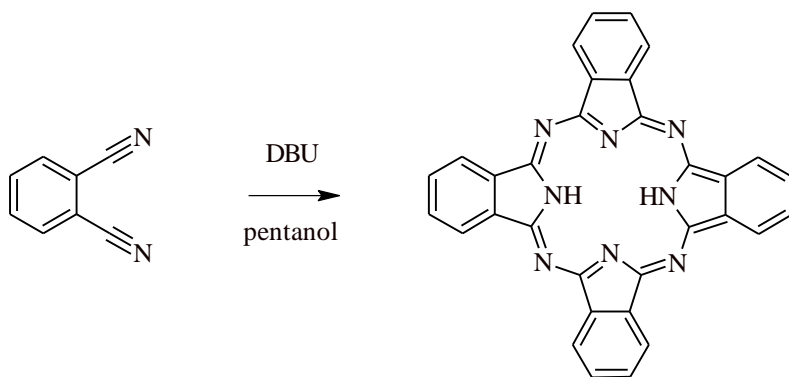
tetrapyrazinoporfyrazin

Syntéza AzaPc probíhá stejným mechanismem jako syntéza častěji studované předlohy skupiny Pc. AzaPc mohou být připraveny stejně jako Pc z různých substituovaných derivátů heterocyklických sloučenin 1,2-dikarbonitrilů [104-108], 1,2-dikarboxylových kyselin [109], anhydridů 1,2-dikarboxylových kyselin [110-112], ftalimidů [113, 114], diiminoisindolinů [115-117], 2-kyano-1-karboxamidů [118, 119] nebo z 1,2-dibrombenzenů [120-122] tetramerizací ve výše vručím rozpouštědle nebo přímým zahříváním výchozích látek (často smíchaných s močovinou). Podobná je i

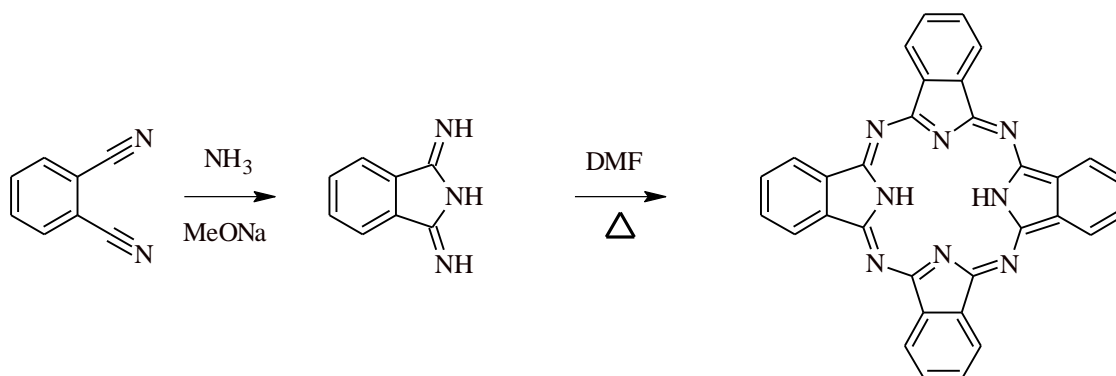
reaktivita těchto sloučenin v porovnání s Pc, nejčastěji podléhají výměně centrálně chelatovaného atomu[123, 124], případně reakcím na periferních řetězcích.

5.3 Syntéza ftalocyaninů

Pc bez chelatovaného centrálního atomu (bezkovové Pc) se nejčastěji připravují z 1,2-dikarbonitrilů cyklizací s alkoholátem v alifatickém alkoholu. Tento alkoholát se připravuje buď působením silné organické báze 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-enu (DBU)[125] nebo častěji alkalického kovu, především lithia[124], které jsou koordinovány velice slabě a uvolňují se v kyselém prostředí (dostatečnou kyselost vykazuje už voda). Cheláty s kovy alkalických zemin jsou také málo stabilní a poskytují bezkovové deriváty v přítomnosti silnější kyseliny (např. kyseliny *p*-toluensulfonové)[126].



Dalším způsobem přípravy bezkovových Pc je cyklizace reaktivního derivátu ftalonitrilu 1,3-diiminoisoindolinu, připraveného zaváděním plynného amoniaku do methanolického roztoku ftalonitrilu s katalytickým množstvím methoxidu sodného[127-129]. Tento meziprodukt dále poskytuje příslušný Pc zahříváním ve výše vroucím alkoholu[130], např. dibutylaminoethanolu, diethylaminoethanolu, chinolinu[131, 132] nebo formamidu[133].



Do centra těchto makrocyclických látek může být chelátován atom kovu nebo polokovu. V současné době jsou známy Pc obsahující prakticky všechny známé kovy i polokovy. Přítomnost tohoto ligandu do určité míry ovlivňuje vlastnosti daného Pc, a to především spektrální, fotofyzikální a oxidační. V praxi se tyto komplexy připravují dvěma základními způsoby. Buď vložением centrálního atomu do bezkovového Pc reakcí se solí daného ligandu (ve většině případů se používají chloridy, příp. organické soli), nebo se kovové Pc připravují přímo z prekurzorů reakcí s danou solí. Ale ani tyto dvě metody nejsou aplikovatelné pro všechny ligandy, pro přípravu křemičitých[134, 135] a rheničitých[136, 137] Pc a subftalocyaninů komplexujících bor[138] je nutno často použít specifických metod.

Připravené Pc mohou být dále derivatizovány především na periferních substituentech, základní makrocycklus je dostatečně stabilní a dalším substitucím podléhá pouze do určité míry. Při reakcích na základním makrocyckladu Pc vzniká směs látek obsahující různý počet substituentů. Průmyslově se používá chlorace[139, 140] a pro přípravu ve vodě rozpustných barviv sulfonace[141, 142].

Na periférii makrocyckladu mohou být různé funkční skupiny podléhající dalším specifickým reakcím. Toho je využíváno pro přípravu Pc nedostupných přímou cyklizací výchozího derivátu ftalonitrilu (např. tetraaminoftalocyanin[143, 144]), pro vazbu Pc s jinou molekulou (fulleren[145, 146], ferrocen[147-149]) nebo pro navázání na polymerní nosič[130]. Další možností je reakce na centrálním atomu[118, 150, 151], kdy je ale reaktivita plně závislá na vlastnostech použitého ligandu.

5.4 Příprava nesymetrických ftalocyaninů

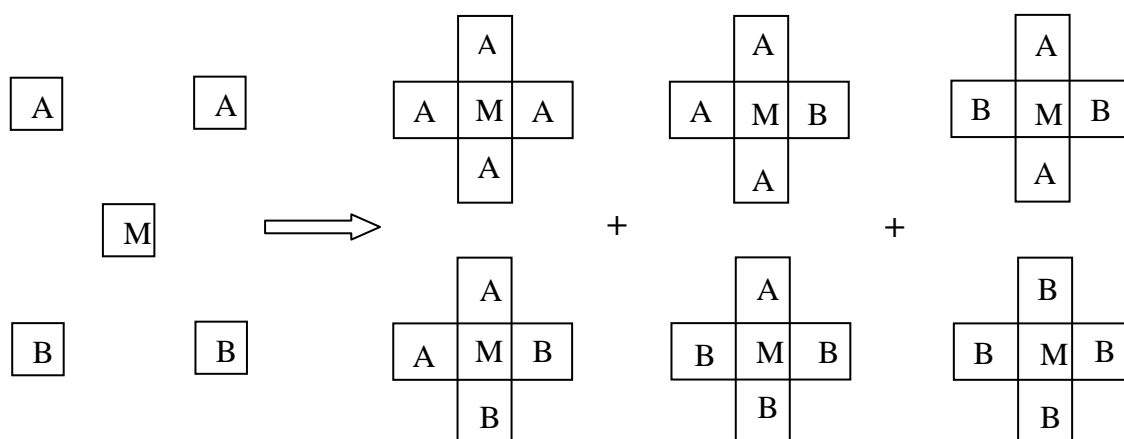
Jako nesymetrické jsou označovány Pc složené ze dvou různě substituovaných isoindolových podjednotek. Ty si pro zjednodušení můžeme označit jako podjednotku A a podjednotku B. Vzájemný poměr produktů (A_3B_1 nebo A_2B_2) je do značné míry ovlivnitelný postupem tetramerizace. Nejběžněji používané postupy jsou:

1. statistická kondenzace
2. rozšíření subftalocyaninu (SubPc)
3. metoda syntézy na pevné fázi
4. specifické syntézy ftalocyaninů typu A_2B_2

Ad 1) statistická kondenzace

Nejjednodušší způsob přípravy nesymetrických Pc typu A_3B a dalších je tetramerizace směsi dvou rozdílně substituovaných ftalonitrilů postupem obdobným přípravě symetrických Pc. Tato metoda je neselektivní a vede ke směsi šesti Pc (viz. obrázek 13), kterou je nutno rozdělit pomocí chromatografie[152-155]. Obecně je uváděno, že dělení takovýchto směsí je složité, především kvůli tendenci Pc k agregaci.

Statistická kondenzace se používá zejména pro přípravu Pc obecného vzorce A_3B , tedy skládajícího se ze tří stejných a jedné odlišné isoindolové podjednotky, nebo pokud chceme izolovat všechny produkty[156-158]. Statistické úvahy předpokládají, že reakcí dvou různých Pc s prakticky stejnou reaktivitou v poměru 3:1 vznikne směs produktů v procentuálním zastoupení A_4 (33%), A_3B (44%) a ostatní kongenery (23%). V praxi se výtěžek vyizolovaného kongeneru A_3B z reakce při použití poměru prekurzorů 3:1 pohybuje většinou v rozmezí 10-20 % [152-154].

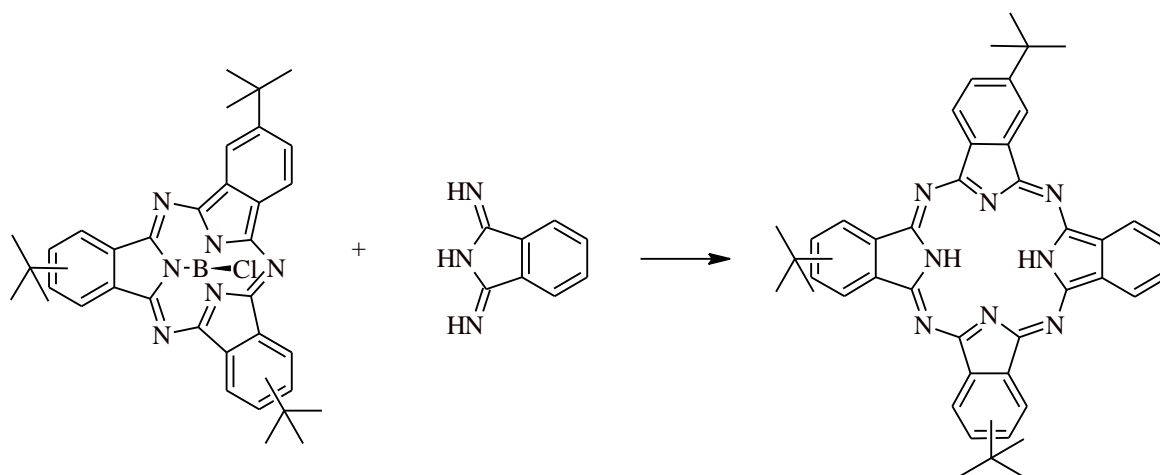


Obrázek 13: Schematické znázornění statistické kondenzace nesymetrických Pc, kde A a B jsou dva rozdílně substituované prekurzory a M je atom kovu, který je chelaován do centra Pc.

Někteří autoři používají poměr výchozích ftalonitrilů 9:1[159, 160]. Tento poměr vede ke zvýšení výtěžku kongeneru A_4 a snížení výtěžku A_3B . Zbylé kongenery se při této reakci takřka vůbec netvoří. Hlavním důvodem bývá zjednodušení separace produktu A_3B ze směsi. Poměr 9:1 je také výhodný, pokud prekurzor B je o hodně reaktivnější než prekurzor A[161]. Tím se snižuje výtěžek produktu s více než jednou podjednotkou B.

Ad 2) rozšíření subftalocyaninu

Nejstarší metodu selektivní syntézy nesymetrických Pc typu A_3B vyvinul Kobayashi a kolektiv koncem 80. let 20. století[138]. Jedná se o rozšíření subftalocyaninu (SubPc) o jednu isoindolovou podjednotku na Pc. To se provádí reakcí SubPc se sukcinimidovým nebo diiminoisoindolinovým prekurzorem. V jádru SubPc je velké geometrické pnutí a to se může uvolnit vložením jedné isoindolové podjednotky. Tím dojde k vytvoření Pc typu A_3B . V některých případech je tato metoda velmi selektivní a efektivní a může vést k přípravě jinak nedostupných derivátů.



Obrázek 14: Příprava nesymetrického Pc metodou rozšíření SubPc o jednu isoindolovou podjednotku.

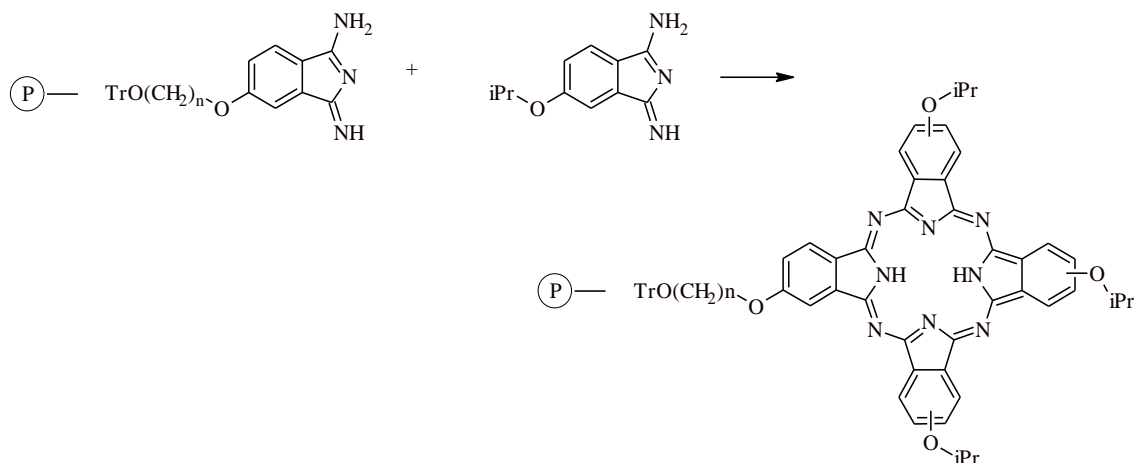
Dnes už je známo, že výsledek této metody závisí na použitých reakčních podmínkách a výchozích substancích[162-165]. Nejčastěji se tento typ reakce provádí s 6-9-ti násobným molárním přebytkem diiminoisoindolinového derivátu ve směsi DMSO/1-chlornaftalenu nebo (diethylamino)ethanolu po dobu 5-12 hodin při teplotě 80-100 °C. Výtěžky reakce se pohybují v rozmezí 3-90 %.

V roce 1995 bylo poprvé publikováno, že při expanzi subftalocyaninového kruhu dochází k částečné nebo úplné fragmentaci SubPc kruhu následované statistickým vytvořením Pc jádra[163, 166]. Tím dochází k tvorbě směsi všech možných kombinací diiminoisoindolinových podjednotek přítomných ve výchozích prekurzorech. Tím metoda ztrácí selektivitu pro pouze kongener A_3B . Přítomnost kovového templátu zvyšuje výtěžek nesymetrického kongeneru A_3B [162]. Dále bylo prokázáno, že SubPc reagují s méně reaktivními ftalonitrilovými deriváty v přítomnosti silné base, např. DBU[162].

Nejlepší výtěžky a selektivita byla dosažena při rozšiřování SubPc bez substituentů nebo nesoucí elektron odtahující skupinu a diiminoisoindolinovým derivátem nesoucím elektron donorovou skupinu. Širšímu využití této metody brání pouze její nepředvídatelnost. Dále touto metodou nelze připravit alkoxy substituované deriváty z důvodu štěpení etherické vazby bromidem boritým (BBr_3) používaným pro přípravu SubPc.

Ad 3) metoda syntézy na pevné fázi

Druhým přístupem k selektivní syntéze kongenerů A_3B , který vyvinul Leznoff a kolektiv, je syntéza na pevné fázi[167]. Tato metoda zahrnuje vazbu vhodné substituovaného ftalonitrilu (B) na polymerní nosič nebo modifikovaný silikagel. Tento nerozpustný nosič může dále reagovat s jiným odlišně substituovaným ftalonitridem (A) za vzniku Pc A_3B vázaného na polymerní nosič. Ten je poté nutné uvolnit z pevné fáze. V literatuře je udáváno, že tímto postupem bylo dosaženo výtěžku 20-25 % [167].



Obrázek 15: Příklad syntézy nesymetrického Pc na pevné fázi.

Velkým omezením této metody je nutnost použití ftalonitrilu s funkční skupinou umožňující vazbu na pevnou fázi a její následné rozštěpení. Tato metoda také není vhodná pro přípravu nesymetrických Pc ve větším množství.

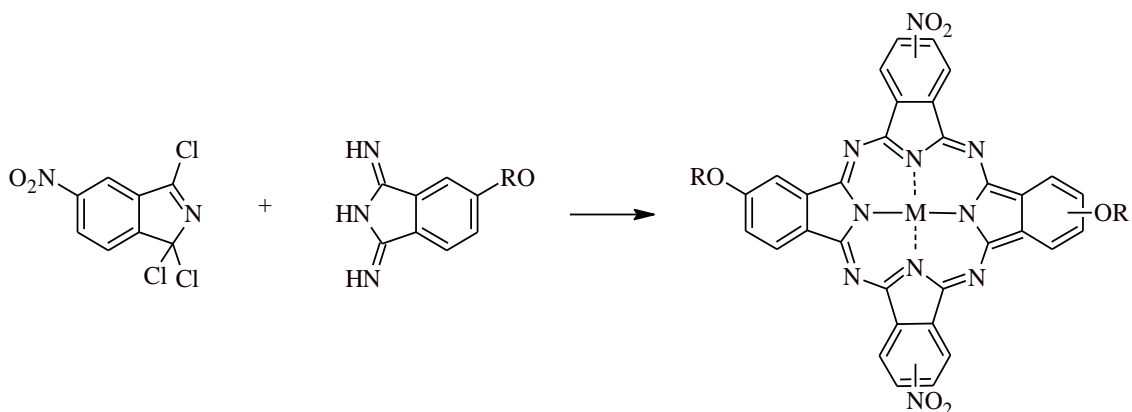
Ad4) specifické syntézy ftalocyaninů typu A_2B_2

Deriváty A_2B_2 se ve směsích vzniklých statistickou kondenzací vytvářejí v malých množstvích a navíc se skládají ze směsi dvou isomerů, ABAB a AABB. Ty mají velice podobnou rozpustnost a mohou být eluovány ze sloupce prakticky ve stejnou dobu. Proto byly vyvinuty specifické metody pro přípravu výhradně jednoho z výše uvedených isomerů.

Syntéza ABAB ftalocyaninů (Crosswise-substituted Pc)

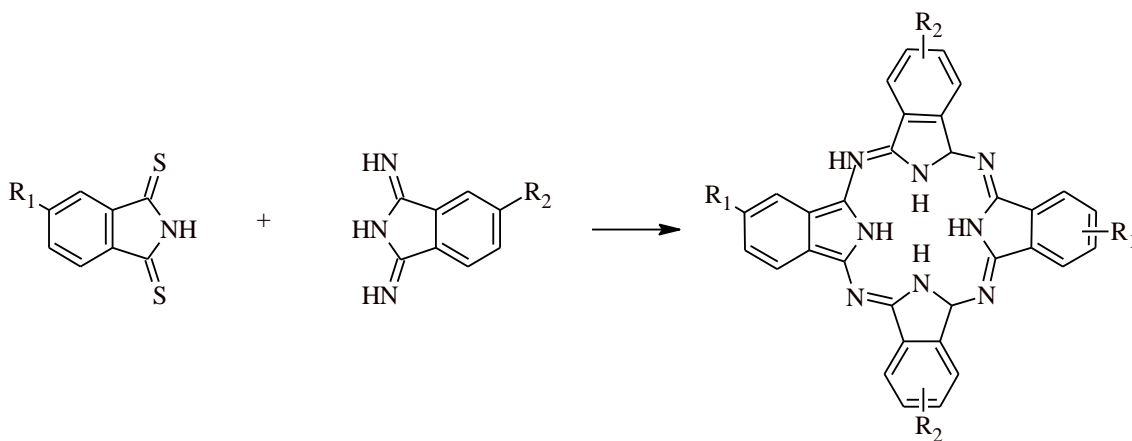
Syntéza kongenerů ABAB za mírných podmínek byla popsána Youngem a kol[168]. Vycházeli z ekvivalentních množství dvou různých prekurzorů (1,3-diiminoisoindolin a 1,1,3-trichlor-1H-isoindol). Tyto dva deriváty spolu reagují za mírných podmínek v přítomnosti silné base a redukčního činidla za vzniku Pc typu

ABAB. Výtěžek této reakce se pohybuje okolo 50 % a autoři udávají, že vzniká pouze kongener ABAB. Další autoři uvádějí nižší výtěžky (15-25%) a také, že vzniká kongener AAAB jako vedlejší produkt[169-172]. Nicméně, tato metoda vede k syntéze požadovaného kongeneru s vysokou selektivitou.



Obrázek 16: Příklad syntézy nesymetrického Pc typu ABAB.

Druhým publikovaným postupem je cross-kondenzační reakce 1,3-diiminoisoindolinu s 1*H*-isoindol-1,3-(2*H*)-dithionem v molárním poměru 1:1. V tomto případě byl popsán vznik kongeneru Pc typu ABAB s příměsí všech potenciálně vznikajících Pc[173].



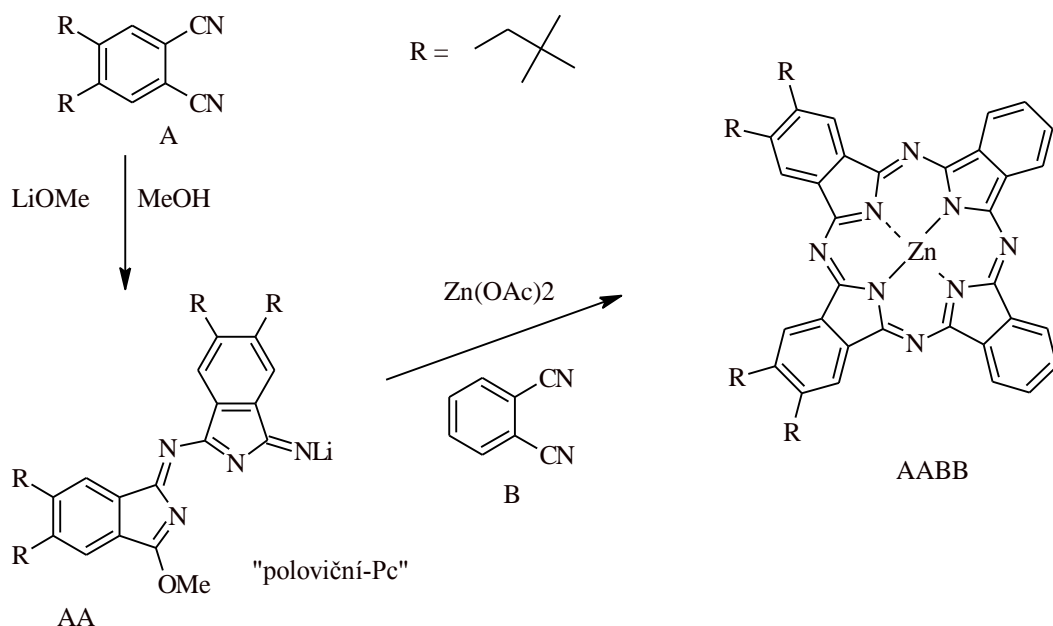
Obrázek 17: Schematické znázornění přípravy nesymetrického Pc typu ABAB.

Syntéza AABB ftalocyaninů (Adjacent Pc)

Pro přípravu kongenerů AABB jsou popsány především dvě metody. Jedna využívá tzv. „poloviční-Pc“ a druhá vychází z bis(ftalonitrilů).

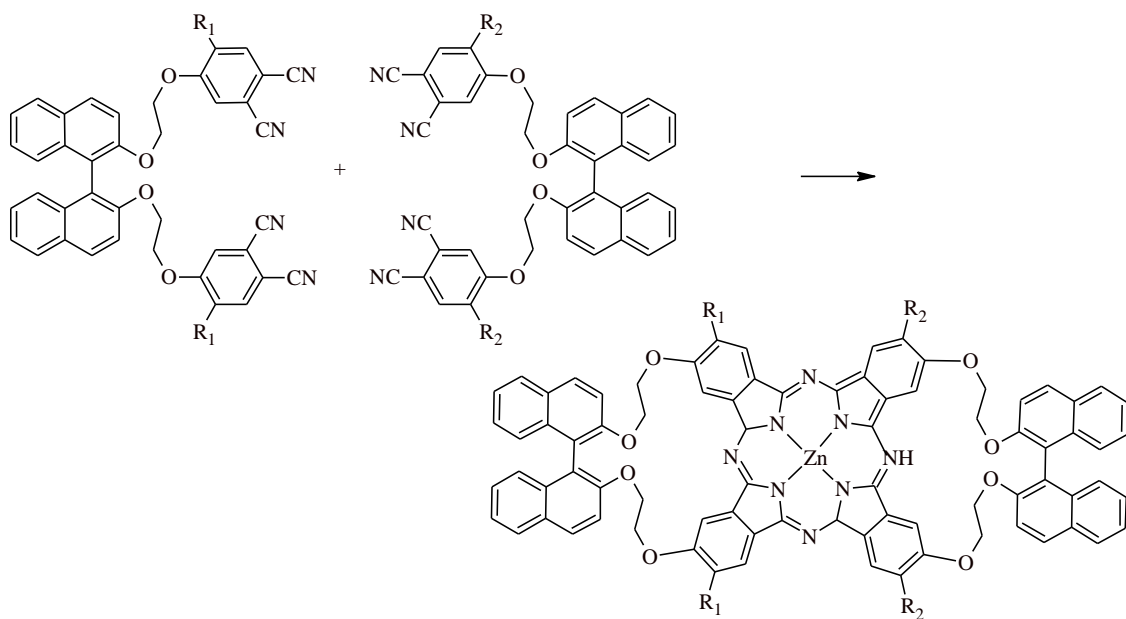
Metoda využívající „polovičních-Pc“ intermediátů, které jsou izolovatelné z reakční směsi, dává vzniknout Pc typu AABB za mírných podmínek s odlišně

substituovaným ftalonitrilem[174]. Pouze „poloviční-Pc“ nesoucí silně elektron odtahující skupinu jsou dostatečně stabilní a izolovatelné.



Obrázek 18: Příprava nesymetrického Pc typu AABB.

Kobayashi použil pro přípravu Pc typu AABB bis(ftalonitril) vázaný prostorově vhodnou skupinou, např. 2,2'-dihydroxy-1,1'-binaftyl[175-177]. Tento prekurzor dále reagoval s jiným ftalonitrilem za vzniku „adjacent Pc“ ve 20-25% výtěžku.



Obrázek 19: Příprava nesymetrického Pc typu AABB,

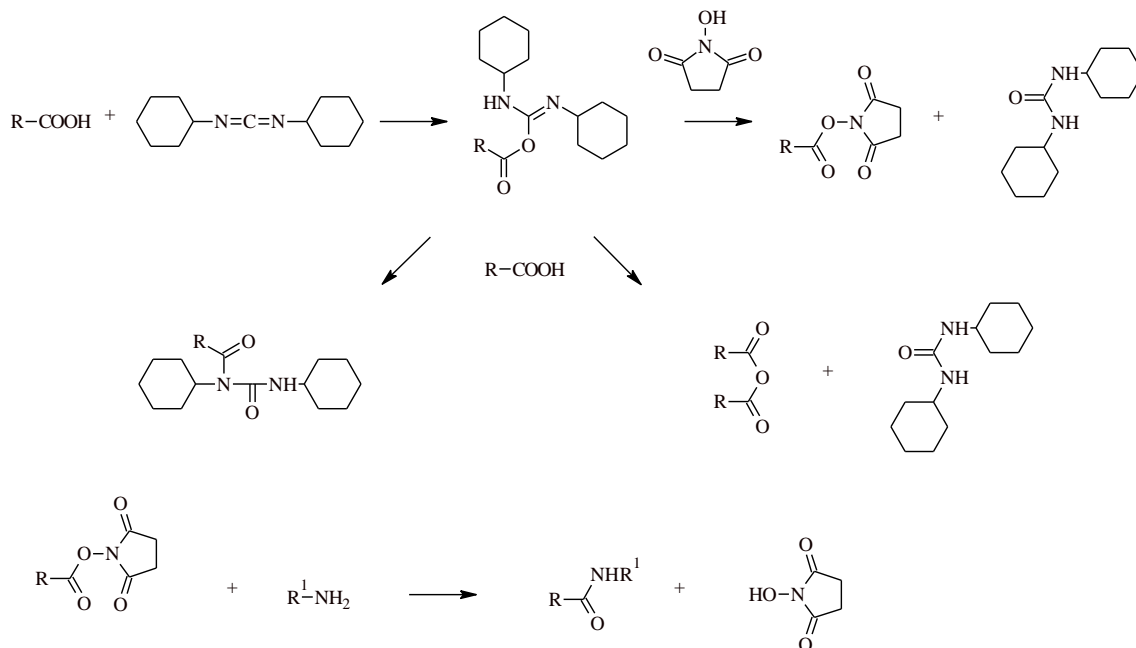
5.5 Příprava amidů a esterů

Pro přípravu amidů, resp. esterů připravených nesymetrických AzaPc nemohly být použity metody zahrnující převedení karboxylové kyseliny na reaktivní acylhalogenid a následnou reakci s aminem, případně alkoholem. Důvodem je nízká stabilita AzaPc v přítomnosti běžně používaných reagensů (SOCl_2 , POCl_3 , PCl_5). Proto byly k amidaci a esterifikaci použity metody standardně používané především v chemii peptidů.

Příprava „aktivního esteru“ a jeho aminolýza

Jako tzv. aktivní estery se označují především sukcinimidylestery a pentafluorofenylestery karboxylových kyselin. Ty jsou hojně využívány např. v imunologii a molekulární biologii. Komerčně jsou dostupné aktivní estery mnoha fluorescenčních barviv, které je možné i ve vodném prostředí vázat na biologicky aktivní molekuly obsahující volné aminoskupiny a tím je lokalizovat za použití fluorescenčních technik. Často používanou metodou přípravy sukcinimidylesteru je reakce karboxylové kyseliny s karbodiimidem, např. s *N,N'*-dicyklohexylkarbodiimidem (DCC) a *N*-hydroxysukcinimidem (HOSu). Při reakci vzniká příslušný derivát močoviny. V případě DCC je to téměř nerozpustná *N,N'*-dicyklohexylmočovina, kterou je možné odfiltrovat. Vzniklý ester je dostatečně stabilní, takže je možné ho izolovat. Následně je podrobován aminolýze za vzniku amidů, a to i aminoalkoholy. Jeho velkou výhodou je dostatečná stabilita ve vodném prostředí, která je mnohdy potřebná pro nedostatečnou rozpustnost především biomolekul v organických rozpouštědlech. Pro reakce prováděné na pevných fázích byly vyvinuty i další karbodiimidy, které na rozdíl od DCC dávají jako vedlejší produkt rozpustné disubstituované deriváty močoviny. Jako příklad můžeme uvést 1-[3-(dimethylamino)propyl]-3-ethylkarbodiimid-hydrochlorid (EDC). Největší nevýhodou použití karbodiimidů je tvorba vedlejších produktů, derivátů *N*-acylmočoviny. To je zapříčiněno mechanismem reakce, který zahrnuje vytvoření *O*-acyl-isomočoviny navázáním karboxylové skupiny na karbodiimid. Tento reaktivní intermediát reaguje

s alkoholem (*N*-hydroxysukcinimidem) nebo aminem za vzniku stabilního produktu. Druhou cestou je tvorba symetrických anhydridů z *O*-acyl-isomočoviny a dosud nezreagované karboxylové kyseliny. Dále pak dochází ke kompetici mezi aminem a nukleofilním centrem o acylový zbytek na *O*-acyl-isomočovine a to vede k tvorbě nereaktivního vedlejšího produktu *N*-acylmočoviny.



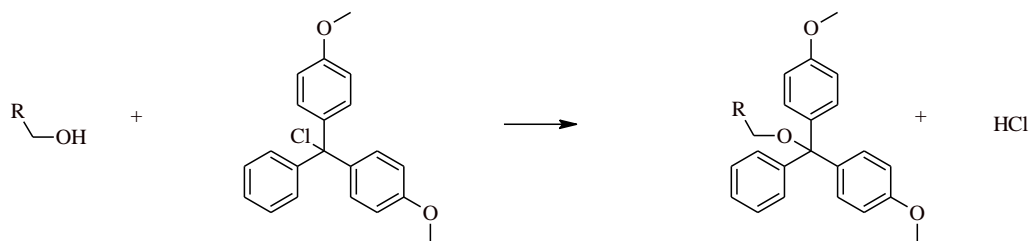
Obrázek 20: Příprava amidu pomocí „aktivního“ esteru a vedlejší reakce.

Uroniové aktivátory

První progenitor uroniových reagensů *O*-(benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-hexafluorofosfát (HBTU) byl popsán v roce 1978 a od této doby bylo publikováno mnoho analogů [178, 179]. Jako ne-nukleofilní párové ionty (counterionty) jsou běžně používány hexafluorofosfátové a tetrafluorborátové anionty. Ze srovnávacích studií vyplynulo, že counterion nemá významný vliv na reaktivitu ani racemizaci produktu.

[Zvolené metody řešení]

po převedení hydroxylové skupiny na alkoholát a to navíc za zvýšené teploty. V případě terciárního alkylhalogenidu tato reakce probíhá přímo s hydroxylovou skupinou již při laboratorní teplotě.



Obrázek 22: Chránění primární hydroxylové skupiny pomocí dimethoxytritylchloridu (DMTrCl).

6 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

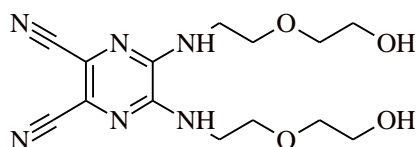
Všechny použité výchozí suroviny byly použity přímo v kvalitě výrobce a nebyly dále čištěny. Bezvodá rozpouštědla tetrahydrofuran, dioxan byla připravena sušením nad sodíkem, butanol byl sušen hořčíkem zahříváním pod zpětným chladičem a byl oddestilován v čas potřeby. Bezvodý pyridin byl vysušen stáním nad hydroxidem draselným a destilací. Bezvodý triethylamin byl zakoupen od firmy Sigma-Aldrich. Tenkovrstvá chromatografie (TLC) byla prováděna na deskách Silica gel 60 F₂₅₄ (Merck, Darmstadt, Německo). Pro sloupcovou chromatografii byl používán silikagel Merck Kieselgel 60 (0,040-0,063 mm). Teploty tání byly měřeny na přístroji Electrothermal IA9000 Series Digital Melting point Apparatus (Electrothermal Engineering Ltd., Southend-on-Sea, Essex, Velká Británie) a nejsou korigovány. Infračervená spektra byla měřena v peletách KBr na přístroji IR-Spectrometer Nicolet Impact 400. ¹H a ¹³C NMR spektra byla měřena na přístroji Varian Mercury-Vx BB 300 (299,95 MHz-¹H a 75,43 MHz-¹³C), chemický posun je udáván relativně k signálu vnitřního standardu Si(CH₃). UV-Vis spektra byla naměřena na spektrofotometru UV-2401PC, Shimadzu Europa GmbH (Duisburg, Německo). Fluorescence byla měřena na přístroji AMINCO-Bowman Series 2 luminescence spectrometer (SLM-Aminco, Urbana, IL, USA). Hmotnostní spektra byla změřena na přístrojích Quattro MicroTM API (Waters, Milford, Massachusetts, USA) ionizační metodou elektrosprej v pozitivním módu (MS-ESI) nebo na přístroji Voyager-DE STR (Applied Biosystems, Framingham, Massachusetts, USA) v pozitivním reflektrotronovém módu (MS-MALDI-TOF). Roztoky pro ESI MS byly připraveny rozpuštěním látek v acetonitrilu (pro látku **17**) a v methanolu (ostatní látky), a byla přidána kyselina mravenčí pro podporu ionizace. Adukty s Na⁺, K⁺ a kyselinou mravenčí byly vždy pozorovány v hmotnostních spektrech AzaPc jako minoritní signály. Vzorokly pro MS-MALDI-TOF byly připraveny nanesením 0,5 μl roztoku na destičku, vysušením na vzduchu a překrytím 0,5 μl roztoku matrice. Ta se skládala z 10 mg kyseliny α-kyan-4-hydroxyskořicové v 100 μl acetonitrilu v 0,1% kyselině trifluoroctové. Přístroj byl kalibrován za použití externího pětibodového kalibračního standardu Peptide Calibration Mix1 (LaserBio Labs, Sophia-Antipolis, Francie). HPLC analýzy byly prováděny na přístroji Shimadzu system LC-20AD Prominence s SPD M20A diode array detektorem (Shimadzu, Japonsko).

Chromatografická kolona Phenomenex Synergy RP Fusion se zakotvenými polárními skupinami, 75 x 3 mm, velikost částí 4 μm , (Phenomenex, USA) byla vybrána jako nejvhodnější. Oligonukleotidové sondy byly syntetizovány na přístroji Perkin Elmer ABI 392/394 RNA/DNA Synthesizer (Waltham, Massachusetts, USA). Black Hole Quencher[®]-2 (BHQ-2[®]) byl zakoupen od firmy Glen Research (Sterling, Virginia, USA).

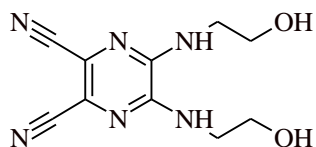
6.1 Syntéza pyrazin-2,3-dikarbonitrilů

Sloučeniny **5,6-dichlorpyrazin-2,3-dikarbonitril (1)**[181], **kyselina 6-(3-chlor-5,6-dikyan-pyrazin-2-ylamino)hexanová**[182] (**8**) a **kyselina 6-(5,6-dikyan-3-diethylaminopyrazin-2-ylamino)hexanová**[182] (**9**) byly připraveny podle literatury a všechna analytická data odpovídala uváděným hodnotám.

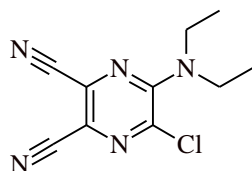
6.1.1 5,6-Bis-[2-(2-hydroxyethoxy)-ethylamino]-pyrazin-2,3-dikarbonitril (2)



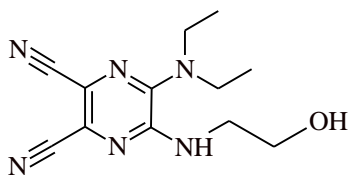
K roztoku látky **1** (500 mg, 2,5 mmol) v tetrahydrofuranu (50 ml) byl za míchání po kapkách přidán 2-(2-aminoethoxy)ethanol (1,12 g, 10,7 mmol). Reakční směs byla míchána při laboratorní teplotě 3 hodiny. Roztok byl dekantován od olejovitých kapek, odpařen za sníženého tlaku a přečištěn sloupcovou chromatografií na silikagelu s mobilní fází ethylacetát/methanol 8:1. Produkt byl překrytalizován z ethanolu a vody. Byla získána látka **2** (410 mg, 49 %) ve formě bílých jehliček; T.t. 169,5-170,8 °C. IR (KBr): ν_{max} = 3343; 2925; 2897; 2876; 2226 (CN); 1623; 1563; 1524; 1398; 1135 a 1069 cm^{-1} . ¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ = 7,94 (2H, s, NH); 4,60 (2H, s, OH) a 3,65-3,40 (16H, m, CH₂) ppm. ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-d₆): δ = 144,2; 118,4; 116,4; 72,4; 68,1; 60,4 a 41,4 ppm.

6.1.2 5,6-Bis-(2-hydroxyethylamino)pyrazin-2,3-dikarbonitril (3)

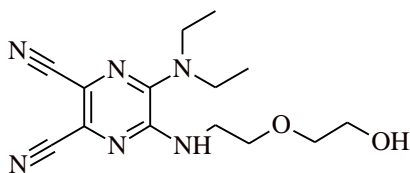
K roztoku látky **1** (500 mg, 2,5 mmol) v tetrahydrofuranu (50 ml) byl za míchání po kapkách za laboratorní teploty přidán 2-aminoethanol (652 mg, 10,7 mmol) Reakční směs byla dále míchána 3 hodiny. Vzniklý precipitát byl odfiltrován a filtrát byl odpařen za sníženého tlaku. Produkt byl přečištěn sloupcovou chromatografií na silikagelu s mobilní fází ethylacetát/methanol 6:1 a překrytalizován z vody. Byla získána látka **3** (569 mg, 91 %) ve formě bílých jehliček. T.t. 185,5-186,0 °C (za rozkladu). IR (KBr): ν_{\max} = 3483; 3347; 3289; 3196; 3091; 2950; 2937; 2889; 2229 (CN); 1604; 1560; 1518; 1460; 1396; 1076 a 1060 cm^{-1} . ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6): δ = 7,95(2H, s, NH); 4,87 (2H, s, OH); 3,58 (4H, t, J = 5,5 Hz, $\text{CH}_2\text{-O}$); 3,44 (4H, br s, $\text{CH}_2\text{-NH}$) ppm. ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6): δ = 144,3; 118,3; 116,5; 58,7 a 44,1 ppm.

6.1.3 5-Chlor-6-diethylaminopyrazin-2,3-dikarbonitril (4)

K roztoku látky **1** (2,4 g, 12 mmol) v tetrahydrofuranu (100 ml) byl za vnějšího chlazení směsí led/sůl za vydatného míchání po kapkách přidán diethylamin (1,77 g, 24 mmol) Reakční směs byla dále míchána za postupného samovolného ohřátí na laboratorní teplotu a poté byl odfiltrován vzniklý diethylammonium hydrochlorid. Filtrát byl odpařen za sníženého tlaku a přečištěn sloupcovou chromatografií na silikagelu s mobilní fází hexan/ethylacetát 4:1. Byl získán produkt **4** (2,66 g, 93 %) ve formě žlutého oleje. IR (KBr): ν_{\max} = 2987; 2939; 2876; 2233 (CN); 1553; 1507; 1439; 1386 a 1358 cm^{-1} . ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ = 3,75 (4H, q, J = 7,1 Hz, CH_2) a 1,31 (6H, t, J = 7,0 Hz, CH_3) ppm. ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ = 151,3; 135,0; 139,4; 117,3; 113,2; 113,0; 45,5 a 13,0 ppm.

6.1.4 5-Diethylamino-6-(2-hydroxyethylamino)pyrazin-2,3-dikarbonitril (5)

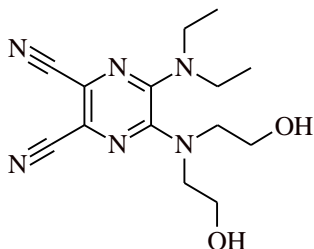
K roztoku látky **4** (1,0 g, 4,25 mmol) v tetrahydrofuranu (50 ml) byl za laboratorní teploty za míchání po kapkách přidán 2-aminoethanol (0,78 g, 12,75 mmol). Reakční směs byla dále míchána 5 hodin. Směs byla odpařena za sníženého tlaku, zbytek byl rozpuštěn v chloroformu (50 ml) a třikrát extrahován vodou (50 ml). Organická fáze byla vysušena Na_2SO_4 , odpařena za sníženého tlaku a přečištěna sloupcovou chromatografií na silikagelu s mobilní fází dichlormethan/aceton 3:1. Produkt byl překrystalizován z ethanolu a vody. Byl získán produkt **5** (840 mg, 76 %) ve formě žlutých jehliček. T.t. 102,0-103,0 °C. IR (KBr): $\nu_{\text{max}} = 3493; 3320; 2974; 2229$ (CN); 1557; 1532; 1426; 1270 a 1049 cm^{-1} . ^1H NMR (300 MHz, aceton- d_6): $\delta = 6,71\text{--}6,57$ (1H, br s, NH); 4,07 (1H, t, $J = 5,5$ Hz, OH); 3,79 (2H, q, $J = 5,5$ Hz, $\text{CH}_2\text{-O}$); 3,60 (2H, q, $J = 5,6$ Hz, $\text{CH}_2\text{-NH}$); 3,45 (4H, q, $J = 7,2$ Hz, $\text{CH}_2\text{-N}$) a 1,14 (6H, t, $J = 7,1$ Hz, CH_3) ppm. ^{13}C NMR (75 MHz, aceton- d_6): $\delta = 148,9; 148,5; 124,0; 118,7; 116,2; 116,0; 60,2; 44,5; 44,1$ a 12,9 ppm.

6.1.5 5-Diethylamino-6-[2-(2-hydroxyethoxy)ethylamino]pyrazin-2,3-dikarbonitril (6)

K roztoku látky **4** (1,0 g, 4,25 mmol) v tetrahydrofuranu (50 ml) byl za laboratorní teploty za míchání po kapkách přidán 2-(2-aminoethoxy)ethanol (1,34 g, 12,75 mmol). Reakční směs byla dále míchána 5 hodin. Rozpouštědlo bylo odpařeno za sníženého tlaku, zbytek byl rozpuštěn v chloroformu (50 ml) a třikrát extrahován vodou (50 ml). Organická fáze byla vysušena Na_2SO_4 , odpařena za sníženého tlaku a přečištěna sloupcovou chromatografií na silikagelu s mobilní fází dichlormethan/aceton 3:1. Byl získán produkt **6** (996 mg, 77 %) ve formě žlutého oleje. IR (KBr): $\nu_{\text{max}} = 3424; 2974; 2935; 2875; 2231$ (CN); 1560; 1537; 1504; 1457; 1436; 1358 a 1265 cm^{-1} .

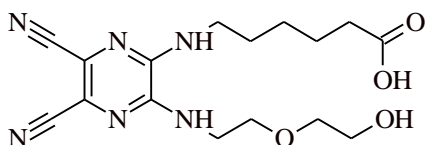
^1H NMR (300 MHz, aceton- d_6): δ = 6,76-6,54 (1H, br s, NH); 3,73 (2H, t, J = 5,5 Hz, $\text{CH}_2\text{-O}$); 3,70-3,61 (4H, m, $\text{CH}_2\text{-O}$); 3,61-3,53 (2H, m, $\text{CH}_2\text{-NH}$); 3,45 (4H, q, J = 7,1 Hz, $\text{CH}_2\text{-N}$) a 1,15 (6H, t, J = 7,1 Hz, CH_3) ppm. ^{13}C NMR (75 MHz, aceton- d_6): δ = 148,6; 148,4; 123,8; 118,8; 116,2; 116,0; 73,2; 69,0; 62,0; 44,1; 41,9 a 12,9 ppm.

6.1.6 5-[Bis-(2-hydroxyethyl)amino]6-diethylaminopyrazin-2,3-dikarbonitril (7)



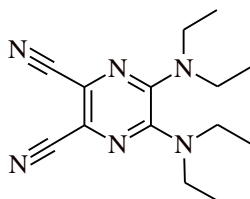
Směs roztoků látky **4** (1,1 g, 4,7 mmol) a diethanolaminu (2,0 g, 19 mmol) v dioxanu (75 ml) byla vařena po dobu 4 hodin pod zpětným chladičem za stálého míchání při teplotě 120°C. Vzniklá směs byla dekantována od olejovitých kapek, odpařena za sníženého tlaku a rozdělena sloupcovou chromatografií na silikagelu. Jako mobilní fáze byla použita soustava ethylacetát/kyselina octová v poměru 10:1. Poté byla reakční směs překrytalizována z vody s aktivním uhlím. Ani po krystalizaci nebyl produkt dostatečně čistý, a proto byl dočištěn sloupcovou chromatografií. Tentokrát byla jako mobilní fáze použita směs ethylacetát/aceton v poměru 1:1. Na závěr byl produkt překrytalizován z vody. Byl získán produkt **7** (360 mg, 25 %). T.t. 132,5-133,5 °C. IR (KBr): ν_{max} = 3431; 2935; 2224 (CN); 1538; 1491; 1218 a 1059 cm^{-1} . ^1H NMR (300 MHz, aceton- d_6): δ = 3,83 (2H, t, J = 5,5 Hz, OH); 3,79-3,72 (4H, m, $\text{CH}_2\text{-OH}$); 3,72-3,65 (4H, m, N- $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-OH}$); 3,59 (4H, q, J = 7,1 HZ, N- CH_2) a 1,07 (6H, t, J = 7,0 Hz, CH_3) ppm. ^{13}C NMR (75 MHz, aceton- d_6): δ = 148,4; 147,1; 120,5; 120,1; 116,2; 116,2; 59,8; 51,9; 43,4; 12,9 ppm.

6.1.7 6-[(5,6-Dikyan-3-{[2-(2-hydroxyethoxy)ethyl]amino}pyrazin-2-yl)amino]hexanová kyselina (10)



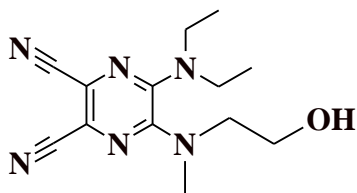
K roztoku meziprojektu **8** (293 mg, 1 mmol) v chloroformu (25 ml) byl za laboratorní teploty přidán 2-(2-aminoethoxy)ethanol (315 mg, 3 mmol). Reakční směs byla dále míchána za laboratorní teploty 30 hodin, poté byla třikrát vytřepána s vodou (25 ml). Organická fáze byla vysušena Na₂SO₄ a odpařena za sníženého tlaku. Poté byla přečištěna sloupcovou chromatografií na silikagelu s mobilní fází tetrahydrofuran/chloroform/kyselina octová 15:15:1 a překrystalizováno z ethanolu a vody. Byl získán produkt **10** (40 mg, 11 %) ve formě bílých krystalů. T.t. 134,5-135,0 °C. IR (KBr): ν_{\max} = 3389; 2942; 2869; 2810; 2226 (CN); 1704; 1605; 1558; 1517; 1460; 1401; 1217; 1139 a 1059 cm⁻¹. ¹H NMR (300 MHz, aceton-d₆): δ = 3,74-3,62 (6H, m); 3,59-3,53 (2H, m); 3,53-3,44 (2H, m); 2,29 (2H, t, *J* = 7,2 Hz); 1,74-1,55 (4H, m) a 1,49-1,36 (2H, m) ppm. ¹³C NMR (75 MHz, aceton-d₆): δ = 174,4; 145,1 145,0; 120,2; 119,7; 116,6; 116,6; 73,1; 69,1; 61,9; 42,4; 42,1; 33,9; 28,8; 27,1 a 25,2 ppm.

6.1.8 5,6-Bis-(diethylamino)pyrazin-2,3-dikarbonitril (**11**)



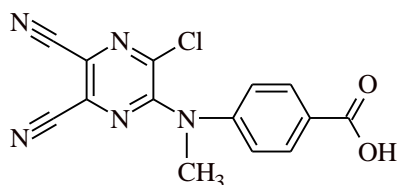
Diethylamin (5,3 g, 72 mmol) byl po kapkách přidán k roztoku látky **1** (2,4 g, 12 mmol) v tetrahydrofuranu (100 ml) a zahříván pod zpětným chladičem po dobu 6 hodin. Po skončení zahřívání byla reakční směs ochlazená a vysrážený diethylammonium hydrochlorid byl odfiltrován. Roztok byl odpařen za sníženého tlaku a žlutooranžový surový produkt byl překrystalizován z methanolu. Matečné louhy z krystalizací byly spojeny, odpařeny za sníženého tlaku a přečištěny sloupcovou chromatografií na silikagelu s mobilní fází hexan/ethylacetát 4:1. Obě frakce (z krystalizace a z chromatografie) byly spojeny a překrystalizovány z methanolu. Byla získána látka **11** (3,18 g, 96 %) ve formě žlutých plátek. T.t. 93,2-94,1 °C (lit. 94 °C[183]). IR (KBr): ν_{\max} = 2978; 2935; 2876; 2228 (CN); 1518; 1489; 1347 a 1253 cm⁻¹. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 3,48 (8H, q, *J* = 7,1 Hz, CH₂) a 1,07(12H, t, *J* = 7,1 Hz, CH₃) ppm. ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ = 146,1; 120,3; 115,0; 42,8 a 12,7 ppm.

6.1.9 5-(Diethylamino)-6-[(2-hydroxyethyl)methylamino]pyrazin-2,3-dikarbonitril (**25**)



K roztoku látky **4** (470 mg, 2 mmol) v tetrahydrofuranu (50ml) byl přikapán 2-(methylamino)ethanol a reakční směs byla míchána při laboratorní teplotě po dobu 3 hodin, poté bylo rozpouštědlo odpařeno za sníženého tlaku. Vzniklá voskovitá látka byla rozpuštěna v chloroformu (40 ml) a třikrát vytřepána s vodou (40 ml). Organická fáze byla vysušena Na_2SO_4 , odpařena za sníženého tlaku a přečištěna sloupcovou chromatografií na silikagelu s mobilní fází dichlormethan/aceton 30:1. Produkt byl překrytalizován z ethanolu a vody. Byl získán produkt **25** (408 mg, 75 %) ve formě žluté pevné látky. T.t. 86,5-87,5 °C. IR (KBr): $\nu_{\text{max}} = 3525; 3463; 2977; 2934; 2877; 2225$ (CN); 1523; 1494; 1412 a 1356 cm^{-1} . ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): $\delta = 3,81\text{-}3,74$ (2H, m, N- CH_2); 3,71-3,64 (2H, m, $\text{CH}_2\text{-OH}$); 3,50 (4H, q, $J = 7,07$ Hz, N- CH_2); 3,07 (3H, s, N- CH_3) a 1,09 (6H, t, $J = 7,07$ Hz, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$) ppm. ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): $\delta = 147,6; 146,1; 120,6; 120,1; 114,9; 114,9; 59,3; 52,4; 42,7; 37,2$ a 12,6 ppm.

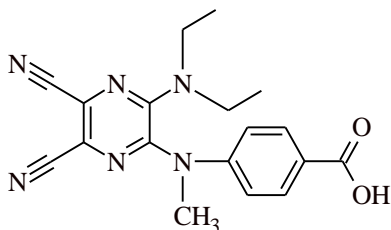
6.1.10 4-[(3-Chlor-5,6-dikyanpyrazin-2-yl)methylamino]benzoová kyselina (**26**)



K roztoku látky **1** (400 mg, 2 mmol) v tetrahydrofuranu (75 ml) byla přidána kyselina 4-(methylamino)benzoová (604 mg, 4 mmol) a reakční směs byla zahřívána pod zpětným chladičem při 90 °C po dobu 12 hodin. Potom byla směs ochlazená, odfiltrována vysrážená sůl a přečištěna sloupcovou chromatografií na silikagelu s mobilní fází chloroform/aceton/methanol 10:1:1. Produkt byl překrytalizován z ethanolu a vody. Byla získána látka **26** (520 mg, 83 %) ve formě žluté pevné látky. T.t. 208,1-211,6 °C. IR (KBr): $\nu_{\text{max}} = 3066; 2957; 2663; 2546; 2360; 2343; 2234$ (CN); 1694; 1607; 1537; 1494; 1406 a 1375 cm^{-1} . ^1H NMR (300 MHz, acetone- d_6): $\delta = 8,09$ (2H, d, $J = 8,54$ Hz, arom. CH_2); 7,48 (2H, d, $J = 8,55$ Hz, arom. CH_2) a 3,66 (3H, s, N-

CH₃) ppm. ¹³C NMR (75 MHz, aceton-d₆): δ = 166,7; 153,5; 149,6; 141,1; 131,9; 130,7; 130,0; 125,8; 121,9; 114,3; 114,2 a 42,6 ppm.

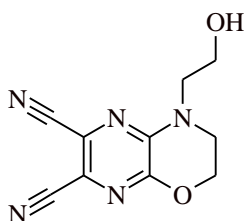
**6.1.11 4-[(5,6-Dikyan-3-diethylaminopyrazin-2-yl)methylamino]benzoová kyselina
(27)**



K roztoku látky **26** (312 mg, 0,89 mmol) v tetrahydrofuranu (50 ml) byl přidán diethylamin (1,3 g 18 mmol) a směs byla zahřívána pod zpětným chladičem při teplotě 90 °C po dobu 2 hodin. Poté byla směs ochlazena, byla odsáta sůl diethylamonium hydrochloridu a odpařeno rozpouštědlo za sníženého tlaku. Surový produkt byl přečištěn sloupcovou chromatografií na silikagelu s mobilní fází chloroform/methanol 10:1. Produkt byl překrytalizován z ethanolu a vody. Byla získána látka **27** (324 mg, 62 %) ve formě žluté pevné látky. T.t. 263,3-266,2 °C (za rozkladu). IR (KBr): ν_{\max} = 2976; 2936; 2876; 2360; 2229 (CN); 1686; 1607; 1533; 1501; 1404 a 1292 cm⁻¹. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ = 7,79 (2H, d, *J* = 8,77 Hz, arom. CH₂); 7,09 (2H, d, *J* = 8,79 Hz, arom. CH₂); 3,48 (3H, s, N-CH₃); 3,25 (4H, q, *J* = 7,01 Hz, N-CH₂) a 0,78 (6H, t, *J* = 7,02 Hz, CH₂-CH₃) ppm. ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-d₆): δ = 167,0; 148,5; 147,6; 143,9; 130,9; 126,0; 124,1; 120,4; 118,3; 115,4; 115,2; 42,8; 39,2 a 12,5 ppm.

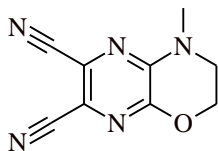
6.2 Syntéza vedlejších produktů nukleofilní substituce pyrazin-5,6-dikarbonitrilů

6.2.1 4-(2-Hydroxyethyl)-3,4-dihydro-2H-pyrazino[2,3-b][1,4]oxazin-6,7-dikarbonitril (19)



Diethanolamin (630 mg, 6 mmol) byl přidán k roztoku látky **1** (200 mg, 1 mmol) v tetrahydrofuranu (10 ml) a reakční směs byla zahřívána pod zpětným chladičem při 90°C po dobu 30 minut. Rozpouštědlo bylo oddestilováno za sníženého tlaku, voskovitá látka byla rozpuštěna v dichlormethanu (20 ml) a třikrát vytřepána s vodou (20 ml). Organická vrstva byla vysušena Na₂SO₄ a přečištěna sloupcovou chromatografií na silikagelu s mobilní fází ethylacetát/acetone 1:1. Byla získána látka **19** (120 mg, 36 %) ve formě bílých krystalků. T.t. 90,0-91,3 °C. IR (KBr): ν_{\max} = 2953; 2889; 2220 (CN); 1581; 1533; 1425 a 1261 cm⁻¹. ¹H NMR (300 MHz, aceton-d₆): δ = 4,60 (t, 2H, *J* = 4,6 Hz, O-CH₂); 4,08–4,00 (m, 1H, OH); 3,95 (t, 2H, *J* = 4,95 Hz, CH₂-OH) a 3,80-3,88 (m, 4H, N-CH₂) ppm. ¹³C NMR (75 MHz, aceton-d₆): δ = 149,6; 145,8; 126,2; 117,0; 115,6; 115,3; 65,6; 59,3; 51,5 a 47,5ppm.

6.2.2 4-Methyl-3,4-dihydro-2H-pyrazino[2,3-b][1,4]oxazin-6,7-dikarbonitril (21)



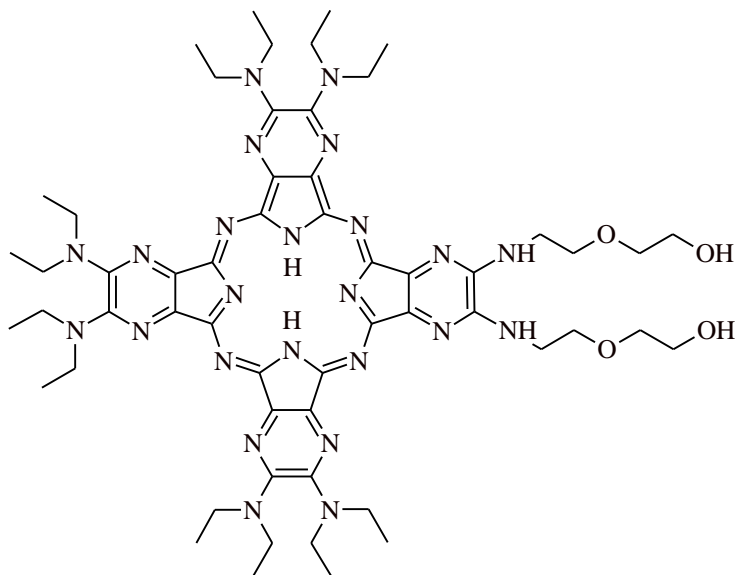
2-(Methylamino)ethanol (375 mg, 5 mmol) byl přidán k roztoku látky **1** (200 mg, 1 mmol) v tetrahydrofuranu (10 ml) a reakční směs byla zahřívána pod zpětným chladičem při 90°C po dobu 30 minut. Rozpouštědlo bylo oddestilováno za sníženého tlaku, voskovitá látka byla rozpuštěna v dichlormethanu (20 ml) a třikrát vytřepána

s vodou (20 ml). Organická vrstva byla vysušena Na_2SO_4 a přečištěna sloupcovou chromatografií na silikagelu s mobilní fází ethylacetát/acetone 20:1. Byla získána látka **21** (35 mg, 17 %) ve formě bílých jehliček. T.t. 192,3-193,5 °C. IR (KBr): $\nu_{\text{max}} = 2931$; 2878; 2218 (CN); 1593; 1538; 1421 a 1262 cm^{-1} . ^1H NMR (300 MHz, aceton- d_6): $\delta = 4,63$ (t, 2H, $J = 4,8$ Hz, O- CH_2); 3,85 (t, 2H, $J = 4,8$ Hz, N- CH_2); 3,25 (s, 3H, CH_3) ppm. ^{13}C NMR (75 MHz, aceton- d_6): $\delta = 149,6$; 146,2; 126,4; 117,1; 115,6; 115,3; 65,5; 47,6 a 35,9 ppm.

6.3 Syntéza AzaPc metodou statistické kondenzace

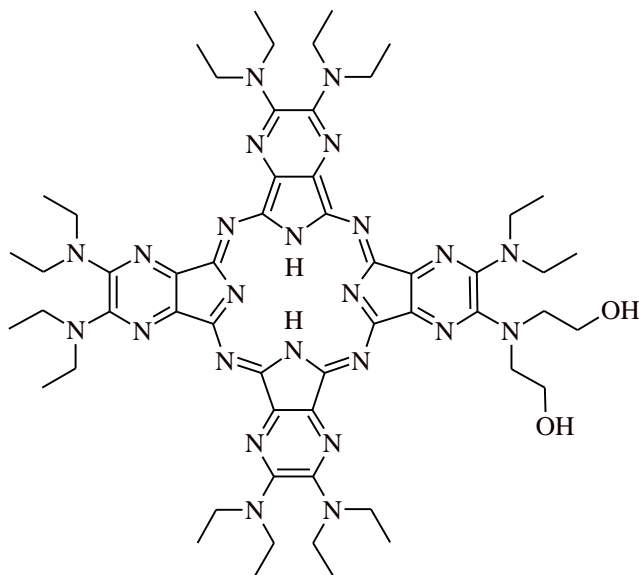
Roztok látky **11** (816 mg, 3 mmol) a druhého prekurzoru **2**, **5**, **6**, **7** nebo **9** (1 mmol) v bezvodém butanolu (15 ml) byl zahříván pod zpětným chladičem a bylo přidáno kovové lithium (196 mg, 28 mmol). Tato směs byla zahřívána dále 3 hodiny a poté bylo odpařeno rozpouštědlo za sníženého tlaku. Zbytek po odpaření byl suspendován ve vodném roztoku kyseliny octové (50% v/v, 30 ml) a tato suspenze byla míchána 30 minut. Precipitát byl zfiltrován a důkladně promyt vodou. Po vyschnutí byla surová směs čištěna sloupcovou chromatografií na silikagelu za použití gradientové eluce. Nejprve byla použita mobilní fáze chloroform/acetone 6:1 k oddělení látky **17**, po jejím vymytí ze silikagelu byl eluent zaměněn za polárnější směs (tato mobilní fáze je uvedena u konkrétních AzaPc) a žádaný kongener byl jímán jako intenzivní fialová frakce. Tento surový nesymetrický AzaPc byl dále dočištěn další sloupcovou chromatografií na silikagelu, tentokrát pouze s polárnější mobilní fází. Čistý AzaPc byl překrytalizován rozpuštěním v minimálním množství dichlormethanu a nakapán do hexanu. Vzniklá jemná suspenze byla zfiltrována a vysušena a byl získán čistý nesymetrický AzaPc.

6.3.1 2,3-Bis-[2-(2-hydroxyethoxy)ethylamino]-9,10,16,17,23,24-hexakis-(diethylamino)-1,4,8,11,15,18,22,25-(oktaaza)ftalocyanin (12)



Tato látka byla připravena podle obecného postupu pro syntézu nesymetrických AzaPc z výchozích látek **2** a **11**. Použitou polárnější mobilní fází byla směs chloroform/aceton/methanol 9:1:1. Byla získána látka **12** (114 mg, 10 %) jako fialová pevná látka. UV/Vis (THF): λ_{\max} (ϵ) = 675 (86200), 644 (67200), 618sh, 592sh, 510 (61300) a 363 nm (102800 M⁻¹cm⁻¹). IR (KBr): ν_{\max} = 2968; 2930; 2871 a 1641 cm⁻¹. ¹H NMR (300 MHz, pyridin-d₅): δ = 13,63 (2H, br s, OH); 8,13 (2H, br s, NH); 4,36-4,26 (4H, m, CH₂-OH); 4,01-3,79 (32H, m, CH₂-N + CH₂-O); 3,71-3,61 (4H, m, CH₂-NH) a 1,30-1,08 (36H, m, CH₃) ppm. ¹³C NMR (75 MHz, pyridin-d₅): δ = 153,5; 153,1; 151,0; 150,5; 150,4; 147,4; 143,3; 143,2; 142,8; 141,2; 139,2; 138,1; 73,3; 69,5; 61,5; 43,1; 43,0; 42,8; 42,7; 13,2; 13,1 a 13,0 ppm. MS-ESI: m/z = 1156 [M+H]⁺. Vypočtená mol. hmotnost: 1155 (C₅₆H₈₂N₂₄O₄).

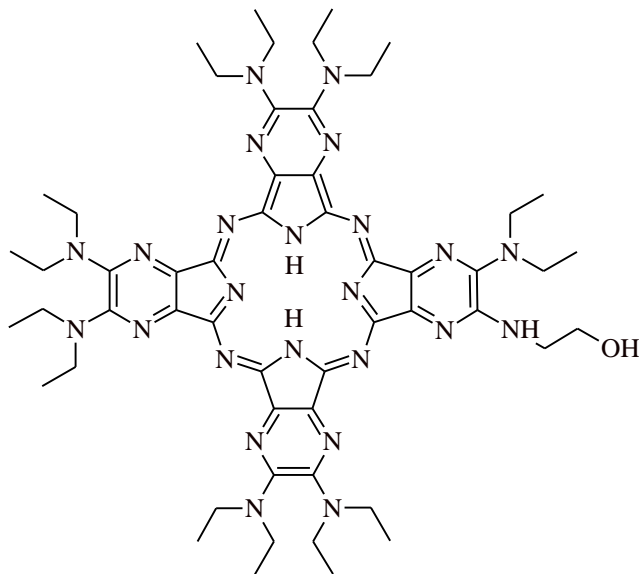
6.3.2 2-(2-Hydroxyethylamino)-3,9,10,16,17,23,24-heptakis-(diethylamino)-1,4,8,11,15,18,22,25-(oktaaza)ftalocyanin (13)



Tato látka byla připravena podle obecného postupu pro syntézu nesymetrických AzaPc z výchozích látek **7** a **11**. Použitou polárnější mobilní fází byla směs tetrahydrofuran/chloroform/hexan 1:1:1. Byla získána pevná fialová látka (54 mg). IR (KBr): ν_{\max} = 2965; 2930; 2870; 1676; 1642; 1510; 1423; 1376; 1344; 1288; 1250; 1160 a 1141 cm^{-1} . MS-ESI: m/z = 1050. Vypočtená mol. hmotnost: 1123 ($\text{C}_{56}\text{H}_{82}\text{N}_{24}\text{O}_2$).

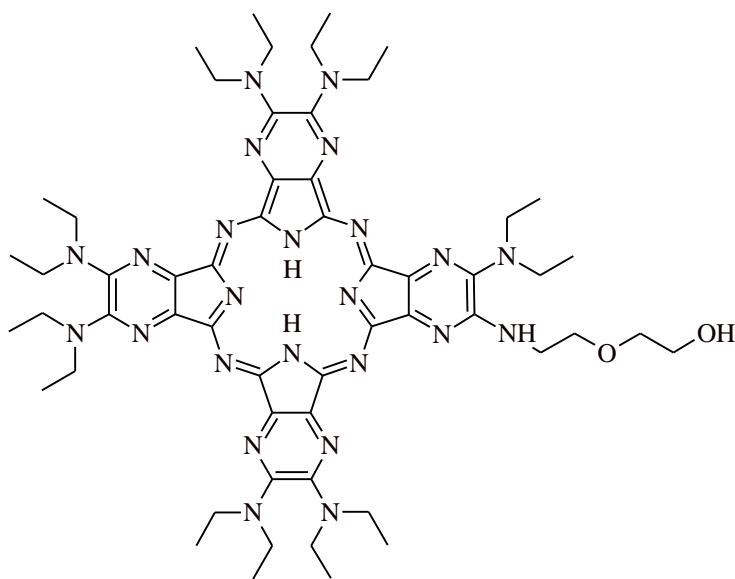
NMR ani MS analýza nepotvrdily předpokládanou strukturu.

6.3.3 2-(2-Hydroxyethylamino)-3,9,10,16,17,23,24-heptakis-(diethylamino)-1,4,8,11,15,18,22,25-(oktaaza)ftalocyanin (14)



Tato látka byla připravena podle obecného postupu pro syntézu nesymetrických AzaPc z výchozích látek **5** a **11**. Použitou polárnější mobilní fází byla směs tetrahydrofuran/chloroform/hexan 3:3:1. Byla získána látka **14** (28 mg, 3 %) jako fialová pevná látka. UV/Vis (THF): λ_{\max} (ϵ) = 678 (88300), 647 (64800), 618sh, 592sh, 507 (56100) a 364 nm (104600 M⁻¹cm⁻¹). IR (KBr): ν_{\max} = 2967; 2931; 2871 a 1640 cm⁻¹. ¹H NMR (300 MHz, pyridin-d₅): δ = 13,74 (1H, br s, OH); 7,64-7,54 (1H, m, NH); 4,49-4,33 (2H, m, CH₂-OH); 4,06-3,72 (26H, m, CH₂-N + CH₂-NH); 3,63 (4H, q, J = 6,8 Hz, CH₂-N) a 1,30-1,05 (42H, m, CH₃) ppm. ¹³C NMR (75 MHz, pyridin-d₅): δ = 152,2; 150,6; 149,1; 148,2; 144,4; 141,5; 141,0; 140,9; 137,3; 60,9; 45,0; 44,5; 43,0; 42,8 a 13,1 ppm. MS-ESI: m/z = 1080 [M+H]⁺. Vypočtená mol. hmotnost: 1079 (C₅₄H₇₈N₂₄O₁).

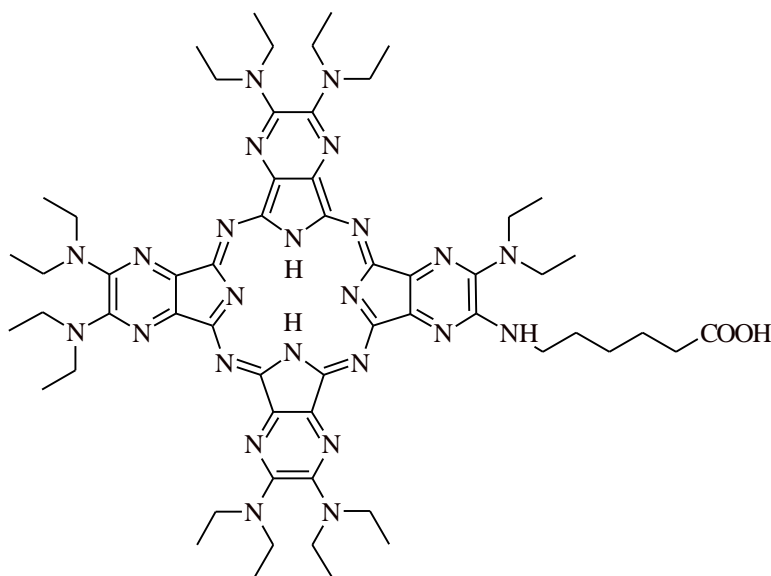
6.3.4 2-[2-(2-Hydroxyethoxy)-ethylamino]-3,9,10,16,17,23,24-heptakis-(diethylamino)-1,4,8,11,15,18,22,25-(oktaaza)ftalocyanin (**15**)



Tato látka byla připravena podle obecného postupu pro syntézu nesymetrických AzaPc z výchozích látek **7** a **11**. Použitou polárnější mobilní fází byla směs tetrahydrofuran/chloroform/hexan 3:3:1. Byla získána látka **15** (115 mg, 9 %) jako fialová pevná látka. UV/Vis (THF): λ_{\max} (ϵ) = 677 (95300), 647 (69500), 617sh, 591sh, 508 (58400) a 365 nm (108000 M⁻¹cm⁻¹). IR (KBr): ν_{\max} = 2969; 2931; 2872 a 1640 cm⁻¹. ¹H NMR (300 MHz, pyridin-d₅): δ = 13,74 (1H, br s, OH); 7,43 (1H, t, J = 5,3 Hz, NH); 4,34 (2H, q, J = 5,2 Hz, CH₂-OH); 4,10 (2H, t, J = 5,1 Hz, CH₂-O); 4,05 (2H, t, J = 5,1 Hz, CH₂-O); 4,00-3,72 (26H, m, CH₂-N + CH₂-NH); 3,62 (4H, q, J = 7,1 Hz,

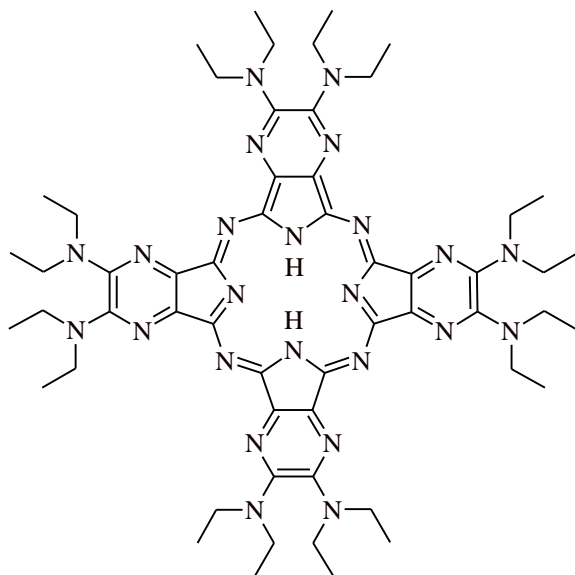
CH₂-N) a 1,36-0,93 (42H, m, CH₃) ppm. ¹³C NMR (75 MHz, pyridin-d₅): δ = 151,9; 150,6; 148,2; 146,6; 144,3; 141,5; 141,1; 140,9; 137,4; 73,6; 69,9; 61,7; 44,5; 43,0; 42,8 a 13,1 ppm. MS-ESI: *m/z* = 1124 [M+H]⁺. Vypočtená mol. hmotnost: 1123 (C₅₆H₈₂N₂₄O₂).

6.3.5 2-(5-Karboxypentylamino)-3,9,10,16,17,23,24-heptakis-(diethylamino)-1,4,8,11,15,18,22,25-(oktaaza)ftalocyanin (16)



Tato látka byla připravena podle obecného postupu pro syntézu nesymetrických AzaPc z výchozích látek **9** a **11**. Použitou polárnější mobilní fází byla směs hexan/ethylacetát/kyselina octová 4:7:1. Byla získána látka **16** (125 mg, 11 %) jako fialová pevná látka. UV/Vis (THF): λ_{max} (ε) = 678 (90500), 647 (67100), 592sh, 618sh, 508 (56000) a 364 nm (103000 M⁻¹cm⁻¹). IR (KBr): ν_{max} = 2969; 2930; 2871; 1726 (CO) a 1640 cm⁻¹. ¹H NMR (300 MHz, pyridin-d₅): δ = 13,75 (1H, br s, OH); 7,44 (1H, t, *J* = 5,5 Hz, NH); 4,22-4,06 (2H, m, CH₂-NH); 4,00-3,71 (24H, m, CH₂-N); 3,64 (4H, q, *J* = 7,0 Hz, CH₂-N); 2,68 (2H, t, *J* = 7,1 Hz, CH₂-COOH); 2,12-1,91 (4H, m, CH₂); 1,86-1,69 (2H, m, CH₂) a 1,26-1,04 (42H, m, CH₃) ppm. ¹³C NMR (75 MHz, pyridin-d₅): δ = 176,0; 152,3; 150,6; 144,7; 141,7; 140,9; 140,8; 137,1; 44,5; 43,0; 42,8; 34,9; 29,6; 27,4; 25,5; 13,1 a 12,9 ppm. MS-ESI: *m/z* = 1150 [M+H]⁺. Vypočtená mol. hmotnost: 1149 (C₅₈H₈₄N₂₄O₂).

6.3.6 2,3,9,10,16,17,23,24-Oktakis-(diethylamino)-1,4,8,11,15,18,22,25-(oktaaza)ftalocyanin (17)

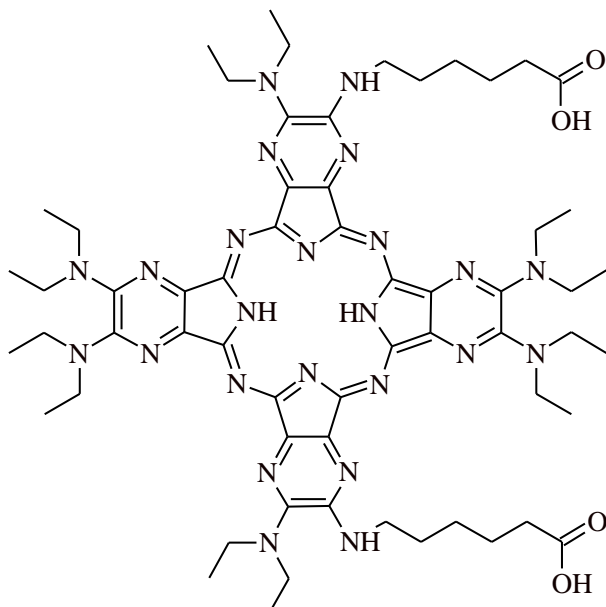


K roztoku prekursoru **11** (1,08 g, 4 mmol) v bezvodém butanolu (15 ml) zahříváném pod zpětným chladičem bylo přidáno kovové lithium (196 mg, 28 mmol). Reakční směs byla dále zahřívána při 130°C po dobu 3 hodin. Poté bylo za sníženého tlaku oddestilováno rozpouštědlo, přidán vodný roztok kyseliny octové (50% v/v, 30 ml) a vzniklá suspenze byla míchána 30 minut při laboratorní teplotě. Precipitát byl zfiltrován a promyt vodou a methanolem. Surový produkt byl naadsorbován na silikagel (5 g) a na skleněné fritě promýván methanolem do odbarvení rozpouštědla. Produkt na silikagelu byl vysušen a přečištěn sloupcovou chromatografií na silikagelu s mobilní fází hexan/ethylacetát 6:1. Přečištěný produkt byl překrytalizován rozpuštěním v minimálním množství dichlormethanu a nakapáním do methanolu. Vzniklá jemná suspenze byla zfiltrována a vysušena. Byla získána látka **17** (270 mg, 25 %) jako fialová pevná látka. UV/Vis (THF): λ_{\max} (ϵ) = 679 (93700), 649 (68600), 620sh, 595sh, 513 (60700) a 367 nm (103700 M⁻¹cm⁻¹). IR (KBr): ν_{\max} = 2969; 2931; 2872 a 1640 cm⁻¹. ¹H NMR (300 MHz, pyridin-d₅): δ = 3,89 (32H, q, J = 6,8 Hz, CH₂-N) a 1,20 (48H, t, J = 6,9 Hz, CH₃) ppm. ¹³C NMR (75 MHz, pyridin-d₅): δ = 150,8; 147,6; 141,2; 43,0 a 13,1 ppm. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 4,05 (32H, q, J = 7,2 Hz, CH₂-N) a 1,32 (48H, t, J = 7,2 Hz, CH₃) ppm. ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ = 150,5; 147,0; 140,2; 42,9 a 13,2 ppm. MS-ESI: m/z = 1092 [M+H]⁺. Vypočtená mol. hmotnost: 1091 (C₅₆H₈₂N₂₄).

6.3.7 Příprava azaftalocyaninů 22-24

Roztok prekurzorů **9** (363 mg, 1,33 mmol) a **11** (405 mg, 1,33 mmol) v bezvodém butanolu (30 ml) byl zahříván pod zpětným chladičem a bylo přidáno kovové lithium (130 mg, 18,5 mmol). Tato směs byla zahřívána po dobu 3 hodin a poté bylo rozpouštědlo odpařeno za sníženého tlaku. Zbytek po odpaření byl suspendován ve vodném roztoku kyseliny octové (50% v/v, 100 ml) a tato suspenze byla míchána po dobu 30 minut. Precipitát byl zfiltrován a důkladně promyt vodou. Po vyschnutí byla vzniklá směs přečištěna sloupcovou chromatografií na silikagelu za použití gradientové eluce. Nejprve byla použita mobilní fáze chloroform/aceton/methanol 10:1:1 k oddělení látek **17** a **16**. Po vymytí látky **16** byla mobilní fáze změněna na chloroform/aceton/methanol 10:3:3 a látky **22** a **23** byly jímány jako další intenzivní fialové frakce. Sloučenina **24** byla ze sloupce vymyta za použití methanolu jako mobilní fáze. Tyto surové frakce byly dále dočištěny sloupcovou chromatografií na silikagelu za použití mobilní fáze uvedené u konkrétních AzaPc.

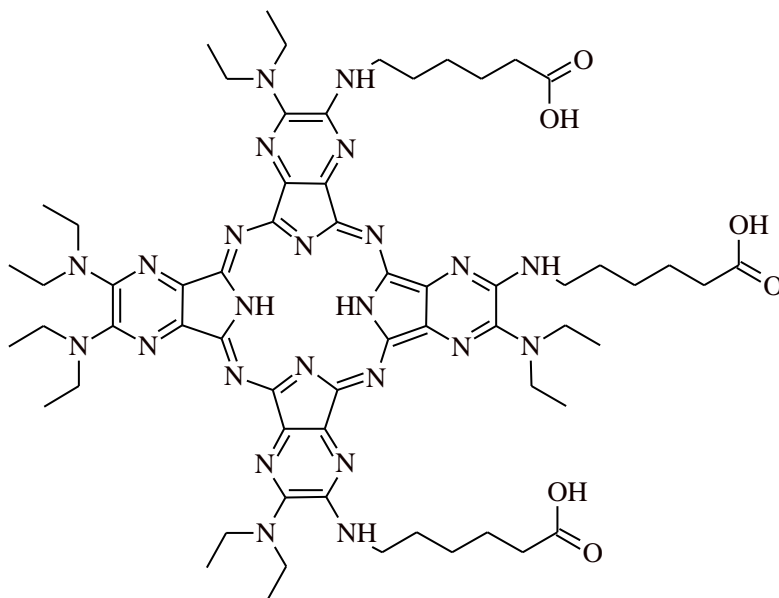
6.3.8 2,9-Bis-(5-karboxypentylamino)-3,10,16,17,23,24-hexakis-(diethylamino)-1,4,8,11,15,18,22,25-(oktaaza)ftalocyanin (22)



Tato frakce byla dočištěna sloupcovou chromatografií na silikagelu za použití mobilní fáze hexan/ethylacetát/kyselina octová 2:20:1. Isolovaná frakce byla odpařena za sníženého tlaku, rozpuštěna v minimální množství dichlormethanu a nakapána do

hexanu. Jemná suspenze byla zfiltrována. Byla získána látka **22** (35 mg, 4 %) ve formě fialové pevné látky. UV/Vis (THF): $\lambda_{max} (\epsilon) = 677 (90500), 646 (67100), 618sh, 591sh, 499 (56000), 363 \text{ nm} (103000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1})$. IR (KBr): $\nu_{max} = 2966; 2931; 2869; 1724 (\text{CO})$ a 1640 cm^{-1} . ^1H NMR (300 MHz, pyridin- d_5): $\delta = 13,74 (2\text{H}, \text{br s}, \text{OH}); 7,40 (2\text{H}, \text{br s}, \text{NH}); 4,25-4,03 (4\text{H}, \text{m}, \text{CH}_2\text{-NH}); 3,99-3,76 (16\text{H}; \text{m}, \text{CH}_2\text{-N}); 3,62 (8\text{H}, \text{q}, J = 7,0 \text{ Hz}, \text{CH}_2\text{-N}); 2,68 (4\text{H}, \text{t}, J = 4,6 \text{ Hz}, \text{CH}_2\text{-COOH}); 2,12-1,90 (8\text{H}, \text{m}, \text{CH}_2); 1,90-1,69 (4\text{H}, \text{m}, \text{CH}_2)$ a $1,34-1,07 (36\text{H}, \text{m}, \text{CH}_3)$ ppm. ^{13}C NMR (75 MHz, pyridin- d_5): $\delta = 176,1; 152,2; 150,7; 145,1; 142,0; 141,3; 136,2; 44,5; 43,0; 42,1; 35,0; 29,6; 27,4; 25,6; 13,1$ a $13,0$ ppm. MS-ESI: $m/z = 1208 [\text{M}+\text{H}]^+$. Vypočtená mol. hmotnost: 1207 ($\text{C}_{60}\text{H}_{86}\text{N}_{24}\text{O}_4$).

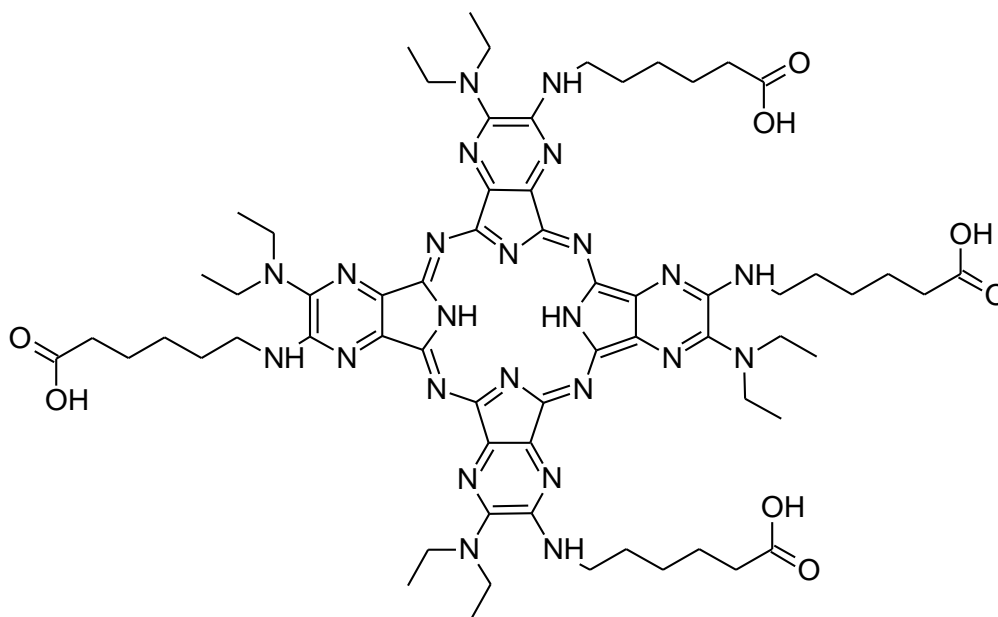
6.3.9 2,9,16-Tris-(5-karboxypentylamino)-3,10,17,23,24-pentakis-(diethylamino)-1,4,8,11,15,18,22,25-(oktaaza)ftalocyanin (23)



Tato frakce byla dočištěna sloupcovou chromatografií na silikagelu za použití mobilní fáze ethylacetát/kyselina octová 20:1. Isolovaná frakce byla odpařena za sníženého tlaku, rozpuštěna v minimální množství acetonu a nakapána do etheru. Jemná suspenze byla zfiltrována. Byla získána látka **23** (20 mg, 3 %) ve formě fialové pevné látky. UV/Vis (MetOH): $\lambda_{max} (\epsilon) = 681 (90500), 651 (67100), 618sh, 511 (56000), 362 \text{ nm} (103000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1})$. IR (KBr): $\nu_{max} = 2965; 2930; 2868; 1734 (\text{CO})$ a 1637 cm^{-1} . ^1H NMR (300 MHz, pyridin- d_5): $\delta = 13,70 (3\text{H}, \text{br s}, \text{OH}), 7,42 (3\text{H}, \text{br s}, \text{NH}); 4,20-3,98 (6\text{H}, \text{m}, \text{CH}_2\text{-NH}); 3,94-3,75 (8\text{H}; \text{m}, \text{CH}_2\text{-N}); 3,69-3,47 (12\text{H}, \text{m}, \text{CH}_2\text{-N}); 2,73-2,59$

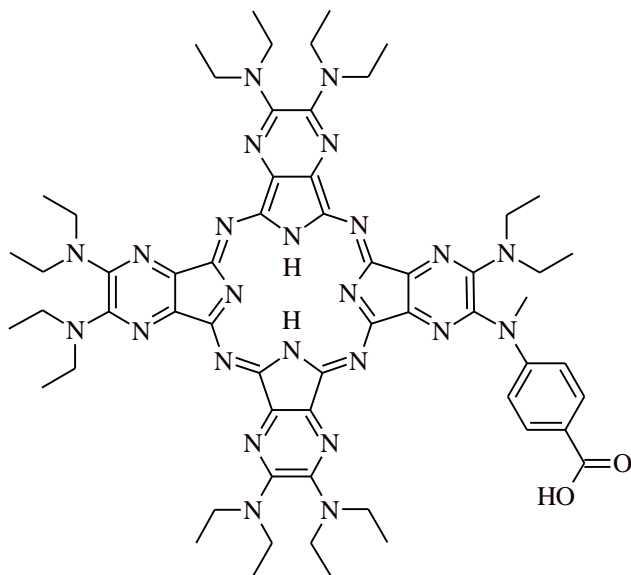
(6H, m, $\text{CH}_2\text{-COOH}$); 2,10-1,87 (12H, m, CH_2); 1,86-1,64 (6H, m, CH_2); 1,23-1,05 (30H, m, CH_3) ppm. ^{13}C NMR (75 MHz, pyridin- d_5): $\delta = 176,2$; 152,3; 150,6; 122,8; 44,5; 42,9; 42,1; 35,1; 29,6; 27,4; 25,7; 25,6; 13,1 a 13,0 ppm. MS-ESI: $m/z = 1267$ $[\text{M}+\text{H}]^+$. Vypočtená mol. hmotnost: 1266. ($\text{C}_{62}\text{H}_{88}\text{N}_{24}\text{O}_6$)

6.3.10 2,9,16,23-Tetrakis-(5-karboxypentylamino)-3,10,17,24-tetrakis-(diethylamino)-1,4,8,11,15,18,22,25-(oktaaza)ftalocyanin (24)



Tato frakce byla dočištěna sloupcovou chromatografií na silikagelu za použití mobilní fáze ethylacetát/kyselina octová 5:1. Isolovaná frakce byla odpařena za sníženého tlaku, rozpuštěna v acetonu a nakapána do etheru. Jemná suspenze byla zfiltrována. Byla získána látka **24** (15 mg, 2 %) ve formě fialové pevné látky. Všechna analytická data odpovídala látce připravené již dříve v naší laboratoři[182].

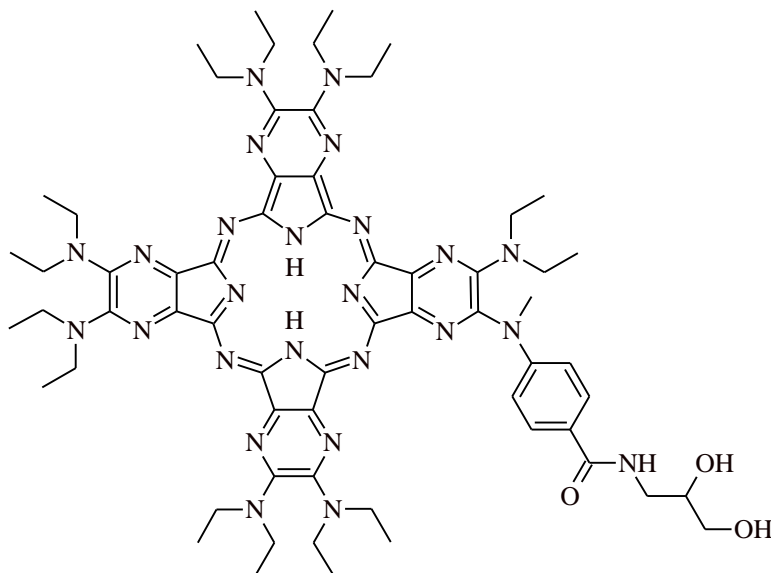
6.3.11 2-[(4-Karboxyfenyl)methylamino]-3,9,10,16,17,23,24-heptakis-(diethylamino)-1,4,8,11,15,18,22,25-(oktaaza)ftalocyanin (29)



Nesymetrický AzaPc **29** byl připraven analogicky k AzaPc **12-16**. K roztoku látky **27** (300 mg, 0,85 mmol) a látky **11** (700 mg, 2,57 mmol) v bezvodém butanolu bylo přidáno kovové lithium (168 mg, 24 mmol) a reakční směs byla zahřívána pod zpětným chladičem při 130 °C po dobu 3 hodin. Po odpaření rozpouštědla za sníženého tlaku byl přidán vodný roztok kyseliny octové (50%, v/v, 50 ml) a tato suspenze byla míchána 30 minut. Po zfiltrování, promytí vodou a vyschnutí byla směs kongenerů rozdělena sloupcovou chromatografií na silikagelu s mobilní fází dichlormethan/aceton/methanol 20:1:1. Požadovaná frakce byla dočištěna opakovanou sloupcovou chromatografií s mobilní fází dichlormethan/aceton/methanol 30:1:1. Nakonec byla substance přesrážena rozpuštěním v minimálním množství dichlormethanu a nakapáním do hexanu, vzniklá jemná suspenze byla zfiltrována. Byla získána látka **29** (150 mg, 15 %) ve formě fialové pevné látky. UV/Vis (THF): $\lambda_{\max} (\epsilon) = 680,5 (80000), 654,5 (66500), 622\text{sh}, 597\text{sh}, 518 (54300) \text{ a } 369,5 \text{ nm } (93200 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1})$. IR (KBr): $\nu_{\max} = 2969; 2931; 2873; 1710 (\text{CO}); 1639; 1605 \text{ a } 1426 \text{ cm}^{-1}$. ¹H NMR (300 MHz, pyridin-d₅): $\delta = 13,83 (1\text{H}, \text{br s}, \text{OH}); 8,48 (2\text{H}, \text{d}, J = 8,86 \text{ Hz}, \text{arom. CH}_2); 7,20 (2\text{H}, \text{d}, J = 8,67 \text{ Hz}, \text{arom. CH}_2); 3,97\text{-}3,78 (27\text{H}, \text{m}, \text{N-CH}_3 \text{ a } \text{N-CH}_2); 3,78\text{-}3,65 (4\text{H}, \text{m}, \text{N-CH}_2) \text{ a } 1,27\text{-}1,06 (42\text{H}, \text{m}, \text{CH}_2\text{-CH}_3) \text{ ppm}$. ¹³C NMR (75 MHz, pyridin-d₅): $\delta = 169,0; 153,2; 151,0; 150,9; 150,5; 146,7; 146,6; 143,0; 142,9; 141,6; 140,0; 139,9; 139,7; 139,7; 131,4; 117,3; 43,8; 43,1; 43,1; 39,1; 13,2; 13,1 \text{ a } 13,1 \text{ ppm}$. MS-MALDI-TOF: $m/z = 1170 [\text{M}+\text{H}]^+$. Vypočtená mol. hmotnost: 1169 (C₆₀H₈₈N₂₄O₂).

6.4 Modifikace AzaPc pro navázání na pevnou fázi

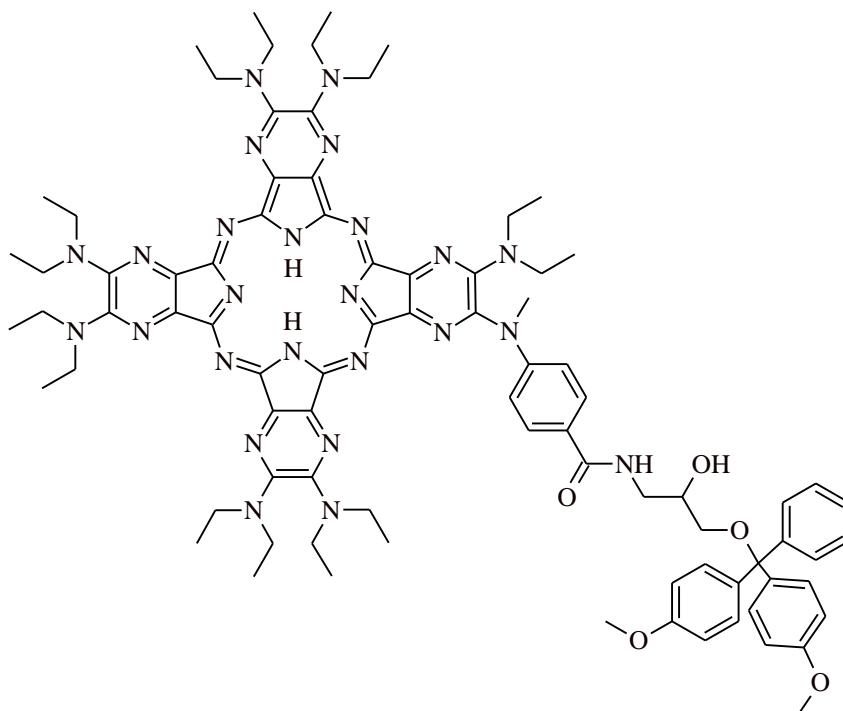
6.4.1 Azaftalocyanin (30)



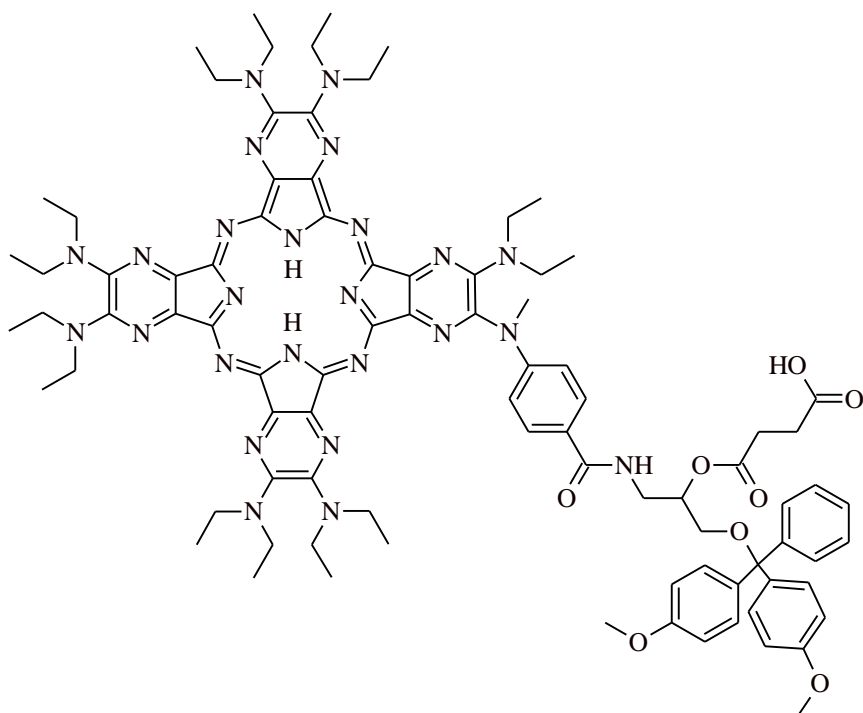
K roztoku AzaPc **29** (290 mg, 248 μmol) v bezvodém tetrahydrofuranu (40 ml) byl přidán *N,N'*-dicyklohexylkarbodiimid (56,2 mg, 273 μmol) a následně *N*-hydroxysukcinimid (31,4 mg, 273 μmol) a reakční směs byla míchána za laboratorní teploty 72 hodin. Reakce byla monitorována pomocí TLC s mobilní fází dichlormethan/aceton/methanol 40:1:1. Poté byla odfiltrována vznikající *N,N'*-dicyklohexylmočovina a k filtrátu byl přidán 3-amino-1,2-propandiol (113 mg, 1,24 mmol) v methanolu a tato směs byla míchána za laboratorní teploty 36 hodin. Reakce byla chráněna před světlem zabalením baňky do hliníkové folie. Po skončení reakce bylo rozpouštědlo oddestilováno za sníženého tlaku, pevná látka byla suspendována ve vodě a na filtru promyta větším množstvím vody. Nakonec byla směs přečištěna sloupcovou chromatografií na silikagelu s mobilní fází dichlormethan/aceton/methanol 30:1:1 do vymytí nečistot, poté byla mobilní fáze zaměněna za dichlormethan/aceton/methanol 10:1:1. Byla získána látka **30** (150 mg, 49 %) ve formě fialové pevné látky. IR (KBr): ν_{max} = 2969; 2931; 2873; 1636 (CONH); 1607; 156 a 1427 cm^{-1} . ^1H NMR (300 MHz, pyridin- d_5): δ = 9,32 (1H, t, J = 6,32 Hz, NHCO); 8,32 (2H, d, J = 9,15 Hz, arom. CH_2); 7,17 (2H, d, překryv s rozpouštědlem, arom. CH_2); 4,53-4,42 (1H, m, CH-OH); 4,32-4,00 (4H, m, CH_2); 3,97-3,84 (24H, m, N-CH_2); 3,83

(3H, s, N-CH₃); 3,69 (2H, q, $J = 6,98$ Hz, N-CH₂) a 1,32-0,94 (42H, m, CH₂-CH₃) ppm. ¹³C NMR (75 MHz, pyridin-d₅): $\delta = 168,4; 153,1; 151,0; 150,9; 150,9; 150,6; 150,5; 150,0; 147,0; 146,1; 142,8; 142,7; 141,5; 140,1; 139,9; 139,8; 139,7; 139,6; 129,4; 128,9; 128,3; 126,1; 122,9; 117,9; 116,7; 114,4; 72,2; 65,2; 56,1; 43,7; 43,1; 43,0; 39,2; 30,2; 13,3; 13,1$ a $13,1$ ppm. MS-MALDI-TOF: $m/z = 1244$ [M+H]⁺. Vypočtená mol. hmotnost: 1243 (C₆₃H₈₇N₂₅O₃).

6.4.2 Azaftalocyanin (31)

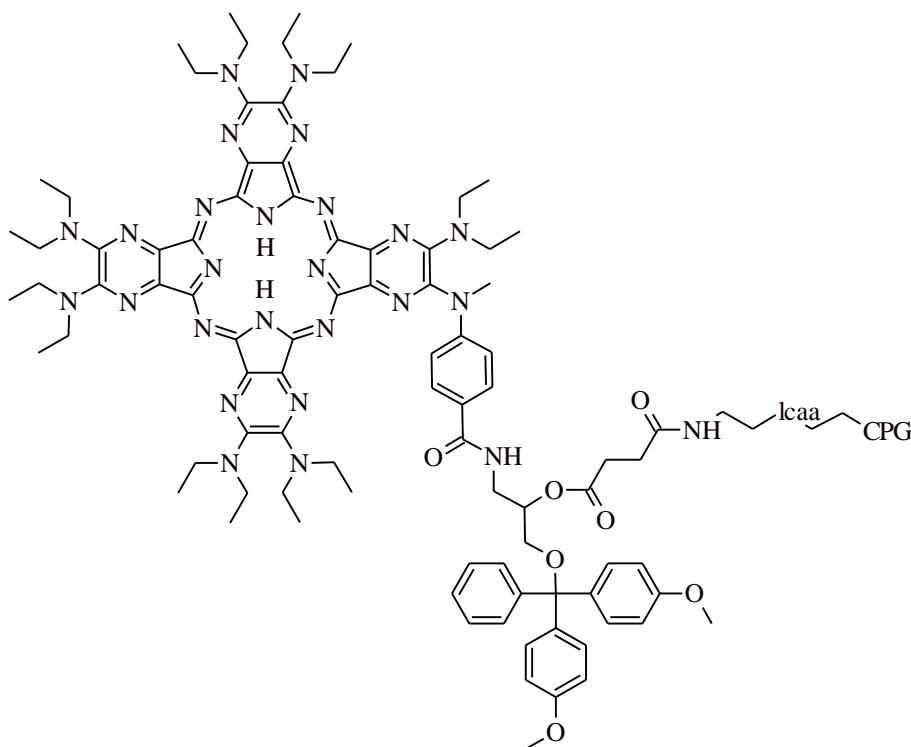


AzaPc **30** (124 mg, 0,1 mmol) byl rozpuštěn v bezvodém pyridinu (20 ml) a byl přidán 4,4'-dimethoxytrityl chlorid (DMTrCl) (44 mg, 0,13 mmol) a katalytické množství 4-dimethylaminopyridinu a reakční směs byla při laboratorní teplotě míchána po dobu 14 hodin. Poté byl přidán další DMTrCl (169 mg, 0,5 mmol) a směs byla míchána dalších 24 hodin. Reakce byla chráněna před světlem zabalením baňky do hliníkové fólie. Reakce byla monitorována pomocí TLC s mobilní fází dichlormethan/pyridin 40:1. Produkt nebyl čištěn a byl použit přímo k následujícímu kroku.

6.4.3 Azaftalocyanin (32)

K roztoku AzaPc **31** z předchozí reakce byl přidán sukcinanhydrid (100 mg, 1 mmol) a reakční směs byla zahřívána pod zpětným chladičem při teplotě 60 °C po dobu 12 hodin. Rozpouštědlo bylo odpařeno za sníženého tlaku a produkt byl přečištěn sloupcovou chromatografií na silikagelu s mobilní fází dichlormethan/pyridin 40:1, která byla po vytečení první barevné frakce odpovídající AzaPc **31** změněna na dichlormethan/pyridin 20:1 a ve chvíli, kdy začal vytékat produkt na dichlormethan/methanol/pyridin 20:1:1. Byla získána látka **32** (40 mg, 25 % po dvou krocích) ve formě fialové pevné látky. IR (KBr): ν_{\max} = 3428; 3305; 3050; 2966; 2930; 2871; 1734 (CO-O); 1640(CO-NH); 1607; 1508; 1425 a 1250 (O-CH₃) cm⁻¹. MS-MALDI-TOF: m/z = 1644 [M+H]⁺ (bez kyseliny trifluoroctové v matrici), m/z = 1342 [M-DMTr+H]⁺ (s kyselinou trifluoroctovou v matrici). Vypočtená mol. hmotnost: 1645 (C₈₈H₁₀₉N₂₅O₈).

6.4.4 Azaftalocyanin (32) vázaný na pevnou fázi (33)



Roztok AzaPc 32 (8 mg, 5 μ mol) a HBTU (3 mg, 10 μ mol) v bezvodém *N,N*-dimethylformamidu (DMF) (2 ml) byl přidán k pevné fázi (500 Å amino lcaa CPG) (100 mg) a posléze byl přidán bezvodý triethylamin (10 μ l). Reakční směs byla za občasného protřepání ponechána 24 hodin, poté byla pevná fáze promývána DMF do odbarvení rozpouštědla a následně promyta acetonitrilem a diethyletherem. Pevná fáze byla vysušena v exsikátoru nad silikagelem a byla změřena míra navázání (loading) azaftalocyaninu 32 na pevnou fázi prostřednictvím loadingu dimethoxytritylového kationtu (DMTr) po jeho odštěpení a následném fotometrickém stanovení. K přesně naváženému množství značené pevné fáze (2-3 mg) byl přidán roztok kyseliny chloristé (10 ml; 51,4 ml 70% HClO₄ a 46 ml methanolu) a byla změřena absorbance tohoto vzorku při 498 nm v kyvetě o optické délce 1 cm. Hodnota absorbance byla dosazena do vztahu (3):

$$\text{Loading } (\mu\text{mol/g}) = (\text{absorbance při 498 nm}) \times \text{zředění} \times 143 / (\text{navážka pevné fáze, mg}), \quad (3)$$

ze kterého byl vypočítán loading DMTr na pevné fázi (30,8 μ mol/g pevné fáze).

6.5 Optimalizace syntézy AzaPc pomocí HPLC analýzy

Příprava vzorků pro HPLC analýzu

Standardy látek **16**, **17**, **22-24** byly naváženy a rozpuštěny ve 2 ml směsi tetrahydrofuran/methanol 1:1 (v/v). Každý roztok byl zředěn směsí tetrahydrofuran/methanol 1:1 v poměru 1:1 a 1:10. Roztoky byly analyzovány a byla vytvořena kalibrační křivka pro každý kongener. Každá kalibrační křivka se skládala ze tří experimentálně změřených bodů z výše uvedených roztoků (základní roztok, zředění 1:1, zředění 1:10). Linearita byla zajištěna pro každý kongener rozsahu měřených koncentrací. Každá koncentrace byla nastříknuta na HPLC kolonu dvakrát a pro kalibrační křivku byla použita průměrná hodnota plochy pod křivkou při vlnové délce 510 nm.

Příprava vzorků pro analýzu distribuce kongenerů

Celkem 0,2 mmol prekurzorů **9** a **11** v poměrech 1:6, 1:3, 1:2, 2:3, 1:1, 3:2, 2:1, 3:1 a 6:1 (celkové látkové (molární) množství pyrazindikarbonitrilů bylo vždy stejné, měnily se pouze poměry prekurzorů) bylo rozpuštěno v 5 ml bezvodého butanolu, pod zpětným chladičem zahřáto k varu a bylo přidáno kovové lithium (1,4 mmol, 10 mg). Reakční směs byla zahřívána 3 hodiny, poté bylo za sníženého tlaku odpařeno rozpouštědlo a byl přidán vodný roztok kyseliny octové (50% v/v, 50 ml) a vzniklá suspenze byla míchána po dobu 30 minut. Poté byla suspenze zfiltrována a voskovitá látka na filtru byla promývána vodou (200-300 ml) do odbarvení filtrátu. Vzniklá pevná látka byla vysušena na vzduchu a kvantitativně přenesena do vialky. Poté byly všechny vzorky rozpuštěny v 6 ml směsi tetrahydrofuran/methanol 1:1 (v/v) a vzniklý roztok byl analyzován na HPLC. Z každého vzorku bylo na HPLC kolonu nastříknuto 10 μ l roztoku. Syntéza a analýza byla provedena dvakrát pro každý poměr prekurzorů. Z plochy pod křivkou (AUC) ze záznamu HPLC analýzy bylo z kalibrační křivky vypočteno molární množství každého kongeneru v každé směsi. Procentuální množství každého kongeneru bylo vypočteno za použití celkové molární koncentrace kongenerů jako 100 %.

6.6 Měření stability AzaPc v reagenčních pro syntézu oligonukleotidů

Byly připraveny základní roztoky AzaPc (**12**, **15**, **16** a **17**) v dichlormethanu (pro roztok A), acetonitrilu (pro roztok B), tetrahydrofuranu (pro roztoky C+D a E) a methanolu (pro roztoky F a G, kromě látky **17**) o koncentraci $2 \times 10^{-5} \text{ mol} \times \text{dm}^{-3}$. Složení reagenčních roztoků A-G je uvedeno v tabulce 1. Dále byly připraveny roztoky reagencií používaných pro syntézu oligonukleotidů o dvojnásobné koncentraci, než je obvykle používána. Roztok F byl použit v koncentraci běžně používané kvůli nemožnosti přípravy koncentrovanějšího roztoku. Při měření bylo smícháno 10 ml základního roztoku AzaPc a 10 ml roztoku příslušné reagenzie, takže výsledná koncentrace byla $1 \times 10^{-5} \text{ mol} \times \text{dm}^{-3}$ AzaPc a reagenzie byla v koncentraci používané pro syntézu. Tyto směsi byly míchány po dobu 24 hodin chráněny před světlem a v časech 0, 2, 6, 22 a 24 hodin bylo odebráno 2,5 ml roztoku a bylo změřeno UV-Vis spektrum. Pro roztok E bylo spektrum změřeno i v čase 15 minut.

AzaPc **24** byl v roztoku F rozpuštěn přímo bez základního roztoku. Dále byly po každém měření látky **24** v roztoku G do optické kyvety přidány dvě kapky kyseliny octové a spektrum bylo změřeno znovu.

Reagenzie pro syntézu oligonukleotidu	Složení	Čas expozice ^a (minuty)
A	3% (m/m) kyselina trichloroctová v dichlormethanu	25
B	0,25 M 5-(ethylthio)-1H-tetrazol v acetonitrilu	20
C	10% (m/m) 1-methylimidazol v tetrahydrofuranu	15
D	Tetrahydrofuran/pyridin/acetanhydrid 8:1:1	15
E	0,02 M jód v tetrahydrofuranu/pyridinu/vodě 7:2:1	15
F	32% amoniak/40% methylamin 1:1	90 ^b
G	0,05 M K ₂ CO ₃ v methanolu	240-720 ^b

Tabulka 1: Složení reagenčních roztoků pro syntézu oligonukleotidů.

^a časy expozice jsou udány pro syntézu 20-méru ve standardním módu.

^b roztoky F a G jsou při syntéze oligonukleotidu použity pouze jednou, ne v každém cyklu.

6.7 Měření produkce singletového kyslíku a fluorescence

Produkce singletového kyslíku Φ_{Δ} byla měřena metodou rozkladu 1,3-difenyliisobenzofuranu (DPBF)[1]. Do optické kyvety bylo přeneseno 2,3 ml roztoku DPBF v DMF ($5 \times 10^{-5} \text{ mol} \times \text{dm}^{-3}$), který byl nasycen kyslíkem (jednu minutu bubláno). Poté byl přidán základní roztok AzaPc v DMF (obvykle 20 μl) tak, aby výsledná absorbance v Q-pásmu byla okolo 0,1. Roztok byl míchán a ozařován halogenovou lampou (Tip, 200 W). Použité světlo bylo filtrováno přes vodní filtr (6 cm) a oranžový HOYA G filtr. Tím bylo odfiltrováno infračervené světlo a světlo o vlnové délce pod 506 nm. Byl měřen rozklad DPBF při 415 nm do poklesu maximálně 15 %. Kvantový výtěžek produkce singletového kyslíku byl vypočítán ze vztahu (4)

$$\Phi_{\Delta}^S = \Phi_{\Delta}^R \frac{k^S I_{aT}^R}{k^R I_{aT}^S}, \quad (4)$$

kde k je směrnice grafu závislosti $\ln(A_0/A_t)$ na ozáření vzorku za čas t , kdy A_0 a A_t jsou absorbance DPBF při vlnové délce 415 nm před a po ozáření měřeného vzorku v čase t . Index R označuje porovnávací látku a S označuje měřený vzorek. Jako porovnávací látka byl použit zinečnatý ftalocyanin (ZnPc), u kterého je známa hodnota $\Phi_{\Delta} = 0,56$ [184]. I_{aT} je celkové množství světla absorbovaného AzaPc a bylo vypočteno jako suma intenzit absorbovaného světla I_a v rozmezí vlnových délek 506 nm až 800 nm (měřeno po 0,5 nm). Světlo pod 506 nm bylo zcela odfiltrováno oranžovým filtrem HOYA G a záření nad 800 nm není absorbováno AzaPc. I_a při dané vlnové délce bylo vypočítáno podle Beerovy rovnice (5)

$$I_a = I_0(1 - e^{-2,3A}), \quad (5)$$

kde I_0 je transmitance filtru při dané vlnové délce a A je absorbance AzaPc při této vlnové délce.

Fluorescence AzaPc byla měřena v roztoku tetrahydrofuranu (THF). Do fluorescenční kyvety bylo dáno 2,5 ml THF a byla změřena base-line. Poté byl do této kyvety přidán roztok AzaPc v THF (přibližně 20 μl) tak, aby výsledná absorbance připraveného roztoku v Q-pásmu byla okolo 0,04 a bylo změřeno emisní spektrum tohoto

roztoku. Nastavení fluorimetru bylo: excitace při 373 nm, šířka štěrbin 16 nm, rychlost měření $1,5 \text{ nm} \times \text{s}^{-1}$.

6.8 Měření účinnosti zhášení fluorescence AzaPc

Nejprve byly syntetizovány oligonukleotidové sekvence **S1**, **S2** a **S3** na pevné fázi **33** standardním programem a poté byly odblokovány standardním postupem (AMA/NH₃, 25 °C, 90 minut)[185]. Sekvence **S2** a **S3** byly oproti sekvenci **S1** prodlouženy vždy o pět bazí.

S1: 5'- GAA GTC GGG TGG TCA AAA AGC AGA - AzaPc - 3'

S2: 5'- GAA GTC GGG TGG TCA AAA AGC AGA TTT TT - AzaPc - 3'

S3: 5'- GAA GTC GGG TGG TCA AAA AGC AGA TTT TTT TTT T - AzaPc - 3'

Na standardní fázi pro syntézu oligonukleotidu byl syntetizován oligonukleotid se sekvencí **S4** komplementární k sekvenci **S1** a 24 bazím sekvencí **S2** a **S3**, značený komerčně dostupným fluorescenčním barvivem Cy5TM:

S4: 5'- Cy5TM- TCT GCT TTT TGA CCA CCC GAC TTC - 3'

Oligonukleotid **S4** byl rozpuštěn v hybridizačním pufru na koncentraci 0,05 μM a byla změřena jeho fluorescence při 690 nm po excitaci v absorpčním maximu fluoroforu (651 nm). K roztoku oligonukleotidu **S4** byl poté přidán roztok oligonukleotidu **S1**, **S2** nebo **S3** v hybridizačním pufru tak, aby jeho koncentrace ve finální směsi byla 0,25 μM . Po hybridizaci byla změřena fluorescence roztoků **S4+S1**, **S4+S2** a **S4+S3**. Naměřené snížení hodnoty fluorescence (X) bylo vypočteno dle vztahu (6)

$$X = F_x / F_0, \quad (6)$$

kde F_0 je fluorescence samotného roztoku **S4** a F_x je fluorescence roztoku **S4** po smíchání s jedním z roztoků **S1**, **S2** nebo **S3**.

Pro porovnání bylo zároveň s tímto měřením provedeno stanovení efektivity zhášení fluoroforu Cy5TM komerčně dostupným quencherem BHQ-2[®] se stejnými

sekvencemi oligonukleotidů jako **S1-S3** pouze s tím rozdílem, že zhášec AzaPc byl nahrazen BHQ-2[®]. Syntéza a deprotektce sond značených BHQ-2[®] byla provedena standardním postupem.

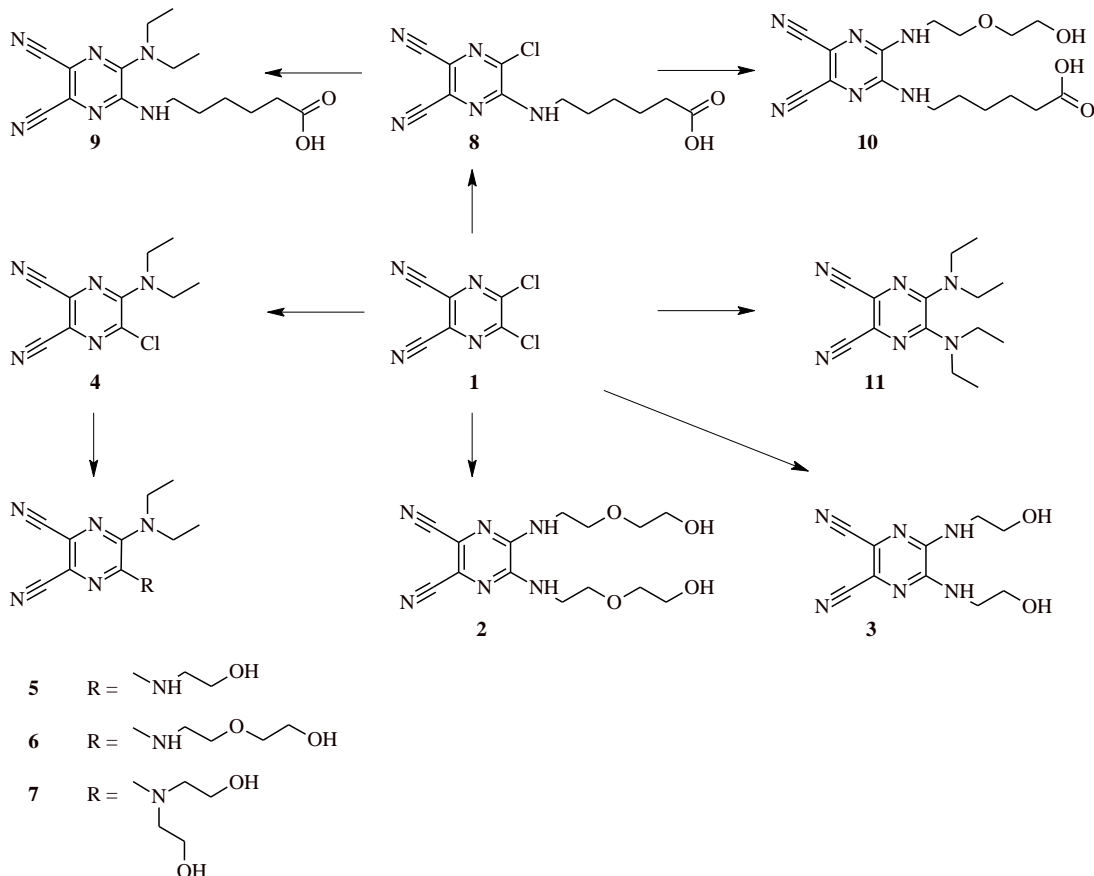
6.9 Měření tvorby komplexu s pyridinem

Pro měření tvorby komplexů AzaPc s pyridinem byly připraveny roztoky látek **12, 14, 15** a **17** o koncentraci 10 mM v pyridinu. Z těchto roztoků byly odebrány 3 ml do kyvety z křemenného skla o optické délce 10 mm, která byla uzavřena teflonovou zátkou během celého měření. Tyto roztoky byly poté měřeny na spektrofotometru v průběhu 24 hodin. První měření bylo provedeno v nejkratším možném čase, což je přibližně 3 minuty a tento čas byl vzat jako čas 0.

7 VÝSLEDKY A DISKUZE

Pro přípravu zhášečů fluorescence byly jako vhodné deriváty vybrány alkylaminoderiváty oktaazaftalocyaninů (AzaPc). Jedná se o dusíkové analogy ftalocyaninů (Pc), které se oproti Pc vyznačují hypsochromním posunem v UV-vis oblasti. To sice není zcela vhodná vlastnost AzaPc, výhodnější by byl bathochromní posun. Ale na druhou stranu doposud nebyly popsány žádné *bis*-dialkylaminoderiváty ftalonitrilu, který je nejčastějším výchozím materiálem pro přípravu Pc. Bylo popsáno pouze několik 4-alkylamino-5-chlorftalonitrilů, např.: 4-chlor-5-(dibutylamino)ftalonitril[186], nukleofilní substituce do druhé polohy je znesnadněna deaktivací benzenového jádra a 4,5-*bis*-dialkylaminoftalonitrily doposud nebyly připraveny. Oproti tomu příprava některých *bis*-dialkylaminoderivátů pyrazin-2,3-dikarbonitrilů probíhá již za laboratorní teploty. Z tohoto důvodu byly vybrány deriváty pyrazinu.

7.1 Syntéza pyrazin-2,3-dikarbonitrilů nukleofilní substitucí

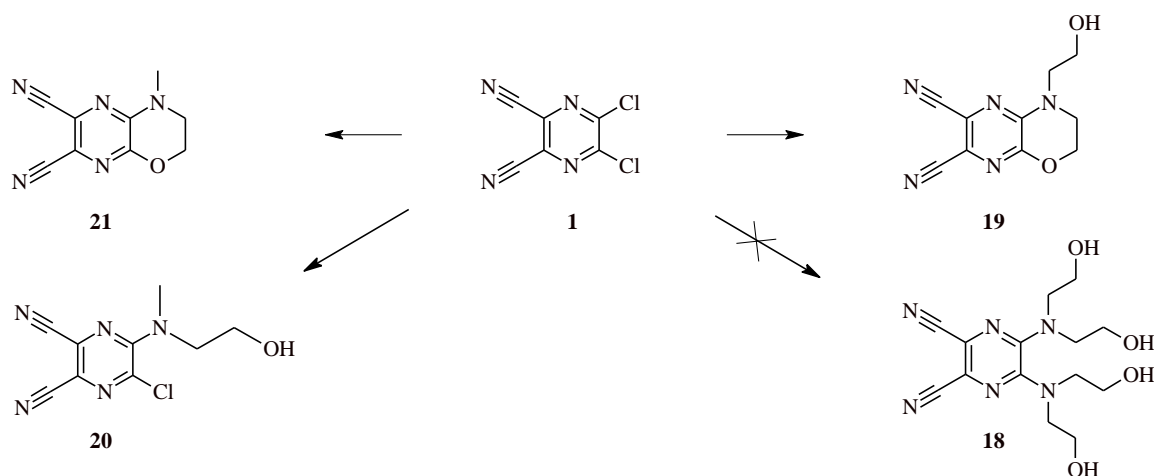


Obrázek 23: Přehled připravených prekurzorů použitých pro tetramerizační reakce.

Výchozí látkou pro přípravu prekurzorů byl reaktivní 5,6-dichlorpyrazin-2,3-dikarbonitril (**1**) připravený dle literatury[181]. Ten podléhá nukleofilním substitucím primárními nebo sekundárními aminy v roztoku dioxanu nebo tetrahydrofuranu za tvorby mono- či disubstituovaného pyrazindikarbonitrilu a chlorovodíku, který je neutralizován přítomným aminem, který musí být v nadbytku. Takto byly připraveny symetrické deriváty **2** a **3** nesoucí dvě hydroxylové skupiny. Dále byly nasyntetizovány deriváty **5-7** nesoucí jeden substituent s funkční skupinou a v druhé poloze byl vázán diethylaminový zbytek. Syntéza těchto tří derivátů byla provedena přes meziprodukt **4** připravený opět z látky **1** přidáním ekvimolárního množství diethylaminu. Derivát obsahující jednu karboxylovou skupinu (**9**) byl připraven již dříve[182] přes

meziprodukt (**8**), ale byl použit pouze pro syntézu AzaPc obsahujícího čtyři funkční skupiny. V této práci byl využit pro přípravu nesymetrických derivátů AzaPc nesoucích různý počet karboxylových funkčních skupin. Meziprodukt **8** byl dále podroben také reakci s 2-(2-aminoethoxy)ethanolem za vzniku prekursoru **10** obsahujícího jak karboxylovou, tak hydroxylovou skupinu. Výtěžky prováděných reakcí se pohybovaly v rozmezí 60-95% s výjimkou přípravy prekursoru **10**, kde se výtěžek pohyboval pouze okolo 10%.

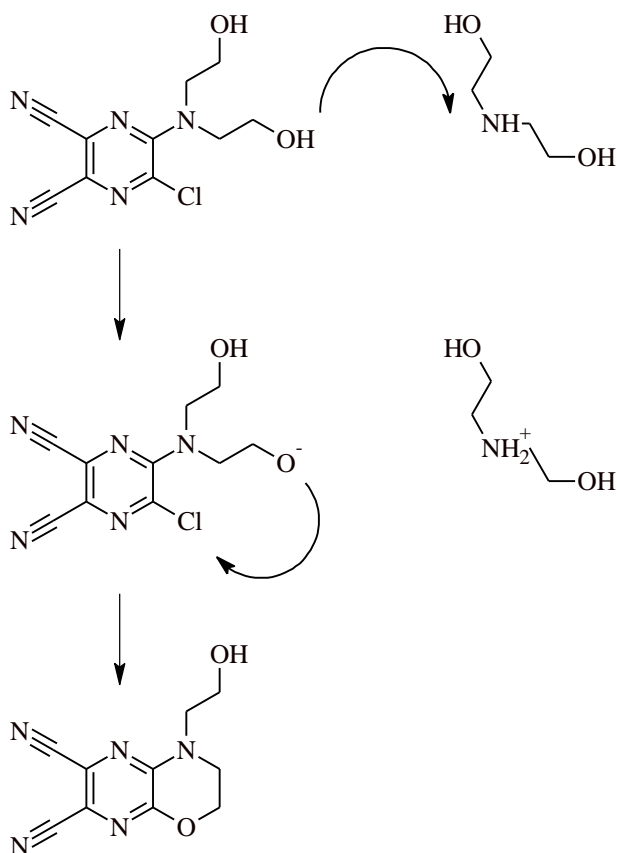
Tyto substance byly posléze použity pro tetramerizační reakci s druhým prekurzorem, a to s 5,6-bis(diethylamino)pyrazin-2,3-dikarbonitrilem (**11**). Ten byl vybrán jako nejvhodnější alternativa zajišťující dostatečnou inhibici agregace makrocyklu AzaPc díky objemnosti diethylaminových substituentů. Náchylnost k tvorbě agregátů (dimerů a vyšších agregátů) znesnadňuje purifikaci a analýzu AzaPc a také do určité míry mění jejich vlastnosti. Dalším důvodem byla jeho snadná příprava nukleofilní substitucí výchozího 5,6-dichlorpyrazin-2,3-dikarbonitrilu diethylaminem v tetrahydrofuranu (výtěžky přes 90 %).



Obrázek 24: Přehled vedlejších reakcí pozorovaných při přípravě pyrazinových derivátů.

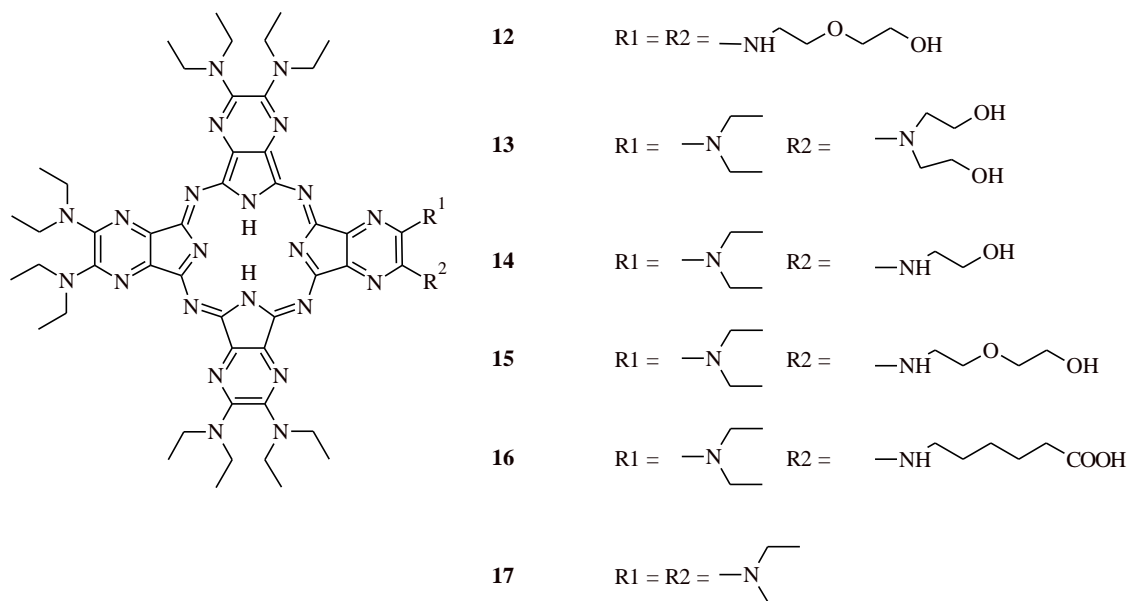
Při syntéze prekursoru **18** nesoucího čtyři hydroxyskupiny byla z reakční směsi vyzolována jako majoritní frakce substance struktury 4-(2-hydroxyethyl)-3,4-dihydro-2H-pyrazino[2,3-b][1,4]oxazin-6,7-dikarbonitril (**19**) (viz. obrázek 24). Tato reakce byla později potvrzena obdobnou reakcí, kdy byl použit 2-methylaminoethanol. Při této reakci vznikla látka analogické struktury (4-methyl-3,4-dihydro-2H-pyrazino[2,3-b][1,4]oxazin-6,7-dikarbonitril (**21**)). Tvorba tohoto morfolinového kruhu je

vysvětlována substitucí atomu chloru nukleofilem[1] (amin[187], thiolát[188] nebo alkoholát[189]). Nejprve dochází k substituci jednoho atomu chloru silným nukleofilem (v našem případě sekundárním aminem), v dalším kroku volný sekundární amin přítomný v reakční směsi odebírá proton z hydroxylové skupiny alkoholu za vzniku alkoholátu. Takto generovaný nukleofil napadá v dalším kroku elektron-deficitní uhlík pyrazinového kruhu nesoucí zbývající atom chloru. Tvorba morfolinového kruhu je upřednostňována před tvorbou disubstituovaného derivátu pyrazindikarbonitrilu pravděpodobně kvůli stérickým efektům (blízkost alkoholátového nukleofilu × objemnost dalšího aminového nukleofilu).



Obrázek 25: Mechanismus tvorby morfolinového kruhu.

7.2 Syntéza AzaPc metodou statistické kondenzace



Obrázek 26: Přehled připravených AzaPc.

Nesymetrické deriváty AzaPc (**12-16**) byly připraveny metodou statistické kondenzace směsi dvou rozdílně substituovaných pyrazindikarbonitrilů butanolátem lithným v butanolu při teplotě 117 °C. Po převedení lithného komplexu na bezkovový derivát byl ze směsi vyizolován kongener typu A_3B , kde A je isoindolová jednotka substituovaná dvěma jednotkami diethylaminu a B je isoindolová jednotka nesoucí funkční skupinu. Tato izolace byla provedena sloupcovou chromatografií na silikagelu se dvěma až třemi opakováními. Ze směsi bylo nutné vyizolovat nejprve symetrický kongener **17**, který se skládá pouze z jednotek A. Tuto látku lze připravit také tetramerizací samotné jednotky A, tedy 5,6-bis(diethylamino)pyrazin-2,3-dikarbonitrilu. Při použití poměru prekurzorů 3:1 zbývající kongenery (A_2B_2 , AB_3 a B_4) vznikaly ve směsi v menším množství a nebylo obtížné je oddělit od kongeneru A_3B díky výrazně odlišným R_f hodnotám.

Ani syntéza nesymetrických AzaPc nebyla bez překvapivých reakcí. Hlavním problémem se ukázala syntéza a izolace AzaPc **13** a **14** nesoucích krátký řetězec s hydroxylovou skupinou. Oproti analogům s delším řetězcem (**12** a **15**) byly nesrovnatelně nižší výtěžky tetramerizace. Následně byl při analýze dat produktu **13** z hmotnostního spektroskopu (MS) pozorován hlavní signál odpovídající struktuře s molekulovou hmotností nižší o 74 jednotek, což pravděpodobně odpovídá ztrátě jedné

diethylaminové skupiny z periferní substituce makrocyklu. Zároveň vznikaly v okolí produktu **13** vedlejší fialové produkty, které indikovaly vedlejší reakce na periferní substituci makrocyklu. Podobné vedlejší produkty byly pozorovány i v blízkosti substance **17** izolované z této reakce. Tento problém jsme se pokusili odstranit zablokováním hydroxyskupiny chránicí skupinou (dimethoxytrityl), ale ani takto substituovaný prekurzor nevykazoval zlepšené výsledky.

Dále z prekurzoru **3** se nepodařilo připravit nesymetrický AzaPc, a to ani po zablokování obou hydroxyskupin dimethoxytritylovou chránicí skupinou. Při tetramerizaci s prekurzorem **11** poskytoval pouze symetrický derivát AzaPc **17**. Prekurzor **3** (nesoucí dva 2-hydroxyethylaminové řetězce) dokonce neposkytoval AzaPc ani tetramerizaci samotného prekurzoru, vznikaly pouze hnědé rozkladné produkty.

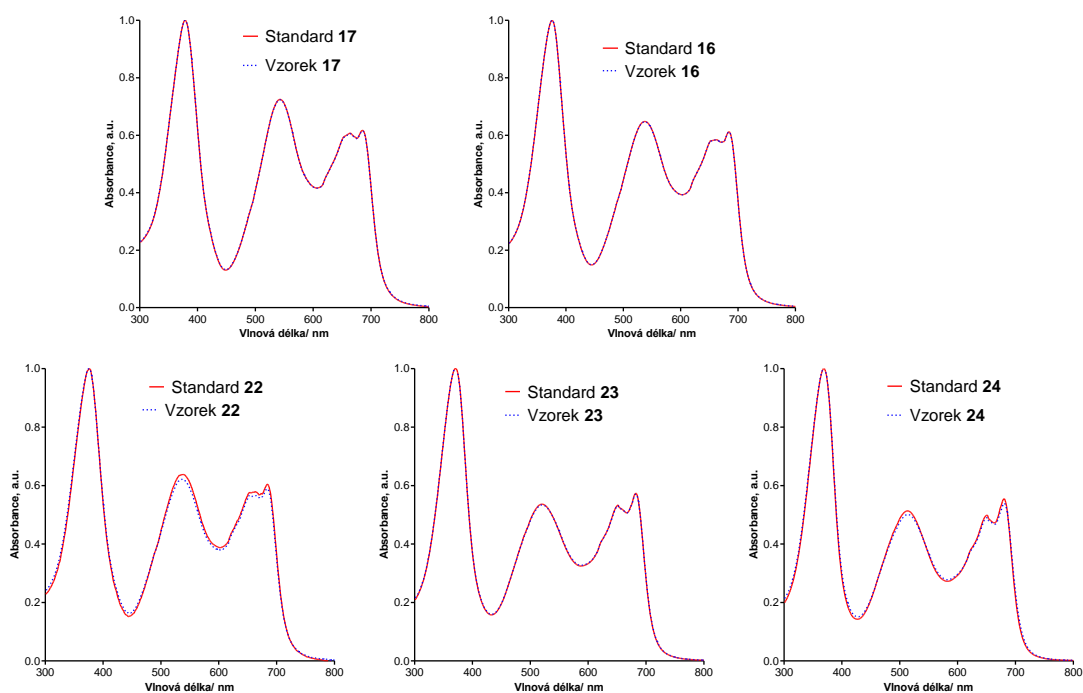
7.3 Optimalizace syntézy AzaPc pomocí HPLC analýzy

Syntéza nesymetrických AzaPc neprobíhá tak jednoduše jako syntéza symetrických derivátů. Pro jejich přípravu lze použít několik různých přístupů popsaných v metodické části. Nejrozšířenější metodou jejich přípravy je statistická kondenzace dvou různých prekurzorů. Tento postup dává vzniknout šesti různým molekulám (AAAA, AAAB, AABB, ABAB, ABBB a BBBB). Díky jejich podobnosti a společnému základu jsou označovány jako kongenery. Isolace jednotlivých kongenerů ze směsi je často komplikována špatnou rozpustností a tendencí k agregaci AzaPc. Úspěšná chromatografická separace všech kongenerů i z tohoto důvodu byla provedena pouze v několika málo případech[157, 158]. Zavedení objemného substituentu efektivně inhibuje tendenci k agregaci a umožňuje separaci.

Zastoupení jednotlivých kongenerů v reakční směsi při statistické tetramerizaci lze vypočítat. Reálná data ale mohou být ovlivněna mnoha faktory, kterými jsou především reaktivita jednotlivých prekurzorů a objemnost periferní substituce. Vypočtená data se se skutečnými daty budou shodovat u směsi dvou prekurzorů s podobnou reaktivitou a u těch, které nemají sterické zábrany pro tvorbu AzaPc.

Při použití poměru prekurzorů 1:1 lze z reakční směsi vyizolovat všechny kongenery v dostatečném množství z jedné reakce. Procentuální zastoupení jednotlivých kongenerů se liší v závislosti na poměru výchozích látek. Proto bylo

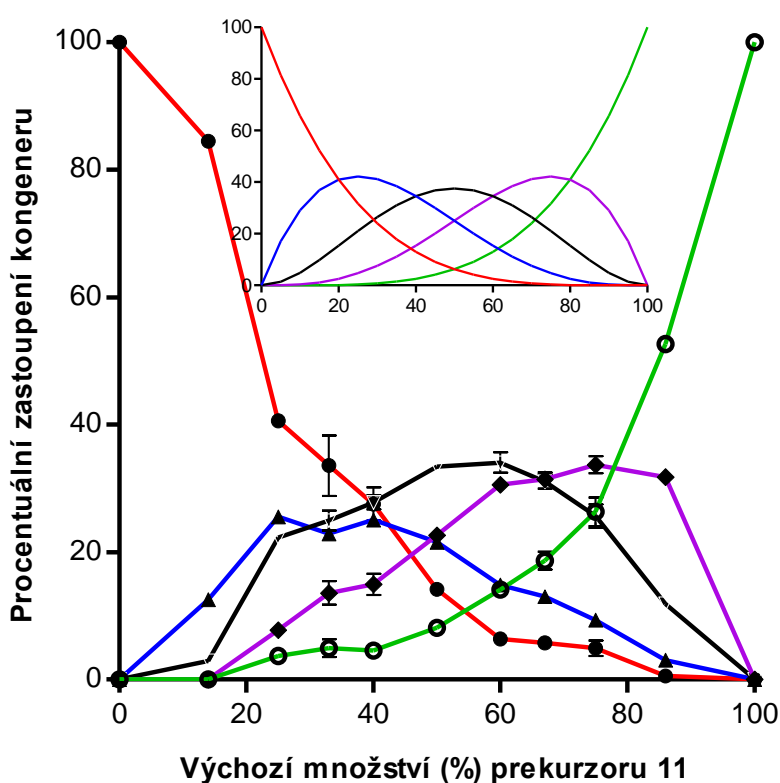
provedeno měření vlivu poměru prekurzorů na procentuální zastoupení jednotlivých látek. Při izolaci kongenerů preparativní sloupcovou chromatografií dochází ke ztrátám AzaPc během zpracování. Proto tento postup nemůže být použit pro analýzu distribuce, protože to může vést ke zkresleným výsledkům. Z tohoto důvodu nebyla reakční směs po promytí roztokem kyseliny octové dále čištěna, ale byla přímo analyzována pomocí HPLC. Navíc HPLC analýza byla jednodušší, přesnější a rychlejší. Žádný z vedlejších produktů tetramerizační reakce nebyl eluován ve stejném retenčním čase jako AzaPc. Tento fakt byl potvrzen porovnáním UV-Vis spektra chromatografického záznamu samotného standardu a analyzované směsi. Chromatografické záznamy byly navíc analyzovány při vlnové délce 510 nm, kde byla očekávána absorpce pouze makrocyklu AzaPc. Pro každý kongener byla změřena kalibrační křivka. Z její linearitě bylo potvrzeno, že v měřených koncentracích nedochází k žádné významné agregaci AzaPc v použité mobilní fázi.



Obrázek 27: Porovnání UV-Vis spekter standardů a jednotlivých frakcí ze směsi substancí při HPLC analýze substancí 16, 17, 22-24.

Získaná data jsou shrnuta v obrázku 28. Dle očekávání výtěžek reakce ve prospěch kongeneru typu AAAB (substance **16**) vzrůstal v rozsahu 0-25 % látky **9** v reakční směsi. Maxima bylo dosaženo při vzájemném poměru 3:1 prekurzorů **11** a **9** a

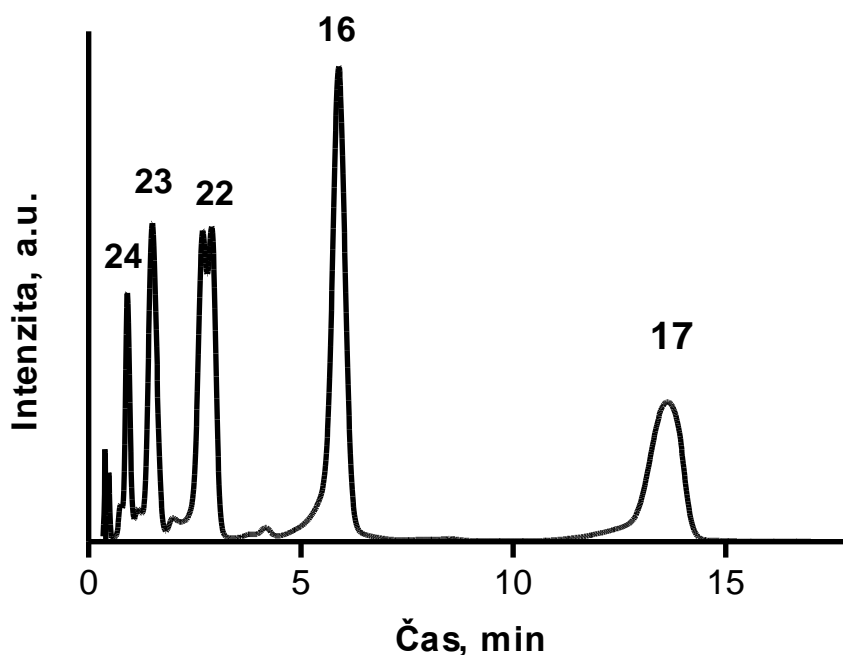
poté pomalu klesal ve prospěch zbývajících kongenerů. Podobné chování bylo pozorováno pro reverzní typ ABBB (substance **23**). Nejvyšší výtěžek typu A_2B_2 (substance **22**) byl pozorován při poměru prekurzorů 1:1. Všechna experimentálně naměřená data odpovídala teoretickému výpočtu. To byl také očekávaný výsledek vzhledem k velice podobné reaktivitě obou prekurzorů, což je způsobeno téměř stejnými elektronovými efekty periferních substituentů a nepřítomností sterických zábran pro tvorbu AzaPc. Poměr výchozích prekurzorů 3:1 je běžně používán k získání maximálního množství kongeneru typu AAAB, ale většinou pouze na základě teoretické predikce.



Obrázek 28: Procentuální zastoupení kongenerů ve směsi po statistické kondenzace. Látka **17** (červená křivka), **16** (modrá křivka), **22** (černá křivka), **23** (fialová křivka) a **24** (zelená křivka). Vložený obrázek ukazuje teoreticky vypočtenou distribuci kongenerů.

U kongeneru A_2B_2 (AzaPc **22**) bylo navíc pozorováno rozštěpení píku v HPLC záznamu pro tuto sloučeninu (viz obrázek 29.), což je způsobeno přítomností pěti polohových izomerů. Retenční faktory (R_f) těchto izomerů jsou natolik podobné, že k

úplné separaci nedošlo. Toto bylo pozorováno již při hledání vhodné mobilní fáze pro separaci na TLC, ale separace jednotlivých izomerů pomocí sloupcové chromatografie nebyla možná. V tohoto důvodu byla směs všech pěti izomerů považována za jednu sloučeninu. Podobně je tomu i kongeneru **23** a symetrického AzaPc **24**, kdy se jednalo o směsy čtyř polohových izomerů.



Obrázek 29: HPLC chromatogram standardů sloučenin 16, 17, 22-24 při použití optimální mobilní fáze. Měřeno při vlnové délce 510 nm.

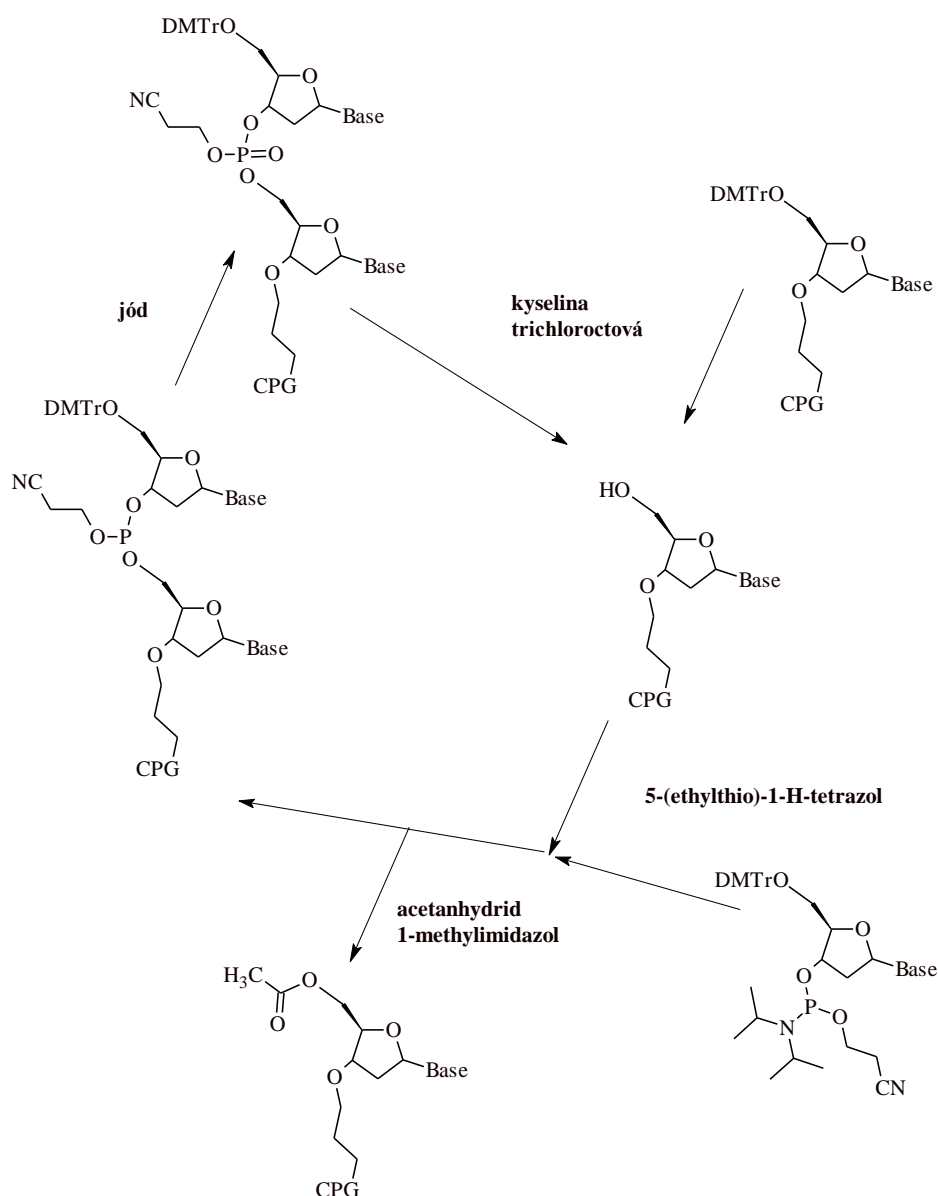
V některých případech nemusí procentuální zastoupení kongenerů odpovídat teoretickým výpočtům. A to především v případech, kdy jeden nebo oba prekurzory budou mít sterické zábrany ke spojení dvou sousedních isoindolových podjednotek. V tom případě je omezena nebo zcela znemožněna tvorba některých kongenerů a tím se snižuje jejich výtěžek nebo nemohou v reakční směsi vznikat vůbec[190]. V případě rozdílné reaktivity prekurzorů se mohou některé kongenery objevit ve vyšším výtěžku než by bylo vypočítané množství. V takovém případě je možné modifikovat postup tetramerizace změnou poměrů reaktantů nebo postupným přidáváním reaktivnějšího prekurzoru do reakce[158].

7.4 Měření stability AzaPc v reagentích pro syntézu oligonukleotidů

Oligonukleotidy je možné modifikovat na jejich 3'- nebo 5'-konci. Pro obě možnosti platí, že tuto modifikaci lze provést v roztoku až po syntéze oligonukleotidu na pevné fázi a jeho odštěpení a odblokování. Poté je ale nutné daný oligonukleotid purifikovat od přebytku použitého činidla, které musí být rozpustné ve vodě.

Druhou možností je provést navázání modifikující molekuly ještě na pevné fázi. Vazba na 3'-konec se většinou provádí modifikací pevné fáze, na které je syntetizován oligonukleotid, modifikující látka tedy musí být stabilní za podmínek syntézy oligonukleotidického řetězce.

Vazbu na 5'-konec je možné provést přímo reakcí fosforamiditu modifikující látky na řetězec oligonukleotidu nebo pomocí modifikátoru. Modifikátory jsou komerčně dostupné fosforamidity krátkých, alifatických řetězců nesoucích vhodnou reaktivní skupinu (např. aminoskupina, sulfanylskupina) blokovanou chránicí skupinou. V tomto posledním případě je vázaná látka vystavena pouze deprotektivnímu činidlu a nejsou na ní kladeny tak velké nároky na stabilitu v reagentích používaných při syntéze oligonukleotidů jako v případě 3'-modifikace.



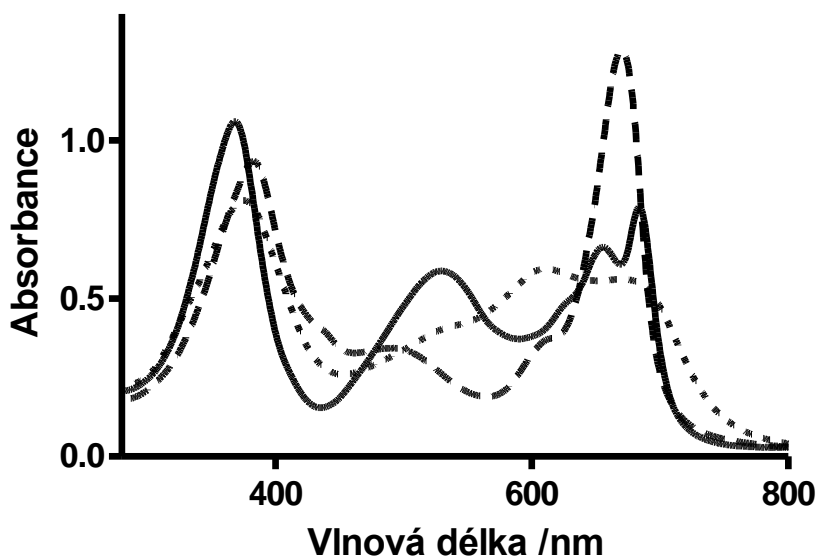
Obrázek 30: Cyklická syntéza oligonukleotidů na syntetiséro.

Pro použití AzaPc jako quencherů vázaných na oligonukleotidy na 3'-konci je nutná jejich dostatečná stabilita v roztocích používaných při syntéze a deprotekcí oligonukleotidických sond. Tato syntéza probíhá na přístrojích umožňující cyklické opakování reakcí s různými nukleotidy. Standardně tento cyklus zahrnuje deprotekcí hydroxylové skupiny blokované dimethoxytritylovou skupinou 3%-ním roztokem kyseliny trichloroctové v dichlormethanu, následuje aktivace uvolněné hydroxyskupiny 0,25 M roztokem 5-(ethylthio)-1H-tetrazolu v acetonitrilu, na kterou navazuje přidání nukleotidu ve formě fosforamiditu. Za standardních podmínek tato reakce probíhá na 98-100 %. Pro zamezení tvorby řetězce na nezreagovaných hydroxyskupinách o jiné

sekvenci následuje krok, ve kterém je přidán 10%-ní (m/m) roztok *N*-methyylimidazolu a 10%-ní roztok acetanhydridu v tetrahydrofuranu a pyridinu (8:1). Tím dojde k jejich zablokování acetylací. Posledním krokem cyklu syntézy oligonukleotidu je oxidace fosfinových skupin na fosfátové. K tomu se používá 0,02 M roztok jódu ve směsi tetrahydrofuran/pyridin/voda 7:2:1 (viz obrázek 30). Po nasyntetizování požadované sekvence je nutné odblokovat chránících skupin z jednotlivých bazí nukleotidů a chránící skupiny z fosfátové skupiny a zároveň odštěpit oligonukleotid z pevné fáze. To se děje v jednom kroku a běžně se používá 32%-ní roztok amoniaku, případně pro rychlé odblokování („ultra fast deprotection“) směs 32%-ní roztok amoniaku/40%-ní roztok methylaminu, 1:1 (AMA). Při značení fluorofory či jinými molekulami nestabilními v amoniaku či methylaminu se používá pro odblokování 0,05 M methanolický roztok uhličitanu draselného, ale s tím je třeba počítat dopředu a použít při syntéze oligonukleotidového řetězce k tomu určené nukleotidové monomery. Tato metoda deprotece je většinou označována jako „ultra mild deprotection“.

K testování stability byly vybrány AzaPc jak s funkční skupinou (**12**, **14**, **15** a **16**), tak i symetrický AzaPc **17**. Nejprve byly testovány roztoky používané při syntéze oligonukleotidů. Měření bylo provedeno smícháním roztoku AzaPc v příslušném rozpouštědle (dichlormethan, acetonitril, příp. tetrahydrofuran) a roztokem reagentů tak, aby výsledná koncentrace AzaPc byla 10 μ M a koncentrace reagentů odpovídala používaným koncentracím. Ihned po smíchání roztoků byla změřena absorbance. Roztoky byly poté míchány chráněny před světlem po dobu 24 hodin a v intervalech 2, 6 a 24 hodin byla opět změřena absorbance.

Ihned po smíchání AzaPc s roztokem **A** (3% (m/m) kyselina trichloroctová v dichlormethanu) byly pozorovány změny ve tvaru UV-Vis spektrech (viz. obrázek 31), ale ani tvar ani intenzita se v průběhu 24 hodin neměnila. Roztok **A** je silná organická kyselina, která způsobuje protonizaci atomů dusíku v testovaných AzaPc[191]. Při používané koncentraci kyseliny trichloroctové dochází k protonizaci periferních diethylaminových dusíků a pravděpodobně i k protonizaci azomethinového dusíku spojujícího dvě sousední isoindolinové podjednotky do prvního stupně. To se projevuje změnou („zploštěním“) absorpčního spektra. Tvar i intenzita spekter se vrací k původním hodnotám po promytí roztoku **A** vodným roztokem NaOH (1 mol \times dm⁻³). Tyto změny jsou tedy reverzibilní a použití roztoku **A** nezpůsobuje rozklad AzaPc.



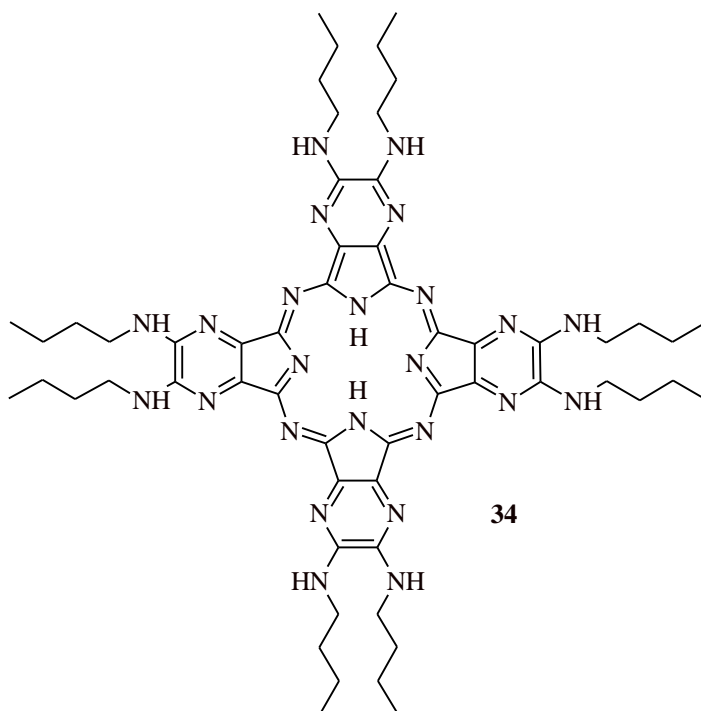
Obrázek 31: Absorpční spektra látky **15** v dichlormethanu (plná čára), v kyselém prostředí roztoku **A** (tečkovaná čára) a v bazickém prostředí roztoku **G** těsně po přidání do methanolického roztoku (přerušovaná čára). Koncentrace ve všech případech je $1 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$.

Stabilita v roztoku **B** (0,25 M 5-ethylthio-1*H*-tetrazol v acetonitrilu) byla výborná a v UV-Vis spektru nebyly pozorovány žádné změny tvaru spektra ani intenzity.

Reaktanty **C** (10% (m/m) 1-methylimidazol v tetrahydrofuranu) a **D** (tetrahydrofuran/pyridin/acetanhydrid 8:1:1) jsou obvykle smíchány dohromady v DNA/RNA syntetizéru ještě před reakcí v poměru 1:1. Stabilita byla tedy testována na směsi těchto dvou reakčních roztoků. Ani v tomto případě nebyly pozorovány změny v absorpčních spektrech. Byly pozorovány pouze očekávané změny, a to acetylace hydroxyskupin u látek **12**, **14** a **15**, což bylo pozorováno na TLC.

Reaktant **E** (0,02 M jód v tetrahydrofuran/pyridin/voda 7:2:1) je silné oxidační činidlo. Při měření v roztoku **E** v průběhu 24 hodin byla zjištěna významná nestabilita všech AzaPc obsahujících alespoň jednu sekundární aminoskupinu. Pouze látka **17** obsahující jako periferní substituenty pouze terciární aminoskupiny se ukázala být stabilní za těchto oxidačních podmínek. K potvrzení toho, že za rozklad je zodpovědná sekundární aminoskupina a ne terminální polární skupina byly otestovány další tři látky. Byla použita látka 2,3,9,10,16,17,23,24-oktakis(butylamino)-1,4,8,11,15,18,22,25-

(oktaaza)ftalocyanin (**34**) (již dříve připravena na našem pracovišti[1]), která obsahuje osm sekundárních aminoskupin a dále pak byla u AzaPc **15** zablokována hydroxylová skupina chránicí skupinou stabilní v oxidačním prostředí – acetyléster a dimethoxytritylether. Všechny tři sloučeniny byly také rozkládány roztokem **E**, navíc byly obě chráněné formy látky **15** rozkládány ve stejném poměru jako nechráněná látka **15**. Tato měření vedla k závěru, že sekundární aminoskupina je zodpovědná za nestabilitu makrocyklu AzaPc v oxidačním roztoku jódu. Nicméně, za typických podmínek standardní syntézy oligonukleotidické sondy obsahující 20 bazí je expozice AzaPc přibližně 15 minut. Jak je vidět z tabulky 2, stabilita po 15 minutách expozice roztoku **E** je rozmezí 92-97 %. To může být dostatečné pro syntézu krátké sondy obsahující quencher na jejím 3'-konci, ale díky nestabilitě quencherů bude pravděpodobně nutné připravené sondy purifikovat pomocí HPLC.



Obrázek 32: Struktura 2,3,9,10,16,17,23,24-oktakis(butylamino)-1,4,8,11,15,18,22,25-(oktaaza)ftalocyaninu.

Ze zjištěných výsledků vyplynul nový cíl syntetických prací, a to příprava nových prekurzorů a následně AzaPc nesoucích pouze terciární aminoskupiny a ověření námi navržené hypotézy. Po nasyntetizování a charakterizaci látky **29**, která nese volnou karboxylovou skupinu a pouze terciární aminoskupiny, byla změřena její stabilita v roztoku jódu. Naměřené výsledky potvrdily dřívější pozorování.

Deprotekce fosfátů a bazí se stejně jako odštěpení oligonukleotidu z pevné fáze provádí pomocí roztoků **F** (32% amoniak/40% methylamin 1:1) nebo **G** (0,05 M K_2CO_3 v methanolu). Během těchto měření se vyskytl problém s rozpustností a agregací testovaných látek. Roztok **F** je ve skutečnosti vodný roztok a je tedy nevhodný pro přímé testování vybraných AzaPc. Proto byly připraveny methanolicke roztoky látek **12**, **15-16** (látka **17** není rozpustná v methanolu) a smíchány s roztokem **F** pro alespoň přibližné simulování silně bazických podmínek. Tento postup nevedl k reprodukovatelným výsledkům vzhledem k silné agregaci a precipitaci AzaPc z roztoku během několika minut. Lepších výsledků bylo dosaženo s roztokem **G**, který je na bázi methanolu, ale i v tomto případě docházelo k precipitaci v průběhu 24 hodin. V tohoto důvodu byly methanolicke roztoky testovány pouze pomocí TLC, kdy byly přítomny pouze skvrny AzaPc a nebyly detekovány žádné rozkladné produkty. Z důvodu nedostatečné rozpustnosti testovaných AzaPc v roztocích **F** a **G** byla do testování přidána látka **24** nesoucí čtyři karboxylové skupiny a má vyšší rozpustnost v methanolu. I její rozpustnost v roztoku **F** je dostatečná pro testování stability bez precipitace v průběhu 24 hodin. UV-Vis spektra v obou roztocích vykazovala nečekaný tvar způsobený deprotonizací centrálních atomů dusíku (viz. obrázek 31). Deprotonizace může u AzaPc bez chelatovaného centrálního kovového ligandu probíhat do prvního a do druhého stupně. Rovnováha tohoto děje je silně posunuta k energeticky výhodnějšímu dianionu a monoanion nevzniká v detekovatelném množství [191-193]. V bazickém prostředí tedy dochází k tvorbě komplexu s vyšším stupněm symetrie a to je provázeno změnou absorpčního spektra, ve kterém mizí typické rozštěpení v oblasti 630-670 nm a objevuje se nové maximum při přibližně 650 nm. Při použití roztoku **F** byly sledovány změny ve tvaru absorpčního spektra v časovém intervalu. Změny ukazovaly na rostoucí množství dimerní formy AzaPc v roztoku, což je indikováno vzrůstem nového absorpčního maxima při 705 nm. Zároveň bylo pozorováno několik isosbestických bodů (666 nm, 607 nm, 577 nm a 458 nm), což ukazuje na jednoduchou změnu z monomerní formy AzaPc na dimerní formu. Vzhledem k nepřítomnosti nového maxima při nižších vlnových délkách, které by ukazovalo na přítomnost rozkladných produktů, mohou být změny v UV-Vis spektrech v roztoku **F** přisouzeny pouze agregaci AzaPc ve vodném prostředí. Toto je podpořeno přítomností isosbestických bodů, které by nemohly být tak přesné, pokud by zároveň docházelo k rozkladu měřených látek. Práce s roztokem **G** byla jednodušší díky vyšší rozpustnosti AzaPc **24** v methanolu,

kteřá způsobovala pouze malé změny zapříčiněné agregací ionizované formy. V tomto případě mohlo být navíc využito možnosti neutralizace bazického prostředí několika kapkami kyseliny octové. Neionizovaná forma látky **24** je dobře rozpustná v methanolu a neagreguje na rozdíl od ionizované formy. Absorpční spektrum zneutralizovaného roztoku AzaPc s roztokem **G** se v průběhu 24 hodin neměnilo a z toho vyplývá, že roztok **G** nezpůsobuje rozklad alkylaminoderivátů AzaPc.

AzaPc	Reaktant A	Reaktant B	Reaktant C+D	Reaktant E (24h)	Reaktant E (15min)	Reaktant F	Reaktant G
12	100 ^a	100	100 ^b	57	98	N ^f	100 ^{a, e}
14	100 ^a	100	100 ^b	34	95	N ^f	100 ^{a, e}
15	100 ^a	100	100 ^b	27, 28 ^c , 25 ^d	93, 93 ^c , 92 ^d	N ^f	100 ^{a, e}
16	100 ^a	100	100	24	96	N ^f	100 ^{a, e}
17	100 ^a	100	100	100	100	N	N
34	-	-	-	59	97	-	-
24	-	-	-	-	-	100 ^a	100 ^a
29	-	-	-	100	100	-	-

Tabulka 2: Stabilita studovaných AzaPc. Vyjádřeno v procentech zbylého AzaPc v příslušném roztoku po 24 hodinách.

^a Změny spekter v důsledku protonizace/deprotonizace.

^b Acetylace hydroxylových skupin.

^c Hydroxyskupina chráněna acetylovou skupinou.

^d Hydroxyskupina chráněna dimethoxytritylovou skupinou.

^e Precipitace po 24 hodinách, stabilita detekována pomocí TLC.

^f Methanolický roztok AzaPc precipitoval v průběhu několika minut.

N – neměřeno z důvodu vysrážení vzorku z měřeného roztoku.

7.5 Měření produkce singletového kyslíku a fluorescence

Přeměna molekulárního kyslíku O₂ na singletový kyslík ¹O₂ je vlastností mnoha látek. Obecně se vyskytuje u Pc a AzaPc po jejich aktivaci světlem o vhodné vlnové délce. Singletový kyslík je velice reaktivní agens, který ochotně interaguje s biomolekulami, a proto je využíván např. ve fotodynamické terapii (PDT). Pro tuto aplikaci je již registrováno několik přípravků ze skupiny porfyrinů, chlorinů i Pc. Pro použití AzaPc jako quencheru fluorescence v molekulárních sondách je produkce ¹O₂ nežádoucí z důvodu možné degradace připravených sond během syntézy, purifikace nebo aplikace.

Měření produkce kvantového výtěžku singletového kyslíku (Φ_{Δ}) je založeno na specifické chemické reakci singletového kyslíku s jeho scavengerem 1,3-difenylisobenzofuranem (DPBF) za vzniku 1,2-dibenzoylbenzenu. Zjištěné hodnoty Φ_{Δ} se pohybovaly v hodnotách do 0,003 (viz. tabulka 3), což jsou přibližně stokrát nižší hodnoty, než jsou typické hodnoty fotosensitizerů vhodných pro aplikaci v PDT ($\Phi_{\Delta} = 0,2-0,7$). Tyto velice nízké hodnoty zaručují, že připravené sondy nebudou podléhat rozkladu za normálních světelných podmínek. K rozkladu sondy by vlivem působení ¹O₂ nemělo docházet ani po osvětlení sondy silným zdrojem světla, který je používán pro excitaci fluoroforu.

AzaPc	Φ_{Δ} (DMF)
12	0,0012
14	0,0020
15	0,0015
16	0,0028
17	0,0013
29	0,0018

Tabulka 3: Hodnoty Φ_{Δ} připravených AzaPc.

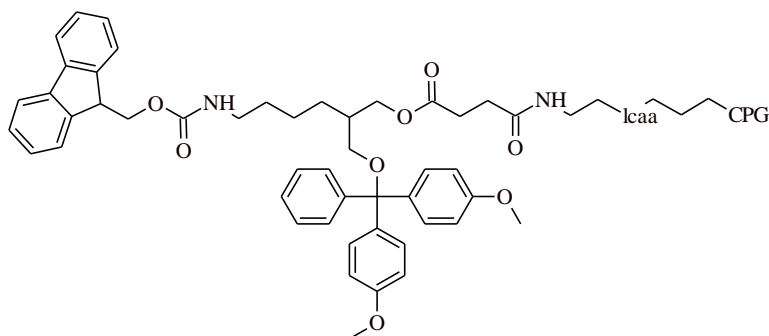
Fluorescence je obecně známou vlastností Pc a AzaPc. U alkylaminoderivátů nebyla naměřena žádná fluorescence. To je nejspíše způsobeno přenosem volného

elektronového páru z atomu dusíku na periferním substituentu a jeho zapojením do delokalizovaného systému elektronů makrocyclu. Tento přenos je indukován světlem. V zahraniční literatuře je označován jako „photo-induced electron transfer“ (PET).

7.6 Modifikace AzaPc pro přípravu značené pevné fáze

Jako nejvhodnější substance pro vazbu na pevnou fázi a následnou syntézu oligonukleotidických sond byl vybrán AzaPc **29** pro svoji vysokou stabilitu v používaných reagentech a zároveň pro přítomnost pouze jedné funkční (karboxylové) skupiny umožňující snadnou a definovatelnou modifikaci.

Vhodná pevná fáze pro syntézu oligonukleotidického řetězce vyžaduje přítomnost několika strukturních znaků. Nejdůležitějšími znaky jsou: 1) přítomnost hydroxylové skupiny (nejlépe blokované dimethoxytritylovou chránicí skupinou), na které po deprotekcii probíhá syntéza oligonukleotidu, a 2) vazba prvního monomeru nebo spojovacího článku k pevné fázi labilní v bazickém prostředí (nejvýhodnější a nejčastěji používaná je esterová vazba) umožňující odštěpení finálního produktu z pevné fáze. K tomuto účelu lze použít např. komerčně dostupný nosič s označením 3'-aminomodifikovaný C7 lcaa CPG (long chain alkyl amine-controlled pore glass), kde je hydroxyskupina blokována dimethoxytritylovou skupinou, která je labilní v kyselém prostředí roztoku kyseliny trichloroctové. Aminoskupina je blokována 9-fluorenylmethylkarbamátovou skupinou (Fmoc), která je labilní v bazickém prostředí (obvykle odblokovávána roztokem piperidinu). Na této pevné fázi lze tedy selektivně odblokovat aminoskupinu, na kterou je možné navázat látku (quencher) obsahující karboxylovou skupinu. Nevýhodou tohoto postupu je nemožnost kontroly loadingu (navázaného množství) quencheru (v našem případě nesymetrický AzaPc obsahující jednu karboxylovou skupinu) na pevnou fázi. Kromě toho reakce není kvantitativní, ne všechny aminoskupiny pevné fáze nesou značící molekulu. Při následné syntéze oligonukleotidu vznikají potom řetězce jak značené, tak i neznačené danou látkou a jejich separace bývá většinou obtížná. Další nevýhodou je vysoká cena takto modifikované pevné fáze.



Obrázek 33: Komerčně dostupná pevná fáze 3'-aminomodifikovaný C7 lcaa CPG

Pro zajištění „100%-ního“ loadingu AzaPc na oligonukleotidický řetězec byla připravena pevná fáze **33**. Jednalo se o amino lcaa CPG modifikovaný AzaPc **32**, který obsahuje potřebné strukturní prvky. Sloučenina **32** byla připravena z AzaPc **29** sledem reakcí zahrnující několik kroků. Nejprve byl připraven „aktivní“ ester – sukcinimidylester látky **29**, který aminolýzou 3-amino-1,2-propandiolem poskytl diol **30** obsahující jednu primární a jednu sekundární hydroxyskupinu. Primární skupina byla selektivně ochráněna dimethoxytritylovou skupinou za vzniku AzaPc **31**, který obsahoval volnou sekundární hydroxyskupinu. Ta byla esterifikována sukcinanhydridem za vzniku AzaPc **32**. Tato sloučenina obsahuje tedy hydroxyskupinu blokovanou dimethoxytritylem labilní v kyselém prostředí kyseliny trichloroctové, esterovou vazbu labilní v deprotekcčním roztoku a zároveň volnou karboxylovou skupinu umožňující efektivní vazbu na amino lcaa CPG.

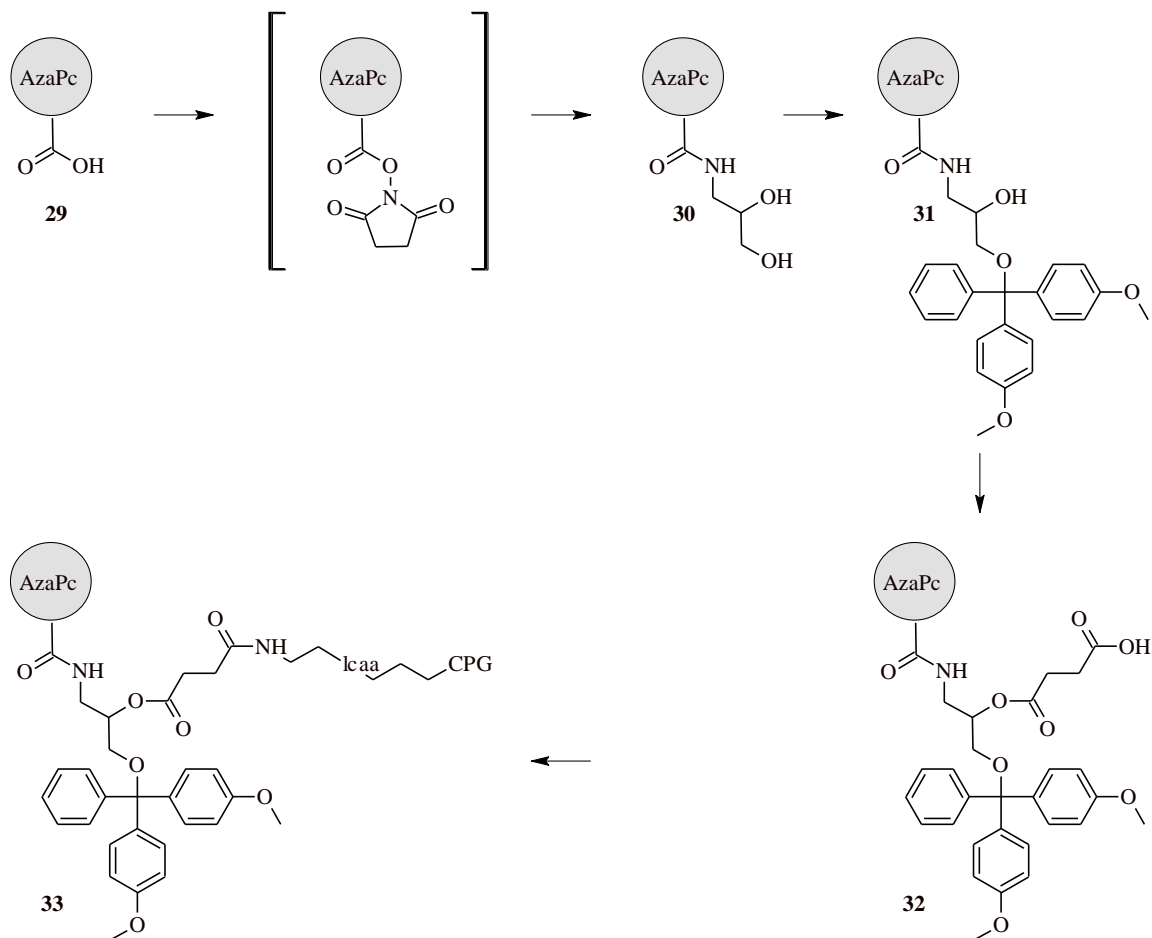
Při charakterizaci pomocí hmotnostní spektroskopie (MS MALDI-TOF) se jako látka podporující ionizaci používá kyselina trifluoroctová (TFA). Tato složka ale odštěpuje DMTr skupinu a tím dochází ke zkreslení výsledků. Při charakterizaci AzaPc **32** proto bylo měřeno hmotnostní spektrum jak s přidávkou TFA, tak i bez přidávku TFA. V druhém případě muselo být k ionizaci vzorku použito záření o vyšší intenzitě a tím docházelo k vyšší fragmentaci analyzované molekuly. Hodnoty zjištěné při obou těchto měření jsou uvedeny u charakterizace látky **32**. Rozdíl hodnot těchto dvou měření je 302, což přesně odpovídá odštěpení DMTr skupiny.

Vazba **32** na amino lcaa CPG pevnou fází byla provedena aktivací karboxylové skupiny pomocí *O*-(benzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethyluronium hexafluorofosfátu (HBTU). HBTU je často používaný reaktant v peptidické chemii pro tvorbu amidové vazby a jeho výhody jsou jednoduché reakční podmínky, krátký reakční čas a vysoké výtěžky. Zbývající volné aminoskupiny na pevné fázi byly následně zablokovány

acetylací acetanhydridem ve směsi s *N*-methylimidazolem, aby nedocházelo k syntéze oligonukleotidů na těchto volných skupinách. Po vyčištění pevné fáze byl změřen loading dimethoxytritylu.

Loading ($\mu\text{mol/g}$) = (absorbance při 498 nm) \times zředění \times 143/(navážka pevné fáze, mg).

Množství AzaPc vázaného na pevnou fázi se pohybovalo z rozmezí 20-50 $\mu\text{mol} \times \text{g}^{-1}$ pevné fáze, což je ideální množství pro syntézu oligonukleotidů.



Obrázek 34: Příprava pevné fáze 30 značené AzaPc s jednou karboxylovou skupinou.

Takto upravený nosič byl přímo použit pro přípravu oligonukleotidických sekvencí použitých pro testování účinnosti quenchingu alkylaminoderivátů AzaPc.

7.7 Měření účinnosti zhášení fluorescence AzaPc

Pro potvrzení možného použití AzaPc jako zhášečů fluorescence v molekulárních sondách byly připraveny komplementární sekvence oligonukleotidů, kdy jeden řetězec nesl na 3'-konci AzaPc a druhý řetězec nesl na 5'-konci fluorescenční indocyaninové barvivo Cy5[®].

Na pevné fázi **33** byly standardním postupem na syntetizéru Perkin Elmer ABI 392/394 RNA/DNA syntetizovány oligonukleotidy se sekvencemi **S1**, **S2** a **S3** značené na svém 3'-konci AzaPc. Všechny tři řetězce měly shodné sekvence komplementární k oligonukleotidu **S4**, který byl na 5'-konci značený komerčně dostupným fluoroforem Cy5[®]. Oligonukleotid **S1** měl délku odpovídající sekvenci **S4** a byl vhodný pro stanovení statického zhášení, oligonukleotid **S3** byl na 3'-konci prodloužen o 10 bazí nekomplementárních se sekvencí **S4**, čímž došlo k oddálení fluoroforu a quencheru. Toto oddálení je potřebné pro stanovení dynamického zhášení. U oligonukleotidu **S2** byla sekvence na 3'-konci prodloužena o 5 bazí a při takovéto vzdálenosti fluoroforu a quencheru se mohou projevit oba principy zhášení[194].

S1: 5'- GAA GTC GGG TGG TCA AAA AGC AGA - AzaPc - 3'

S2: 5'- GAA GTC GGG TGG TCA AAA AGC AGA TTT TT - AzaPc - 3'

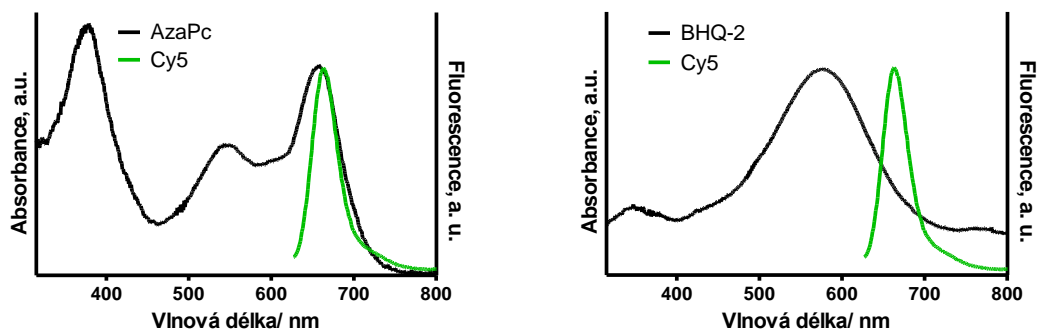
S3: 5'- GAA GTC GGG TGG TCA AAA AGC AGA TTT TTT TTT T - AzaPc - 3'

S4: 5'- Cy5TM- TCT GCT TTT TGA CCA CCC GAC TTC - 3'

Pro porovnání byly syntetizovány stejné sekvence **S1**, **S2** a **S3** značené na 3'-konci komerčně dostupným quencherem BHQ-2[®].

	S1	S2	S3
AzaPc	89,5 %	94,0 %	89,0 %
BHQ-2 [®]	92,5 %	91,5 %	80,5 %

Tabulka 4: Efektivita zhášení AzaPc a BHQ-2[®] fluoroforu Cy5[®]

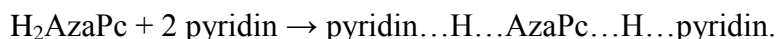


Obrázek 35: Srovnání spektrálních překryvů absorpčních spekter BHQ-2[®] a AzaPc a emisního spektra fluoroforu Cy5[™].

7.8 Měření tvorby komplexu s pyridinem

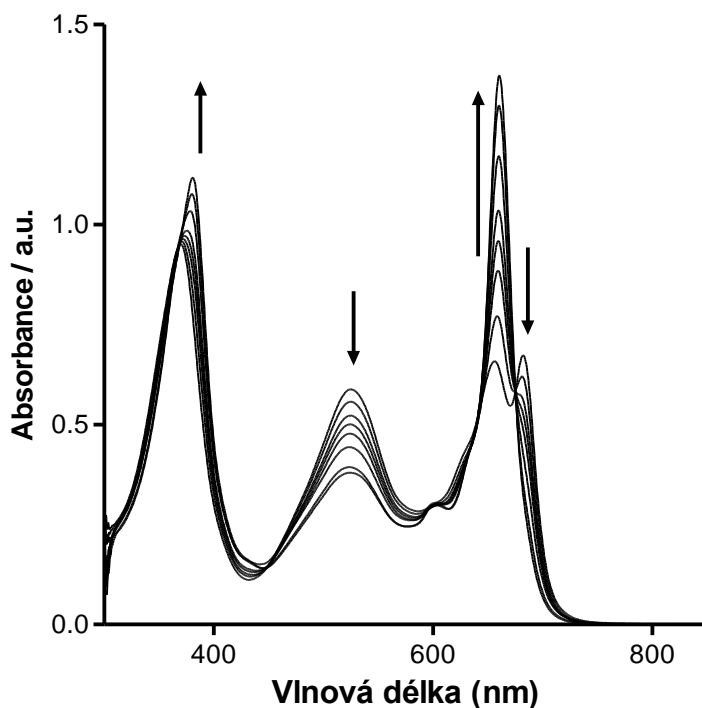
Zajímavým jevem při rozpuštění AzaPc ve slabě bazických rozpouštědlech (např.: pyridin, DMF) byla postupná změna UV-Vis spektra tohoto roztoku. Vizually se to projevilo přechodem z fialové barvy do modré.

Bezkovové Pc a AzaPc se chovají jako slabé *N*-kyseliny a proto mohou podléhat deprotonizaci v bazickém prostředí na obou centrálních atomech dusíku. Tento proces je obvykle spojen se změnou barvy. V případě, že jsou protony úplně odtrženy, vznikají pravé iontové sloučeniny. Tvorba tzv. „proton-transfer komplexu“ byla popsána v několika publikacích v případech interakce se slabými bazemi (aminy, DMF nebo DMSO)[195-197]. Tato reakce probíhá podle rovnice (v našem případě pyridin)

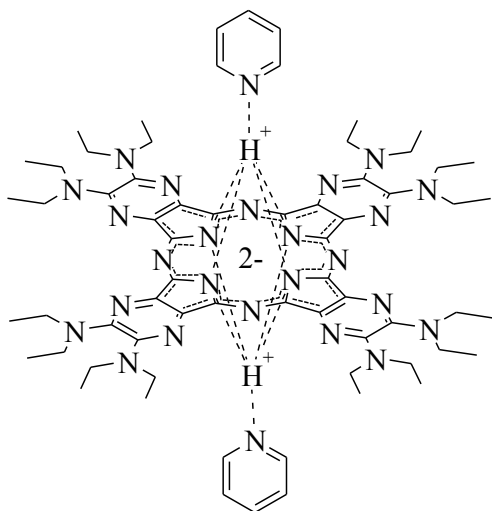


Molekula AzaPc neztrácí proton úplně, ale tvoří adukt se dvěma molekulami pyridinu. Byla změřena kinetika tvorby komplexu s pyridinem u připravených AzaPc **12**, **14**, **15** a **17**. Absorpční spektra v UV-Vis oblasti se po rozpuštění v pyridinu postupně měnila (viz. obrázek 36). Tento proces byl spojen se změnou barvy z fialové do modré. Rozštěpení Q-pásu, které je charakteristické pro D_{2h} symetrickou molekulu AzaPc, se měnilo na nerozštěpené spektrum odpovídající D_{4h} symetrii molekuly. D_{4h} spektrum se typické pro vysoce symetrickou molekulu AzaPc a je přítomno pouze pokud jsou na

molekulu AzaPc komplexovány dvě molekuly pyridinu, každá na jedné straně makrocyclu. Během měření byly nalezeny isosbestické body, což značí, že adukt je tvořen přímo se dvěma molekulami pyridinu bez detekovatelného množství meziprojektu s jednou molekulou.



Obrázek 36: Změny v UV-Vis absorpčním spektru sloučeniny 12 v pyridinu v čase (3 min. – 24 hod.).



Obrázek 37: Předpokládaná struktura AzaPc jako proton transfer komplexu s pyridinem.

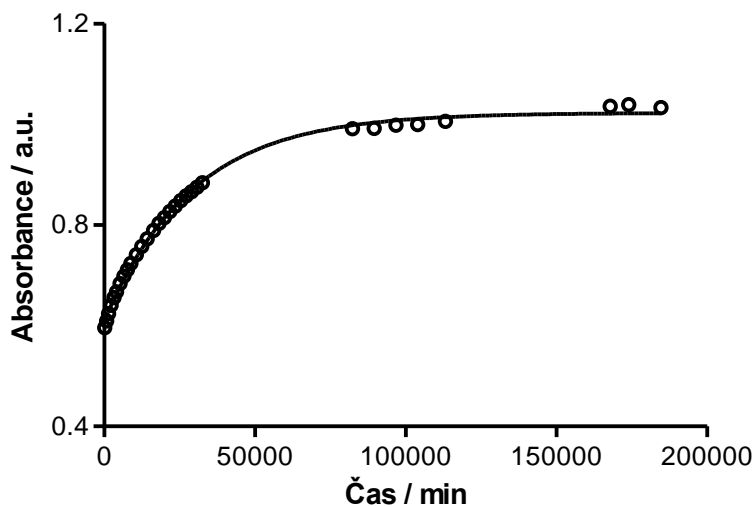
Měření s výše zmíněnými AzaPc ukázala rozdílné kinetické parametry tvorby komplexů. Reakce probíhá podle kinetiky pseudo-prvního řádu, protože pyridin (jeden z reaktantů) je ve velkém přebytku a tudíž je jeho koncentrace konstantní. V tom případě může být rovnice odvozena (7)

$$A_t = A_0 + (A_{\max} - A_0)(1 - e^{-k_r t}), \quad (7)$$

kde A_t je absorbance v čase t , A_{\max} je absorbance v oblasti plateau, A_0 je absorbance v čase 0 a k_r je rychlostní konstanta. Změny spektra byly měřeny při konstantní vlnové délce, v maximu Q-pásu tvořeného komplexu (okolo 662 nm), kde jsou změny v absorpci největší. Rychlostní konstanta byla odvozena z nelineární regrese z dat získaných v různých časech. Hodnoty k_r získané z lineární regrese a spektrální data jsou uvedeny v tabulce 5.

Sloučenina	k_r (s ⁻¹)	λ_{\max} (ε) komplexu v pyridinu
12	$6,05 \times 10^{-5}$	661 (137300)
14	$3,00 \times 10^{-5}$	662 (108800)
15	$1,71 \times 10^{-4}$	662 (138600)
17	$1,62 \times 10^{-4}$	663 (131500)
17 + ethanol	$2,45 \times 10^{-4}$	663 (151400)
17 + <i>n</i> -oktanol	$1,82 \times 10^{-4}$	663 (150700)

Tabulka 5: Rychlostní konstanty k_r tvorby komplexu s pyridinem a spektrální data v Q-pásu.



Obrázek 38: Absorbance pyridinového roztoku substance **14** při 662 nm v závislosti na čase po rozpuštění. Naměřené hodnoty (o) a vypočítané hodnoty (plná čára) podle rovnice 7 s dosazenými hodnotami lineární regrese $3,00 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$.

Jak je vidět z reakčních konstant k_r , tvorba aduktu je pomalejší (přibližně o jeden řád) u látek **12** a **14**, což může být způsobeno přítomností hydroxylové skupiny. Proto byla provedena studie s látkou **17** (bez přítomnosti hydroxylové skupiny) v pyridinu s přidavkem alkoholu (ethanol, *n*-oktanol – vždy 1% v/v) k potvrzení nebo vyvrácení efektu hydroxyskupiny na rychlost tvorby „proton-transfer komplexu“ s pyridinem. Reakční rychlosti byly podobné, případně o málo vyšší než bez přítomnosti alkoholu. Hydroxylová skupina tedy nemá vliv na rychlost tvorby komplexu s pyridinem. Rozdíly v rychlosti tvorby těchto komplexů vyplývají proto pravděpodobně z jiných strukturních faktorů dané sloučeniny.

8 ZÁVĚR

V této práci je popsána syntéza nových nesymetrických alkylaminoderivátů AzaPc s definovaným počtem funkčních skupin vhodných pro následnou vazbu na pevnou fázi a syntézu oligonukleotidových řetězců (hydroxy- a karboxyskupiny). Přítomnost jedné funkční skupiny umožňuje kontrolovat modifikaci substancí a zároveň zamezuje tvorbě více oligonukleotidových řetězců na jedné molekule AzaPc. Dále je zde popsána optimalizace jejich syntézy pomocí HPLC analýzy reakčních směsí, připravených smícháním výchozích pyrazindikarbonitrilů v různých poměrech. Z poměrů vznikajících kongenerů byl vybrán nejvýhodnější poměr, tedy poměr prekurzorů 3:1 v neprospěch prekurzoru nesoucího funkční skupinu, pro syntézu kongeneru A₃B, který se shodoval s vypočítanými hodnotami. Dále byla testována stabilita připravených AzaPc v roztocích reagentů používaných při syntéze oligonukleotidů. Z těchto měření bylo zjištěno, že AzaPc obsahující alespoň jednu periferní sekundární aminoskupinu jsou rozkládány roztokem jodu. AzaPc obsahující pouze terciární aminoskupiny na periférii makrocyclu jsou v tomto roztoku stabilní a tedy dále použitelné. Vybraný stabilní AzaPc byl následně modifikován a navázán na pevnou fázi. Na takto modifikované pevné fázi byla následně provedena syntéza oligonukleotidické sondy nesoucí na svém 3'-konci vázaný AzaPc. Dále byla připravena komplementární sonda značená na 5'-konci fluoroforem Cy5TM a smícháním roztoků těchto dvou komplementárních sond byla změřena účinnost zhášení fluorescence v porovnání s komerčně dostupným quencherem BHQ-2TM. Při jejich porovnání bylo zjištěno, že při statickém quenchingu je účinnost rovnocenná, ale při dynamickém quenchingu je účinnost zhášení AzaPc vyšší než u BHQ-2TM. To je způsobeno větším překryvem fluorescenčního spektra fluoroforu a absorpčního spektra quencheru v případě AzaPc. Možnost použití AzaPc jako quencheru fluorescence je dále umožněno minimální produkcí singletového kyslíku (¹O₂) a nulovou vlastní fluorescencí, což jsou obecně známé vlastnosti ftalocyaninů a AzaPc s alkoxylovou a alkylsulfanylovou periferní substitucí. Singletový kyslík je velmi reaktivní agens napadající biomolekuly a způsobuje jejich degradaci, tedy i oligonukleotidových řetězců

tvořících molekulární sondy. Z tohoto důvodu je jeho produkce nežádoucí. Zároveň vlastní fluorescence quencheru znesnadňuje analýzu vzorků a je také nežádoucí.

Připravené AzaPc pro aplikaci jako quencher fluorescence mají oproti běžně používaným quencherům výhodu v tom, že je možné záměnou pyrazinového kruhu za chinoxalinový v různém poměru plynule měnit absorpční maximum připraveného AzaPc. Přikondenzováním dalšího aromatického jádra se absorpce posunuje k vyšším vlnovým délkám a tím bude možné účinně zhaset fluorofor Cy5.5TM, případně i Cy7TM. Navíc je možné je použít pro kterýkoliv fluorofor od fluoresceinu po indocyanin Cy5TM, což je dáno absorpcí AzaPc v oblasti 450-700 nm. To žádný z v současnosti používaných quencherů neumožňuje, tzn. AzaPc mohou být univerzálními quencheri pro prakticky celou škálu běžně používaných fluoroforů.

Bezkovové AzaPc mají vlastnosti slabých *N*-kyselin. Atomy dusíku ze středu makrocycly mohou být deprotonovány. Při použití slabých bazí (např. pyridin, DMF) nedochází k úplnému odtržení protonu, ale k vytvoření tzv. „proton-transfer komplexu“ složeného z bezkovového AzaPc a dvou molekul bazického rozpouštědla. To způsobuje změnu symetrie molekuly AzaPc a s tímto procesem je spojena také změna barvy roztoku, v tomto případě z fialové do modré. Tvorba komplexu probíhá podle kinetiky pseudo-prvního řádu (reaktant - rozpouštědlo je ve velkém přebytku) a je závislá na strukturních faktorech celé molekuly.

9 SOUHRN

Tato disertační práce se zabývá hledáním strukturně nových potenciálních nefluoreskujících zhášeců fluorescence, použitelných pro přípravu molekulárních sond. Tyto potenciální zhášecy jsou odvozeny od nesymetricky substituovaných alkylaminoderivátů tetrapyrazinoporfyrazinů - azaftalocyaninů. Součástí práce je také příprava prekurzorů – 5,6-disubstituovaných pyrazin-2,3-dikarbonitrilů. Z nich byly připraveny finální sloučeniny – azaftalocyaniny obsahující různé funkční skupiny (hydroxy- a karboxyskupiny). Celkem bylo připraveno:

14 meziproductů (z toho 3 dříve popsáné na našem pracovišti)

13 finálních azaftalocyaninů (z toho 1 dříve popsán na našem pracovišti)

1 modifikovaná pevná fáze vhodná pro syntézu značeného oligonukleotidy

2 vedlejší produkty

Podářilo se připravit 23 dosud nepopsaných sloučenin. Syntéza 4 sloučenin byla neúspěšná.

Finální produkty byly testovány na produkci singletového kyslíku, stabilitu v roztocích používaných při syntéze oligonukleotidů a následně na schopnost zhášení fluorescence komerčně dostupného a často používaného fluoroforu Cy5[®] v porovnání s komerčně dostupným zhášecem Black Hole Quencher-2[®]. Součástí této práce bylo také ověření rozložení zastoupení jednotlivých kongenerů vznikajících při statistické tetramerizace prekurzorů pomocí metody HPLC s UV-vis detekcí. Dále pak byla změřena kinetika tvorby komplexu AzaPc s pyridinem. AzaPc se chovají jako slabé kyseliny a jsou schopné komplexovat dvě molekuly slabé baze, v tomto případě pyridinu. To je spojeno se změnou symetrie molekuly a se změnou barvy roztoku.

Byla podána přihláška vynálezu na aplikaci azaftalocyaninů jako zhášeců fluorescence.

10 SUMMARY

This dissertation thesis deals with searching of structurally new non-fluorescent quenchers of fluorescence, which may be used for preparation of molecular probes. These potential quenchers are derived from asymmetrically substituted alkylaminoderivatives of tetrapyrazinoporphyrazines – azaphthalocyanines. As the part of this work is preparation of precursors – 5,6-disubstituted pyrazine-2,3-dicarbonitriles. They are starting material for the preparation of final substances – tetrapyrazinoporphyrazines bearing different functional moieties.

In total were prepared:

14 intermediates (3 of them have been described in our department)

13 final tetrapyrazinoporphyrazines (1 of them has been described in our department)

1 modified solid phase suitable for synthesis of marked oligonucleotides

2 by-products

23 undescribed compounds were prepared. Synthesis of 4 substances was not successful.

Final products were tested for their singlet oxygen quantum yields, stability in solutions used for synthesis of oligonucleotides and subsequently ability of quenching of commercially available fluorophore Cy5[®]. This ability was compared with commercially available quencher Black Hole Quencher-2[®]. As a part of this work is confirmation of distribution of congeners arising during the statistical tetramerization of precursors by HPLC method with UV-vis detection. The kinetic of formation of complexes with pyridine was measured. AzaPcs have weak *N*-acids properties and can complex with two molecules of weak bases, in my case with pyridine. This is link together with change of symmetry and change of colour of solution of AzaPc.

This new application of azaphthalocyanines is patent pending.

11 SEZNAM PUBLIKOVANÝCH PRACÍ

11.1 Práce v odborných časopisech

Zimcik P., Miletin M., Kostka M., Schwarz J., Musil Z., Kopecky K.: Synthesis and comparison of photodynamic activity of alkylheteroatom substituted azaphthalocyanines. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* **2004**, 163, (1-2), 21-28. **IF₂₀₀₃=1,693**. Podíl na publikaci 15%.

Kostka M., Zimcik P., Miletin M., Klemra P., Kopecky K., Musil Z.: Comparison of aggregation properties and photodynamic activity of phthalocyanines and azaphthalocyanines. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* **2006**, 178, (1), 16-25. **IF₂₀₀₅=2,286**. Podíl na publikaci 15%.

Musil Z., Zimcik P., Miletin M., Kopecky K., Link M., Petrik P., Schwarz J.: Synthesis and singlet oxygen production of azaphthalocyanines bearing functional derivatives of carboxylic acid. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines* **2006**, 10, (2), 122-131. **IF₂₀₀₅=1,139**. Podíl na publikaci 10%.

Zimcik P., Miletin M., Musil Z., Kopecky K., Kubza L., Brault D.: Cationic azaphthalocyanines bearing aliphatic tertiary amino substituents - Synthesis, singlet oxygen production and spectroscopic studies. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* **2006**, 183, (1-2), 59-69. **IF₂₀₀₅=2,286**. Podíl na publikaci 15%.

Musil Z., Zimcik P., Miletin M., Kopecky K., Lenco J.: Synthesis, separation and UV/Vis spectroscopy of pyrazino-quinoxalino-porphyrzine macrocycles. *European Journal of Organic Chemistry* **2007**, (27), 4535-4542. **IF₂₀₀₆=2,769**. Podíl na publikaci 15%.

Musil Z., Zimcik P., Miletin M., Kopecky K., Petrik P., Lenco J.: Influence of electron-withdrawing and electron-donating substituents on photophysical properties of azaphthalocyanines. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* **2007**, 186, (2-3), 316-322. **IF₂₀₀₆=2,098**. Podíl na publikaci 15%.

Petrik P., Zimcik P., Kopecky K., Musil Z., Miletin M., Loukotova V.: Protonation and deprotonation of nitrogens in tetrapyrazinoporphyrazine macrocycles. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines* **2007**, 11, (7), 487-495. **IF₂₀₀₆=1,115**. Podíl na publikaci 20%.

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. *Photochemistry and Photobiology* **2007**, 83, (6), 1497-1504. **IF₂₀₀₆=2,061**. Podíl na publikaci 15%.

Kopecky K., Zimcik P., Novakova V., Miletin M., Musil Z., Stribna J.: The synthesis and characterization of metal-free, unsymmetrical azaphthalocyanines with hydroxy groups and their complex formation with pyridine. *Dyes and Pigments* **2008**, 78, 231-238. **IF₂₀₀₇=2,796**. Podíl na publikaci 75%.

Zimcik P., Miletin M., Musil Z., Kopecky K., Slajsova D.: The synthesis and characterization of novel unsymmetrical azaphthalocyanines containing one carboxylic group. *Dyes and Pigments* **2008**, 77, (2), 281-287. **IF₂₀₀₇=2,796**. Podíl na publikaci 10%.

Novakova V., Zimcik P., Kopecky K., Miletin M., Kunes J., Lang K.: Self-assembled azaphthalocyanine dimers with higher fluorescence and singlet oxygen quantum yields than the corresponding monomers. *European Journal of Organic Chemistry* **2008**, 19, 3260-3263. **IF₂₀₀₇=2,914**. Podíl na publikaci 15%.

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. *Macroheterocycles* **2008**, 1, (1), 21-29. Podíl na publikaci 15%.

Zimcik P., Miletin M., Novakova V., Kopecky K., Dvorakova Z.: Tetrapyrazinoporphyrazines with different number of peripheral pyridyl rings. Synthesis, photophysical and photochemical properties. *Dyes and Pigments* **accepted**. Podíl na publikaci 10%.

11.2 Patentová přihláška

Miletín M., Zimčík P., Kopecký K., Musil Z., Nováková V., Haluza R., Bunčec M.: Nefluoreskující deriváty ftalocyaninů a azaftalocyaninů jako zhášedce fluorescence. Přihláška vynálezu **PV 2008-415**, (2. 7. 2008).

11.3 Abstrakty ze symposií a konferencí

Kopecký, K.; Zimčík, P.; Musil, Z.; Miletín, M., Deriváty asymetrických azaftalocyaninů jako „dark quencher“. *57. zjazd chemických spoločností*, Vysoké Tatry, Tatranské Matliare, Slovensko, 4.-8. september **2005**. In *ChemZi*, **2005**, 1, (1), 215-216. ISSN 1336-7242.

Zimčík, P.; Kostka, M.; Miletín, M.; Musil, Z.; Kopecký, K., Agregační rozdíly mezi ftalocyaniny a azaftalocyaniny. *57. zjazd chemických spoločností*, Vysoké Tatry, Tatranské Matliare, Slovensko, 4.-8. september **2005**. In *ChemZi*, **2005**, 1, (1), 248. ISSN 1336-7242.

Kopecký, K.; Zimčík, P., Syntéza metabolitů halucinogenů DOB a 2C-B. *Sborník XXXIV. konference Syntéza a analýza léčiv*, Brno, Česká republika, 12.-14. září **2005**, s. 81. ISBN 80-7305-533-3.

Musil, Z.; Zimčík, P.; Kopecký, K., Vztah mezi strukturou a produkcí singletového kyslíku u derivátů azaftalocyaninů. *Sborník XXXIV. konference Syntéza a analýza léčiv*, Brno, Česká republika, 12.-14. září **2005**, s. 101. ISBN 80-7305-533-3.

Kopecký, K.; Musil, Z.; Zimčík, P., Základní principy fotodynamické terapie v negraduální výuce. *58. sjezd chemických společností*, Ústí nad Labem, Česká republika, 4.-8. září **2006**. *Chemické listy*, **2006**, 100, (8), 695-696. ISSN 0009-2770.

Kopecky, K.; Satinsky, D.; Zimcik, P.; Svoboda, A.; Petrik, P., Optimization of synthesis of desired congeners of tetrapyrazinophyrazines. *Book of abstracts of the XII. Blue Danube Symposium on Heterocyclic Chemistry*. Tihany, Hungary, June 10-13th, **2007**, p. 92. ISBN 978-963-7067-15-0.

Kopecký, K.; Šatinský, D.; Zimčík, P.; Svoboda, A., Optimalizace syntézy žádaných kongenerů tetrapyrizinoporfyrazinů. *42. konference Pokroky v organické, bioorganické a farmaceutické chemii*, Nymburk, Česká republika, 16.-18. listopad **2007**. *Chemické listy*, **2007**, 101, (11), 948-949. ISSN 0009-2770.

Kopecky, K.; Zimcik, P.; Miletin, M.; Novakova, V., Binding of tetrapyrizinoporphyrazine to a standard solid phase. *Fifth International Conference on Porphyrins and Phthalocyanines, Book of Abstracts*. Moscow, July 6-11, **2008**, p. 429.

Kopecky, K.; Zimcik, P.; Miletin, M.; Novakova, V., Alkylaminoderivatives of tetrapyrizinoporphyrazines – new effective quenchers of fluorescence. *Fifth International Conference on Porphyrins and Phthalocyanines, Book of Abstracts*. Moscow, July 6-11, **2008**, p. 430.

Novakova, V.; Zimcik, P.; Kopecky, K., Inhibition of photo-induced electron transfer by forming of stable azaphthalocyanine J-dimers. *Fifth International Conference on Porphyrins and Phthalocyanines, Book of Abstracts*. Moscow, July 6-11, **2008**, p. 495.

Novakova, V.; Zimcik, P.; Kopecky, K., Synthesis of zinc quinoxalinoporphyrazine macrocycles. *Fifth International Conference on Porphyrins and Phthalocyanines, Book of Abstracts*. Moscow, July 6-11, **2008**, p. 496.

Zimčík, P.; Miletín, M.; Kopecký, K.; Nováková, V., Syntéza a aplikace nových zhášečů fluorescence použitelných v DNA sondách. *37. konference Syntéza a analýza léčiv*, Brno, Česká republika, 8.-10. září **2008**. *Chemické listy*, **2008**, 102 (S), 206. ISSN 0009-2770.

Nováková, V.; Zimčík, P.; Kopecký, K., Vliv periferní substituce na fluorescenci a produkci singletového kyslíku u derivátů azaftalocyaninů. *37. konference Syntéza a analýza léčiv*, Brno, Česká republika, 8.-10. září **2008**. *Chemické listy*, **2008**, 102 (S), 236. ISSN 0009-2770.

Miletín, M.; Zimčík, P.; Kopecký, K.; Nováková, V.; Grandová, M., Solubilizační systémy pro fotodynamicky aktivní azaftalocyaniny. *37. konference Syntéza a analýza léčiv*, Brno, Česká republika, 8.-10. září **2008**. *Chemické listy*, **2008**, 102 (S), 236. ISSN 0009-2770.

12 PŘÍLOHA

ÚŘAD PRŮMYSLOVÉHO VLASTNICTVÍ

Antonína čermáka 2a, 160 68 Praha 6
 Tel: 220 383 111 Fax: 224 324 718
 E-mail: posta@upv.cz

WWW.UPV.CZ

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU se žádostí o udělení patentu

/P01/

v.1.0

Vyplní úřad:

Potvrzení o přijetí vydáno dne:

- 2 -07- 2008

Číslo jednací:

PV 2008-415

02.07.2008 09:04:22

Úřad průmyslového vlastnictví

- 2 -07- 2008

Antonína Čermáka 2a
160 68 Praha 6

OSOBNĚ

1. DRUH PŘIHLÁŠKY
Příhláška NÁRODNÍ (vyplňte N), nebo ZAHRANIČNÍ (vyplňte Z) (1300) NVyberte druh Nová přihláška vynálezu
2. NÁZEV VYNÁLEZU
(5400)
3. ZÁSTUPCE PŘIHLAŠOVATELE

Firma	(7401)	<input type="text"/>
Příjmení	(7402)	<input type="text"/>
Jméno	(7403)	<input type="text"/>
Titul před jm.	(7404)	<input type="text"/>
Titul za jm.	(7415)	<input type="text"/>
Ulice	(7405)	<input type="text"/>
Č.p.	(7406)	<input type="text"/>
Město	(7407)	<input type="text"/>
PSČ	(7408)	<input type="text"/>
Země	(7409)	Česká republika
Telefon*	(7412)	<input type="text"/>
Fax*	(7413)	<input type="text"/>
E-mail*	(7414)	<input type="text"/>

V případě prezidiální plné moci uveďte číslo přidělené Úřadem (7418) Číslo jednací zástupce (7419)

Pozn.: *) Nepovinné údaje sloužící ÚPV pro případné vyjasnění údajů uvedených v přihlášce a pro další řízení o přihlášce.

4. POČET PŘIHLAŠOVATELŮ
Příloha 1: Úvodní strana přihlášky patentu.

13 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. Zimcik, P.; Miletin, M.; Kostka, M.; Schwarz, J.; Musil, Z.; Kopecky, K.: Synthesis and comparison of photodynamic activity of alkylheteroatom substituted azaphthalocyanines. *J. Photochem. Photobiol. A, Chem.* **2004**, 163, (1-2), 21-28.
2. Arbeloa, I. L.: Dimeric and Trimeric States of the Fluorescein Dianion .1. Molecular-Structures. *J. Chem. Soc. Faraday Trans. II* **1981**, 77, 1725-1733.
3. Khairutdinov, R. F.; Serpone, N.: Photophysics of cyanine dyes: Subnanosecond relaxation dynamics in monomers, dimers, and H- and J-aggregates in solution. *J. Phys. Chem. B* **1997**, 101, (14), 2602-2610.
4. West, W.; Pearce, S.: Dimeric State of Cyanine Dyes. *J. Phys. Chem.* **1965**, 69, (6), 1894-1903.
5. Wang, M. M.; Silva, G. L.; Armitage, B. A.: DNA-templated formation of a helical cyanine dye J-aggregate. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, (41), 9977-9986.
6. Fidler, H.; Knoester, J.; Wiersma, D. A.: Optical-Properties of Disordered Molecular Aggregates - a Numerical Study. *J. Chem. Phys.* **1991**, 95, (11), 7880-7890.
7. Fidler, H.; Terpstra, J.; Wiersma, D. A.: Dynamics of Frenkel Excitons in Disordered Molecular Aggregates. *J. Chem. Phys.* **1991**, 94, (10), 6895-6907.
8. Johansson, M. K.; Fidler, H.; Dick, D.; Cook, R. M.: Intramolecular dimers: A new strategy to fluorescence quenching in dual-labeled oligonucleotide probes. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, (24), 6950-6956.
9. Förster, T.: Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. *Ann. Phys.* **1948**, 437, (1-2), 55-75.
10. Massey, M.; Algar, W. R.; Krull, U. J.: Fluorescence resonance energy transfer (FRET) for DNA biosensors: FRET pairs and Forster distances for various dye-DNA conjugates. *Anal. Chim. Acta* **2006**, 568, (1-2), 181-189.
11. Stryer, L.: Fluorescence Energy-Transfer as a Spectroscopic Ruler. *Ann. Rev. Biochem.* **1978**, 47, 819-846.
12. Dexter, D. L.: A Theory of Sensitized Luminescence in Solids. *J. Chem. Phys.* **1953**, 21, (5), 836-850.
13. Johansson, M. K., Cook, Ronald M.: Intramolecular Dimers: A New Design Strategy for Fluorescence-Quenched Probes. *Chem. Eur. J.* **2003**, 9, (15), 3466-3471.
14. Hudgins, R. R.; Huang, F.; Gramlich, G.; Nau, W. M.: A fluorescence-based method for direct measurement of submicrosecond intramolecular contact formation in biopolymers: An exploratory study with polypeptides. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, (4), 556-564.
15. Sei-ida, Y.; Koshimoto, H.; Kondo, S.; Tsuji, A.: Real-time monitoring of in vitro transcriptional RNA synthesis using fluorescence resonance energy transfer. *Nucleic acids res.* **2000**, 28, (12).
16. Holland, P. M.; Abramson, R. D.; Watson, R.; Gelfand, D. H.: Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5' → 3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **1991**, 88, (16), 7276-7280.
17. Livak, K. J.; Flood, S. J. A.; Marmaro, J.; Giusti, W.; Deetz, K.: Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe

system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR Methods Appl.* **1995**, 4, (6), 357-362.

18. Tyagi, S.; Bratu, D. P.; Kramer, F. R.: Multicolor molecular beacons for allele discrimination. *Nat. Biotechnol.* **1998**, 16, (1), 49-53.

19. Cardullo, R. A.; Agrawal, S.; Flores, C.; Zamecnik, P. C.; Wolf, D. E.: Detection of Nucleic Acid Hybridization by Nonradiative Fluorescence Resonance Energy Transfer. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **1988**, 85, (23), 8790-8794.

20. Didenko, V. V.; Boudreaux, D. J.; Baskin, D. S.: Substantial background reduction in ligase-based apoptosis detection using newly designed hairpin oligonucleotide probes. *BioTechniques* **1999**, 27, (6), 1130-1132.

21. Didenko, V. V.; Hornsby, P. J.: Presence of double-strand breaks with single-base 3' overhangs in cells undergoing apoptosis but not necrosis. *J. Cell Biol.* **1996**, 135, (5), 1369-1376.

22. Didenko, V. V.; Tunstead, J. R.; Hornsby, P. J.: Biotin-labeled hairpin oligonucleotides: Probes to detect double-strand breaks in DNA in apoptotic cells. *Am. J. Pathol.* **1998**, 152, (4), 897-902.

23. Ghosh, S. S.; Eis, P. S.; Blumeyer, K.; Fearon, K.; Millar, D. P.: Real time kinetics of restriction endonuclease cleavage monitored by fluorescence resonance energy transfer. *Nucleic Acids Res.* **1994**, 22, (15), 3155-3159.

24. Li, J. J.; Geyer, R.; Tan, W.: Using molecular beacons as a sensitive fluorescence assay for enzymatic cleavage of single-stranded DNA. *Nucleic acids res.* **2000**, 28, (11).

25. Uchiyama, H.; Hirano, K. I.; Kashiwasake-Jibu, M.; Taira, K.: Detection of Undegraded Oligonucleotides in Vivo by Fluorescence Resonance Energy Transfer. *J. Biol. Chem.* **1996**, 271, (1), 380-384.

26. Bazemore, L. R.; Takahashi, M.; Radding, C. M.: Kinetic Analysis of Pairing and Strand Exchange Catalyzed by RecA. Detection by fluorescence energy transfer. *J. Biol. Chem.* **1997**, 272, (23), 14672-14682.

27. Gupta, R. C.; Golub, E. I.; Wold, M. S.; Radding, C. M.: Polarity of DNA strand exchange promoted by recombination proteins of the RecA family. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **1998**, 95, (17), 9843-9848.

28. Lyamichev, V.; Mast, A. L.; Hall, J. G.; Prudent, J. R.; Kaiser, M. W.; Takova, T.; Kwiatkowski, R. W.; Sander, T. J.; De Arruda, M.; Arco, D. A.; Neri, B. P.; Brow, M. A. D.: Polymorphism identification and quantitative detection of genomic DNA by invasive cleavage of oligonucleotide probes. *Nat. Biotechnol.* **1999**, 17, (3), 292-296.

29. Hall, J. G.; Eis, P. S.; Law, S. M.; Reynaldo, L. P.; Prudent, J. R.; Marshall, D. J.; Allawi, H. T.; Mast, A. L.; Dahlberg, J. E.; Kwiatkowski, R. W.; De Arruda, M.; Neri, B. P.; Lyamichev, V. I.: Sensitive detection of DNA polymorphisms by the serial invasive signal amplification reaction. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **2000**, 97, (15), 8272-8277.

30. Hessner, M. J.; Budish, M. A.; Friedman, K. D.: Genotyping of Factor V G1691A (Leiden) without the Use of PCR by Invasive Cleavage of Oligonucleotide Probes. *Clin. Chem.* **2000**, 46, (8), 1051-1056.

31. Li, J.; Lu, Y.: A highly sensitive and selective catalytic DNA biosensor for lead ions. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, (42), 10466-10467.

32. Liu, X.; Farmerie, W.; Schuster, S.; Tan, W.: Molecular beacons for DNA biosensors with micrometer to submicrometer dimensions. *Anal. Biochem.* **2000**, 283, (1), 56-63.

33. Stojanovic, M. N.; de Prada, P.; Landry, D. W.: Homogeneous assays based on deoxyribozyme catalysis. *Nucleic Acids Res.* **2000**, 28, (15), 2915-2918.
34. Gundry, C. N.; Bernard, P. S.; Herrmann, M. G.; Reed, G. H.; Wittwer, C. T.: Rapid F508del and F508C assay using fluorescent hybridization probes. *Genet. Test.* **1999**, 3, (4), 365-370.
35. Sixou, S.; Szoka Jr, F. C.; Green, G. A.; Giusti, B.; Zon, G.; Chin, D. J.: Intracellular oligonucleotide hybridization detected by fluorescence resonance energy transfer (FRET). *Nucleic Acids Res.* **1994**, 22, (4), 662-668.
36. Lee, L. G.; Connell, C. R.; Bloch, W.: Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes. *Nucleic Acids Res.* **1993**, 21, (16), 3761-3766.
37. Tyagi, S.; Kramer, F. R.: Molecular beacons: Probes that fluoresce upon hybridization. *Nat. Biotechnol.* **1996**, 14, (3), 303-308.
38. Fang, X.; Liu, X.; Schuster, S.; Tan, W.: Designing a novel molecular beacon for surface-immobilized DNA hybridization studies. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, (12), 2921-2922.
39. Nazarenko, I. A.; Bhatnagar, S. K.; Hohman, R. J.: A closed tube format for amplification and detection of DNA based on energy transfer. *Nucleic Acids Res.* **1997**, 25, (12), 2516-2521.
40. Whitcombe, D.; Theaker, J.; Guy, S. P.; Brown, T.; Little, S.: Detection of PCR products using self-probing amplicons and fluorescence. *Nat. Biotechnol.* **1999**, 17, (8), 804-807.
41. Thelwell, N.; Millington, S.; Solinas, A.; Booth, J.; Brown, T.: Mode of action and application of Scorpion primers to mutation detection. *Nucleic Acids Res.* **2000**, 28, (19), 3752-3761.
42. Neoh, S. H.; Brisco, M. J.; Firgaira, F. A.; Trainor, K. J.; Turner, D. R.; Morley, A. A.: Rapid detection of the factor V Leiden (1691G>A) and haemochromatosis (845G>A) mutation by fluorescence resonance energy transfer (FRET) and real time PCR. *J. Clin. Pathol.* **1999**, 52, (10), 766-769.
43. Murakami, A.; Suminami, Y.; Sakaguchi, Y.; Nawata, S.; Numa, F.; Kishi, F.; Kato, H.: Specific detection and quantitation of SCC antigen 1 and SCC antigen 2 mRNAs by fluorescence-based asymmetric semi-nested reverse transcription PCR. *Tumor Biol.* **2000**, 21, (4), 224-234.
44. Chen, X.; Kwok, P. Y.: Homogeneous genotyping assays for single nucleotide polymorphisms with fluorescence resonance energy transfer detection. *Genet. Anal. - Biomol. Eng.* **1999**, 14, (5-6), 157-163.
45. Chen, X.; Livak, K. J.; Kwok, P. Y.: A homogeneous, ligase-mediated DNA diagnostic test. *Genome Res.* **1998**, 8, (5), 549-556.
46. Loeffler, J.; Hagemeyer, L.; Hebart, H.; Henke, N.; Schumacher, U.; Einsele, H.: Rapid detection of point mutations by fluorescence resonance energy transfer and probe melting curves in *Candida* species. *Clin. Chem.* **2000**, 46, (5), 631-635.
47. Nauck, M.; März, W.; Wieland, H.: Evaluation of the Roche Diagnostics LightCycler-factor V Leiden mutation detection kit and the LightCycler-prothrombin mutation detection kit. *Clin. Biochem.* **2000**, 33, (3), 213-216.
48. Nauck, M.; Wieland, H.; März, W.: Evaluation of the Roche Diagnostics LightCycler-apo B 3500 mutation detection kit. *Clin. Chem. Lab. Med.* **2000**, 38, (7), 667-671.
49. Egholm, M.; Buchardt, O.; Christensen, L.; Behrens, C.; Freier, S. M.; Driver, D. A.; Berg, R. H.; Kim, S. K.; Norden, B.; Nielsen, P. E.: PNA hybridizes to

complementary oligonucleotides obeying the Watson-Crick hydrogen-bonding rules. *Nature* **1993**, 365, (6446), 566-568.

50. Mackay, I. M.; Arden, K. E.; Nitsche, A.: Real-time PCR in virology. *Nucleic Acids Res.* **2002**, 30, (6), 1292-1305.

51. Karlsson, H. J.; Bergqvist, M. H.; Lincoln, P.; Westman, G.: Syntheses and DNA-binding studies of a series of unsymmetrical cyanine dyes: structural influence on the degree of minor groove binding to natural DNA. *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, 12, (9), 2369-2384.

52. Karlsson, H. J.; Eriksson, M.; Perzon, E.; Akerman, B.; Lincoln, P.; Westman, G.: Groove-binding unsymmetrical cyanine dyes for staining of DNA: syntheses and characterization of the DNA-binding. *Nucleic Acids Res.* **2003**, 31, (21), 6227-6234.

53. Svanvik, N.; Nygren, J.; Westman, G.; Kubista, M.: Free-Probe Fluorescence of Light-up Probes. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, (5), 803-809.

54. Svanvik, N.; Ståhlberg, A.; Sehlstedt, U.; Sjöback, R.; Kubista, M.: Detection of PCR products in real time using light-up probes. *Anal. Biochem.* **2000**, 287, (1), 179-182.

55. Mengoli, C.; Cusinato, R.; Biasolo, M. A.; Cesaro, S.; Parolin, C.; Palu, G.: Assessment of CMV load in solid organ transplant recipients by pp65 antigenemia and real-time quantitative DNA PCR assay: Correlation with pp67 RNA detection. *J. Med. Virol.* **2004**, 74, (1), 78-84.

56. Kalpoe, J. S.; Schippers, E. F.; Eling, Y.; Sijpkens, Y. W.; De Fijter, J. W.; Kroes, A. C. M.: Similar reduction of cytomegalovirus DNA load by oral valganciclovir and intravenous ganciclovir on pre-emptive therapy after renal and renal-pancreas transplantation. *Antiv. Ther.* **2005**, 10, (1), 119-123.

57. Tanaka-Kitajima, N.; Sugaya, N.; Futatani, T.; Kanegane, H.; Suzuki, C.; Oshiro, M.; Hayakawa, M.; Futamura, M.; Morishima, T.; Kimura, H.: Ganciclovir therapy for congenital cytomegalovirus infection in six infants. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **2005**, 24, (9), 782-785.

58. Akerstrom, S.; Mousavi-Jazi, M.; Klingstrom, J.; Leijon, M.; Lundkvist, A.; Mirazimi, A.: Nitric Oxide Inhibits the Replication Cycle of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus. *J. Virol.* **2005**, 79, (3), 1966-1969.

59. Rota, P. A.; Oberste, M. S.; Monroe, S. S.; Nix, W. A.; Campagnoli, R.; Icenogle, J. P.; Penaranda, S.; Bankamp, B.; Maher, K.; Chen, M. H.; Tong, S.; Tamin, A.; Lowe, L.; Frace, M.; DeRisi, J. L.; Chen, Q.; Wang, D.; Erdman, D. D.; Peret, T. C. T.; Burns, C.; Ksiazek, T. G.; Rollin, P. E.; Sanchez, A.; Liffick, S.; Holloway, B.; Limor, J.; McCaustland, K.; Olsen-Rasmussen, M.; Fouchier, R.; Günther, S.; Osterhaus, A. D. H. E.; Drosten, C.; Pallansch, M. A.; Anderson, L. J.; Bellini, W. J.: Characterization of a novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *Science* **2003**, 300, (5624), 1394-1399.

60. Drosten, C.; Günther, S.; Preiser, W.; Van der Werf, S.; Brodt, H. R.; Becker, S.; Rabenau, H.; Panning, M.; Kolesnikova, L.; Fouchier, R. A. M.; Berger, A.; Burguiere, A. M.; Cinatl, J.; Eickmann, M.; Escriou, N.; Grywna, K.; Kramme, S.; Manuguerra, J. C.; Müller, S.; Rickerts, V.; Stürmer, M.; Vieth, S.; Klenk, H. D.; Osterhaus, A. D. M. E.; Schmitz, H.; Doerr, H. W.: Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome. *N. Engl. J. Med.* **2003**, 348, (20), 1967-1976.

61. Emery, S. L.; Erdman, D. D.; Bowen, M. D.; Newton, B. R.; Winchell, J. M.; Meyer, R. F.; Tong, S.; Cook, B. T.; Holloway, B. P.; McCaustland, K. A.; Rota, P. A.; Bankamp, B.; Lowe, L. E.; Ksiazek, T. G.; Bellini, W. J.; Anderson, L. J.: Real-Time

Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction Assay for SARS-associated Coronavirus. *Emerging Infect. Dis.* **2004**, 10, (2), 311-316.

62. Stahlberg, A.; Aman, P.; Ridell, B.; Mostad, P.; Kubista, M.: Quantitative Real-Time PCR Method for Detection of B-Lymphocyte Monoclonality by Comparison of {kappa} and {lambda} Immunoglobulin Light Chain Expression. *Clin. Chem.* **2003**, 49, (1), 51-59.

63. Ståhlberg, A.; Zoric, N.; Aman, P.; Kubista, M.: Quantitative real-time PCR for cancer detection: the lymphoma case. *Expert Rev. Mol. Diagn.* **2005**, 5, (2), 221-230.

64. Solinas, A.; Brown, L. J.; McKeen, C.; Mellor, J. M.; Nicol, J.; Thelwell, N.; Brown, T.: Duplex Scorpion primers in SNP analysis and FRET applications. *Nucleic Acids Res.* **2001**, 29, (20), e96.

65. BioSearch Technologies. <https://www.biosearchtech.com>, staženo 15. září 2008.

66. French, D. J.; Archard, C. L.; Brown, T.; McDowell, D. G.: HyBeacon™ probes: a new tool for DNA sequence detection and allele discrimination. *Mol. Cell. Probes* **2001**, 15, (6), 363-374.

67. Li, Q.; Luan, G.; Guo, Q.; Liang, J.: A new class of homogeneous nucleic acid probes based on specific displacement hybridization. *Nucleic acids res.* **2002**, 30, (2), e5.

68. Kandimalla, E. R.; Agrawal, S.: 'Cyclicons' as hybridization-based fluorescent primer-probes: synthesis, properties and application in real-time PCR. *Bioorg. Med. Chem.* **2000**, 8, (8), 1911-1916.

69. Stevens, J. K. E.; Mills, L. R.; Trogadis, J. E. (Eds): *Three-Dimensional Confocal Microscopy: Volume Investigation of Biological Specimens: Volume Investigation of Biological Specimens (Cell Biology)*. Academic Press Inc, Burlington, MA, USA 1994.

70. Song, L.; Hennink, E. J.; Young, I. T.; Tanke, H. J.: Photobleaching kinetics of fluorescein in quantitative fluorescence microscopy. *Biophys. J.* **1995**, 68, (6), 2588-2600.

71. Wachsmuth, M.; Weidemann, T.; Muller, G.; Hoffmann-Rohrer, U. W.; Knoch, T. A.; Waldeck, W.; Langowski, J.: Analyzing Intracellular Binding and Diffusion with Continuous Fluorescence Photobleaching. *Biophys. J.* **2003**, 84, (5), 3353-3363.

72. Der-Balian, G. P.; Kameda, N.; Rowley, G. L.: Fluorescein labeling of Fab' while preserving single thiol. *Anal. Biochem.* **1988**, 173, (1), 59-63.

73. Panchuk-Voloshina, N.; Haugland, R. P.; Bishop-Stewart, J.; Bhalgat, M. K.; Millard, P. J.; Mao, F.; Leung, W. Y.; Haugland, R. P.: Alexa dyes, a series of new fluorescent dyes that yield exceptionally bright, photostable conjugates. *J. Histochem. Cytochem.* **1999**, 47, (9), 1179-1188.

74. Kumar, R. K.; Chapple, C. C.; Hunter, N.: Improved Double Immunofluorescence for Confocal Laser Scanning Microscopy. *J. Histochem. Cytochem.* **1999**, 47, (9), 1213-1218.

75. Kathy Triantafilou, M. T. N. F.: Lipopolysaccharide (LPS) labeled with Alexa 488 hydrazide as a novel probe for LPS binding studies. *Cytometry* **2000**, 41, (4), 316-320.

76. Turner, L.; Ryu, W. S.; Berg, H. C.: Real-Time Imaging of Fluorescent Flagellar Filaments. *J. Bacteriol.* **2000**, 182, (10), 2793-2801.

77. Gee, K. R.; Poot, M.; Klaubert, D. H.; Sun, W.-C.; Haugland, R. P.; Mao, F.: Molecular Probes, Inc. (Eugene, OR, USA): Fluorinated xanthene derivatives US patent 6,162,931 (C07C 245/00).

78. Ermst, L. A.; Gupta, R. K.; Mujumdar, S. R.; Lewis, C. J. Waggoner, A. S.: Cyanine dye labeling reagents for sulfhydryl groups. *Cytometry* **1989**, 10, (1), 3-10.
79. Mujumdar, R. B.; Ernst, L. A.; Mujumdar, S. R.; Lewis, C. J.; Waggoner, A. S.: Cyanine dye labeling reagents: Sulfoindocyanine succinimidyl esters. *Bioconjugate Chem.* **1993**, 4, (2), 105-111.
80. Brush, C. K.; Anderson, E. D.: Pharmacia P-L Biochemicals Inc. (Milwaukee, WI, USA): Indocarbocyanine-linked phosphoramidites, US patent 5,556,959 (C07H 21/00).
81. Brush, C. K.; Anderson, E. D.: Pharmacia Biotech Inc. (Milwaukee, WI, USA): Indocarbocyanine and benzindocarbocyanine phosphoramidites, US patent 5,808,044 (C07H 21/00).
82. Berlier, J. E.; Rothe, A.; Buller, G.; Bradford, J.; Gray, D. R.; Filanoski, B. J.; Telford, W. G.; Yue, S.; Liu, J.; Cheung, C.-Y.; Chang, W.; Hirsch, J. D.; Beechem, J. M.; Haugland, R. P.; Haugland, R. P.: Quantitative Comparison of Long-wavelength Alexa Fluor Dyes to Cy Dyes: Fluorescence of the Dyes and Their Bioconjugates. *J. Histochem. Cytochem.* **2003**, 51, (12), 1699-1712.
83. Touthkine, A.; Nalbant, P.; Hahn, K. M.: Facile Synthesis of Thiol-Reactive Cy3 and Cy5 Derivatives with Enhanced Water Solubility. *Bioconjugate Chem.* **2002**, 13, (3), 387-391.
84. Flanagan, J. H.; Khan, S. H.; Menchen, S.; Soper, S. A.; Hammer, R. P.: Functionalized Tricarbocyanine Dyes as Near-Infrared Fluorescent Probes for Biomolecules. *Bioconjugate Chem.* **1997**, 8, (5), 751-756.
85. Roederer, M.; Kantor, A. B.; Parks, D. R.; Herzenberg, L. A.: Cy7PE and Cy7APC: Bright new probes for immunofluorescence. *Cytometry* **1996**, 24, (3), 191-197.
86. Brismar, H.; Trepte, O.; Ulfhake, B.: Spectra and fluorescence lifetimes of lissamine rhodamine, tetramethylrhodamine isothiocyanate, texas red, and cyanine 3.18 fluorophores: influences of some environmental factors recorded with a confocal laser scanning microscope. *J. Histochem. Cytochem.* **1995**, 43, (7), 699-707.
87. Mujumdar, S. R.; Mujumdar, R. B.; Grant, C. M.; Waggoner, A. S.: Cyanine-Labeling Reagents: Sulfoindocyanine Succinimidyl Esters. *Bioconjugate Chem.* **1996**, 7, (3), 356-362.
88. Svanvik, N.; Westman, G.; Wang, D.; Kubista, M.: Light-Up Probes: Thiazole Orange-Conjugated Peptide Nucleic Acid for Detection of Target Nucleic Acid in Homogeneous Solution. *Anal. Biochem.* **2000**, 281, (1), 26-35.
89. Treibs, A., Kreuzer, F.-H.: Difluorboryl-Komplexe von Di- und Tripyrrylmethenen. *Liebigs Ann. Chem.* **1968**, 718, (1), 208-223.
90. Karolin, J.; Johansson, L. B. A.; Strandberg, L.; Ny, T.: Fluorescence and absorption spectroscopic properties of dipyrrometheneboron difluoride (BODIPY) derivatives in liquids, lipid membranes, and proteins. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, (17), 7801-7806.
91. Kambara, H.; Nagai, K.; Kawamoto, K.: Photodestruction of fluorophores and optimum conditions for trace DNA detection by automated DNA sequencer. *Electrophoresis* **1992**, 13, (1), 542-546.
92. Lee, L. G.; Connell, C. R.; Woo, S. L.; Cheng, R. D.; McArdle, B. F.; Fuller, C. W.; Halloran, N. D.; Wilson, R. K.: DNA sequencing with dye-labeled terminators and T7 DNA polymerase: Effect of dyes and dNTPs on incorporation of dye-terminators and probability analysis of termination fragments. *Nucleic Acids Res.* **1992**, 20, (10), 2471-2483.

93. Yeum, K.-J.; Russell, R. M.; Krinsky, N. I.; Aldini, G.: Biomarkers of antioxidant capacity in the hydrophilic and lipophilic compartments of human plasma. *Arch. Biochem. Biophys.* **2004**, 430, (1), 97-103.
94. Pagano, R. E.; Watanabe, R.; Wheatley, C.; Chen, C.-S.: Use of N-[5-(5,7-dimethyl boron dipyrromethene difluoride-sphingomyelin to study membrane traffic along the endocytic pathway. *Chem. Phys. Lipids* **1999**, 102, (1-2), 55-63.
95. Timperman, A. T.; Khatib, K.; Sweedler, J. V.: Wavelength-Resolved Fluorescence Detection in Capillary Electrophoresis. *Anal. Chem.* **1995**, 67, (1), 139-144.
96. Chehab, F. F.; Kan, Y. W.: Detection of Specific DNA Sequences by Fluorescence Amplification: A Color Complementation Assay. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **1989**, 86, (23), 9178-9182.
97. Oefner, P. J.; Huber, C. G.; Umlauf, F.; Berti, G. N.; Stimpfl, E.; Bonn, G. K.: High-Resolution Liquid Chromatography of Fluorescent Dye-Labeled Nucleic Acids. *Anal. Biochem.* **1994**, 223, (1), 39-46.
98. Ravdin, P.; Axelrod, D.: Fluorescent tetramethyl rhodamine derivatives of [α]-bungarotoxin: Preparation, separation, and characterization. *Anal. Biochem.* **1977**, 80, (2), 585-592.
99. Buntel, C. J.: Molecular Probes, Inc. (Eugene, OR, USA): Fluorescence-quenching chemicals for use in scientific research. Trade mark Serial Number 76061161.
100. Gregory, J. (ed.): *Handbook of Fluorescent Probes and Research Products*. 9th ed.; Molecular Probec, Inc.: Eugene, OR, USA 2002.
101. Reed, M. W.; Lukhtanov, E. A.; Gall, A. A.; Dempcy, R. O.: Epoch Pharmaceuticals, Inc. (Redmond, WA, USA): Fluorescent quenching detection reagents and methods. US patent 6,727,356 C07C 245/00.
102. Cook, R. M.; Lyttle, M.; Dick, D.: Biosearch Technologies, Inc. (Novato, CA, USA): Dark quenchers for donor-acceptor energy transfer. US patent 7,019,129 (C07H 19/04).
103. Schaumann, E. (ed.): *Methods of Organic Chemistry (Houbel-Weyl)*. 4th ed.; Georg Thieme Verlag: Stuttgart, 1998; Vol. E 9d.
104. Hanack, M.; Osio-Barcina, J.; Witke, E.; Pohmer, J.: Easy Procedures for the Synthesis of Soluble [2,3,9,10,16,17,23,24-Octakis(Pentyloxy) Phthalocyaninato]Ruthenium(II) and (Phthalocyaninato)Ruthenium(II). *Synthesis* **1992**, (1-2), 211-214.
105. Grunewald, H.; Homborg, H.: Preparation and Spectroscopical Characterization of Nitridophthalocyaninatomanganese(V). *Z. Naturforsch. B.* **1990**, 45, (4), 483-489.
106. Ford, W. T.; Sumner, L. L.; Zhu, W. M.; Chang, Y. H.; Um, P. J.; Choi, K. H.; Heiney, P. A.; Maliszewskyj, N. C.: Liquid-Crystalline Octa-(2-Ethylhexyloxy) Platinum and Lead Phthalocyanines. *New J. Chem.* **1994**, 18, (4), 495-505.
107. Wohrle, D.; Eskes, M.; Shigehara, K.; Yamada, A.: A Simple Synthesis of 4,5-Disubstituted 1,2-Dicyanobenzenes and 2,3,9,10,16,17,23,24-Octasubstituted Phthalocyanines. *Synthesis*. **1993**, (2), 194-196.
108. Gurek, A. G.; Bekaroglu, O.: Octakis(Alkylthio)-Substituted Phthalocyanines and Their Interactions with Silver(I) and Palladium(II) Ions. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **1994**, (9), 1419-1423.
109. Mikhalen, S.A.; Lukyanet, E. A.: Phthalocyanines and Related Compounds .1. Synthesis and Properties of Tetraphenylphthalocyanines. *J. Gen. Chem. USSR* **1969**, 39, (9), 2081-2086.

110. Mikhalen, S. A.; Korobkov, E. V.; Lukyanet, E. A.: Phthalocyanines and Related Compounds. 4. Polychlorophthalocyanines. *J. Gen. Chem. USSR* **1970**, 40, (2), 367.
111. Derkacheva, V. M.; Lukyanets, E. A.: Phthalocyanines and Related-Compounds. 18. Phenoxythio-Substituted and Phenylthio-Substituted Phthalocyanines. *Zh. Obshch. Khim.* **1980**, 50, (10), 2313-2318.
112. Metz, J.; Schneider, O.; Hanack, M.: Synthesis and Properties of Substituted (Phthalocyaninato)Iron and (Phthalocyaninato)Cobalt Compounds and Their Pyridine Adducts. *Inorg. Chem.* **1984**, 23, (8), 1065-1071.
113. Negrimovskii, V. M.; Derkacheva, V. M.; Kaliya, O. L.; Lukyanets, E. A.: Phthalocyanines and Related-Compounds. 32. Synthesis and Certain Properties of Tetraniro-Substituted and Octaniro-Substituted Phthalocyanines. *Zh. Obshch. Khim.* **1991**, 61, (2), 460-470.
114. Kempa, A.; Dobrowolski, J.: Palladium Phthalocyanine and Its Polymorphic Forms. *Can. J. Chem.* **1988**, 66, (10), 2553-2555.
115. Yao, J. C.; Yonehara, H.; Pac, C. J.: A Convenient Synthetic Method for Pure Oxo(Phthalocyaninato)Titanium(IV) and Application to Other Metal Phthalocyanines. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1995**, 68, (3), 1001-1005.
116. Beck, A.; Mangold, K. M.; Hanack, M.: Soluble (Tetraethylphthalocyaninato)Iron(II) and (Tetraethylphthalocyaninato)Cobalt(II) Compounds. *Chem. Ber.* **1991**, 124, (10), 2315-2321.
117. Beck, A.; Hanack, M.: Synthesis of Tetravinylphthalocyanine. *Chem. Ber. Recl.* **1993**, 126, (6), 1493-1494.
118. Nyokong, T.: Cyclic Voltammetry and Spectroelectrochemistry of Rhodium Phthalocyanines. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **1994**, (9), 1359-1365.
119. Hanack, M.; Gul, A.; Subramanian, L. R.: Synthesis and Semiconducting Properties of Bridged (Phthalocyaninato)Osmium Compounds with Bidentate N-Donor Ligands. *Inorg. Chem.* **1992**, 31, (8), 1542-1544.
120. Soloveva, L. I.; Mikhalenko, S. A.; Chernykh, E. V.; Lukyanets, E. A.: Phthalocyanines and Related-Compounds. 20. Alkylamides of Isomeric Phthalocyaninetetrasulfonic Acid and Octasulfonic Acids. *Zh. Obshch. Khim.* **1982**, 52, (1), 90-101.
121. Duro, J. A.; Delatorre, G.; Torres, T.: Synthesis and Different Aggregation Properties in Solution of Alkyl-Amide and Dialkyl Amide Surrounded Phthalocyanines. *Tetrahedron Lett.* **1995**, 36, (44), 8079-8082.
122. Duro, J. A.; Torres, T.: Synthesis and Aggregation Properties in Solution of a New Octasubstituted Copper Phthalocyanine - [-2,3,9,10,16,17,23,24-Octakis [(Diocetylaminocarbonyl)Methoxy]Phthalocyaninato-]Copper(II). *Chem. Ber. Recl.* **1993**, 126, (1), 269-271.
123. Galpern, M. G.; Kudrevich, S. V.; Novozhilova, I. G.: Synthesis and Spectral Properties of Soluble Phthalocyanine and Naphthalocyanine Azaanalogues. *Chem. Heterocycl. Compd.* **1993**, (1), 58-63.
124. Freyer, W.: Metallo-Tetrabenzog[G]Quinoxalino-2,3-Porphyrazines. *J. Prakt. Chem.* **1994**, 336, (8), 693-694.
125. Ohta, K.; Watanabe, T.; Hasebe, H.; Morizumi, Y.; Fujimoto, T.; Yamamoto, I.; Lelievre, D.; Simon, J.: Discotic Liquid-Crystals of Transition-Metal Complexes-9 - Synthesis and Properties of Discotic Liquid-Crystals of Tetrapyrazinoporphyrazine Derivatives. *Mol. Cryst. Liq. Cryst.* **1991**, 196, 13-26.

126. Faust, R.; Weber, C.: Three-step synthesis and absorption and emission properties of peripherally peralkynylated tetrapyrrozinoporphyrazines. *J. Org. Chem.* **1999**, 64, (7), 2571-2573.
127. Leznoff, C. C.; Svirskaya, P. I.; Khouw, B.; Cerny, R. L.; Seymour, P.; Lever, A. B. P.: Syntheses of Monometallated and Unsymmetrically Substituted Binuclear Phthalocyanines and a Pentanuclear Phthalocyanine by Solution and Polymer Support Methods. *J. Org. Chem.* **1991**, 56, (1), 82-90.
128. Sasa, N.; Okada, K.; Nakamura, K.; Okada, S.: Synthesis, structural and conformational analysis and chemical properties of phthalocyaninatometal complexes. *J. Mol. Struct.* **1998**, 446, (3), 163-178.
129. Hofman, J. W.; van Zeeland, F.; Turker, S.; Talsma, H.; Lambrechts, S. A. G.; Sakharov, D. V.; Hennink, W. E.; van Nostrum, C. F.: Peripheral and axial substitution of phthalocyanines with solketal groups: Synthesis and in vitro evaluation for photodynamic therapy. *J. Med. Chem.* **2007**, 50, (7), 1485-1494.
130. Leznoff, C. C.; McArthur, C. R.; Qin, Y. N.: Phthalocyanine-Modified Silica-Gels and Their Application in the Purification of Unsymmetrical Phthalocyanines. *Can. J. Chem.* **1993**, 71, (9), 1319-1326.
131. Dirk, C. W.; Inabe, T.; Schoch, K. F.; Marks, T. J.: Cofacial Assembly of Partially Oxidized Metallomacrocycles as an Approach to Controlling Lattice Architecture in Low-Dimensional Molecular-Solids - Chemical and Architectural Properties of the Face-to-Face Polymers [M(Phthalocyaninato)O]N, Where M = Si, Ge, and Sn. *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, 105, (6), 1539-1550.
132. Lo, P. C.; Wang, S. Q.; Zeug, A.; Meyer, M.; Roder, B.; Ng, D. K. P.: Preparation and photophysical properties of halogenated silicon(IV) phthalocyanines substituted axially with poly(ethylene glycol) chains. *Tetrahedron Lett.* **2003**, 44, (9), 1967-1970.
133. Barker, C. A.; Findlay, K. S.; Bettington, S.; Batsanov, A. S.; Perepichka, I. F.; Bryce, M. R.; Beeby, A.: Synthesis of new axially-disubstituted silicon-phthalocyanine derivatives: optical and structural characterisation. *Tetrahedron* **2006**, 62, (40), 9433-9439.
134. Joyner, R. D.; Kenney, M. E.: Phthalocyaninosilicon Compounds. *Inorg. Chem.* **1962**, 1, (2), 236-238.
135. Ford, W. E.; Rodgers, M. A. J.; Schechtman, L. A.; Sounik, J. R.; Rihter, B. D.; Kenney, M. E.: Synthesis and Photochemical Properties of Aluminum, Gallium, Silicon, and Tin Naphthalocyanines. *Inorg. Chem.* **1992**, 31, (16), 3371-3377.
136. Sievertsen, S.; Homborg, H.: Preparation and Spectroscopical Properties of Nitridophthalocyaninorhenium(V). *Z. Anorg. Allg. Chem.* **1994**, 620, (8), 1439-1442.
137. Ziener, U.; Durr, K.; Hanack, M.: Synthesis and Characterization of the First Soluble Phthalocyaninorhenium Complexes. *Synth. Met.* **1995**, 71, (1-3), 2285-2286.
138. Kobayashi, N.; Kondo, R.; Nakajima, S.; Osa, T.: New route to unsymmetrical phthalocyanine analogs by the use of structurally distorted subphthalocyanines. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, 112, (26), 9640-9641.
139. Kovshev, E. I.; Lukyanet, E. A.: Phthalocyanines and Related Compounds. 11. Substituted 2, 2,3-Naphthalocyanines. *Zh. Obshch. Khim.* **1972**, 42, (7), 1593.
140. Freyer, W.; Minh, L. Q.: Influence of Lewis-Acids on the Absorption Behavior of Substituted Metallotetraazaporphins. *J. Prakt. Chem.* **1987**, 329, (2), 365-373.
141. Linstead, R. P.; Weiss, F. T.: Phthalocyanines and Related Compounds. 21. The Oxidation of Phthalocyanine, Tetrabenzporphin, and Allied Substances. *J. Chem. Soc.* **1950**, (NOV), 2981-2987.

142. Monahan, A. R.; Brado, J. A.; Deluca, A. F.: Association of Copper(II), Vanadyl, and Zinc(II) 4,4',4'',4'''-Tetraalkylphthalocyanine Dyes in Benzene. *J. Phys. Chem.* **1972**, 76, (14), 1994-1996.
143. Achar, B. N.; Fohlen, G. M.; Parker, J. A.; Keshavayya, J.: Synthesis and Structural Studies of Metal(Ii) 4,9,16,23-Phthalocyanine Tetraamines. *Polyhedron* **1987**, 6, (6), 1463-1467.
144. Kudrevich, S. V.; Ali, H.; van Lier, J. E.: Syntheses of Monosulfonated Phthalocyanines, Benzonaphthoporphyrazines and Porphyrins Via the Meerwein Reaction. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I* **1994**, (19), 2767-2774.
145. Tamura, T.; Kikuchi, K.; Takeoka, Y.; Rikukawa, M.: Synthesis of fullerene containing cyano group and formation of the metal complexes. *Synth. Met.* **2003**, 135-136, 739-740.
146. Torres, T.; Gouloumis, A.; Sanchez-Garcia, D.; Jayawickramarajah, J.; Seitz, W.; Guldi, D. M.; Sessler, J. L.: Photophysical characterization of a cytidine-guanosine tethered phthalocyanine-fullerene dyad. *Chem. Comm.* **2007**, (3), 292-294.
147. Yokoyama, S.; Kurata, H.; Harima, Y.; Yamashita, K.; Hoshino, K.; Kokado, H.: Adsorption Behavior of a Cationic Surfactant Derivative of Ferrocene on Phthalocyanine Pigment Surface. *Chem. Lett.* **1991**, (3), 441-444.
148. Cook, M. J.; Cooke, G.; Jafarifini, A.: A Liquid-Crystalline Ferrocenyl-Phthalocyanine. *J. Chem. Soc., Chem. Comm.* **1995**, (17), 1715-1716.
149. Gonzalez-Cabello, A.; Vazquez, P.; Torres, T.: A new phthalocyanine-ferrocene conjugated dyad. *J. Organomet. Chem.* **2001**, 637, 751-756.
150. Kasuga, K.; Moriwaki, N.; Handa, M.: Reaction of carbon dioxide with tetra-*t*-butylphthalocyaninato-aluminium(III)-ethylate or -ethoxide. *Inorg. Chim. Acta* **1996**, 244, (1), 137-139.
151. Sievertsen, S.; Homborg, H.: Monomeric and Dimeric Chromium(III) Phthalocyanines - Synthesis and Properties of Hydroxypyridinophthalocyaninatochromium(III) and Mu-Oxodi(Pyridinophthalocyaninatochromium(III)). *Z. Anorg. Allg. Chem.* **1994**, 620, (9), 1601-1606.
152. Aoudia, M.; Cheng, G.; Kennedy, V. O.; Kenney, M. E.; Rodgers, M. A. J.: Synthesis of a Series of Octabutoxy- and Octabutoxybenzophthalocyanines and Photophysical Properties of Two Members of the Series. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, (26), 6029-6039.
153. Kliesch, H.; Weitemeyer, A.; Muller, S.; Wöhrle, D.: Synthesis of Phthalocyanines with One Sulfonic-Acid, Carboxylic-Acid, or Amino Group. *Liebigs Ann. Chem* **1995**, (7), 1269-1273.
154. Linssen, T. G.; Durr, K.; Hanack, M.; Hirsch, A.: A Green Fullerene - Synthesis and Electrochemistry of a Diels-Alder Adduct of [60]Fullerene with a Phthalocyanine. *J. Chem. Soc., Chem. Comm.* **1995**, (1), 103-104.
155. Galanin, N. E.; Kudrik, E. V.; Shaposhnikov, G. P.; Aleksandriiskii, V. V.: Synthesis and Spectral Characteristics of Unsymmetrical Porphirazines with Triphenylmethyl Groups. *Russ. J. Org. Chem.* **2004**, 40, (5), 723-728.
156. Zimcik, P.; Miletin, M.; Musil, Z.; Kopecky, K.; Kubza, L.; Brault, D.: Cationic azaphthalocyanines bearing aliphatic tertiary amino substituents - Synthesis, singlet oxygen production and spectroscopic studies. *J. Photochem. Photobiol. A, Chem.* **2006**, 183, (1-2), 59-69.

157. Musil, Z.; Zimcik, P.; Miletin, M.; Kopecky, K.; Lenco, J.: Synthesis, separation and UV/Vis spectroscopy of pyrazino-quinoxalino-porphyrazine macrocycles. *Eur. J. Org. Chem.* **2007**, (27), 4535-4542.
158. Musil, Z.; Zimcik, P.; Miletin, M.; Kopecky, K.; Petrik, P.; Lenco, J.: Influence of electron-withdrawing and electron-donating substituents on photophysical properties of azaphthalocyanines. *J. Photochem. Photobiol. A, Chem.* **2007**, 186, (2-3), 316-322.
159. McKeown, N. B.; Chambrier, I.; Cook, M. J.: Synthesis and Characterization of Some 1,4,8,11,15,18,22,25-Octa-Alkyl-22,25-Bis(Carboxypropyl)Phthalocyanines and 1,4,8,11,15,18-Hexa-Alkyl-22,25-Bis(Carboxypropyl)Phthalocyanines. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1990**, (4), 1169-1177.
160. Chambrier, I.; Cook, M. J.; Cracknell, S. J.; McMurdo, J.: Synthesis and Characterization of Some Nonuniformly Substituted Mesogenic Phthalocyanines. *J. Mater. Chem.* **1993**, 3, (8), 841-849.
161. Torres, T.; de la Torre, G.; Garcia-Ruiz, J.: Synthesis of new push-pull unsymmetrically substituted styryl metallophthalocyanines: Targets for nonlinear optics. *Eur. J. Org. Chem.* **1999**, (9), 2323-2326.
162. Weitemeyer, A.; Kliesch, H.; Wöhrle, D.: Unsymmetrically Substituted Phthalocyanine Derivatives via a Modified Ring Enlargement Reaction of Unsubstituted Subphthalocyanine. *J. Org. Chem.* **1995**, 60, (15), 4900-4904.
163. Sastre, A.; Del Rey, B.; Torres, T.: Synthesis of novel unsymmetrically substituted push-pull phthalocyanines. *J. Org. Chem.* **1996**, 61, (24), 8591-8597.
164. Kobayashi, N.; Ishizaki, T.; Ishii, K.; Konami, H.: Synthesis, Spectroscopy, and Molecular Orbital Calculations of Subazaporphyrins, Subphthalocyanines, Subnaphthalocyanines, and Compounds Derived Therefrom by Ring Expansion. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, (39), 9096-9110.
165. Kasuga, K.; Idehara, T.; Handa, M.; Isa, K.: Preparation of unsymmetrical phthalocyanine by means of a ring expansion of subphthalocyanine. *Inorg. Chim. Acta* **1992**, 196, (2), 127-128.
166. Sastre, A.; Torres, T.; Hanack, M.: Synthesis of novel unsymmetrical monoaminated phthalocyanines. *Tetrahedron Lett.* **1995**, 36, (46), 8501-8504.
167. Leznoff, C. C.; Hall, T. W.: The synthesis of a soluble, unsymmetrical phthalocyanine on a polymer support. *Tetrahedron Lett.* **1982**, 23, (30), 3023-3026.
168. Young, J. G.; Onyebuagu, W.: Synthesis and characterization of di-disubstituted phthalocyanines. *J. Org. Chem.* **1990**, 55, (7), 2155-2159.
169. Dabak, S.; Bekaroglu, O.: Synthesis and properties of water-soluble crosswise-disubstituted phthalocyanines. *J. Chem. Res., Synop.* **1997**, (1), 8-9.
170. Dabak, S.; Bekaroglu, O.: Synthesis of phthalocyanines crosswise-substituted with two alkylsulfanyl and two amino groups. *New J. Chem.* **1997**, 21, (2), 267-271.
171. Stihler, P.; Hauschel, B.; Hanack, M.: Synthesis of a bisdienophilic phthalocyanine and of precursors for repetitive Diels-Alder reactions based on hemiporphyrines and phthalocyanines. *Chem. Ber. Recl.* **1997**, 130, (6), 801-806.
172. Maizlish, V. E.; Kulinich, V. P.; Shaposhnikov, G. P.: Unsymmetrical azaporphyrins. Synthesis, structure, and properties. *Russ. J. Gen. Chem.* **2004**, 74, (11), 1801-1817.
173. Leznoff, C. C., Greenberg, S.; Khouw, B.; Lever, A. B. P.: The syntheses of mono- and disubstituted phthalocyanines using a dithioimide. *Can. J. Chem.* **1987**, 65, (8), 1705-1716.
174. Nolan, K. J. M.; Hu, M.; Leznoff, C. C.: "Adjacent" Substituted Phthalocyanines. *Synlett* **1997**, (05), 593-594.

175. Kobayashi, N.: Optically active adjacent type non-centrosymmetrically substituted phthalocyanines. *Chem. Comm.* **1998**, (4), 1998, 487 - 488.
176. Miwa, H.; Kobayashi, N.: A novel naphthalocyanine isomer: A dinaphthophthalocyanine with C_{2v} symmetry. *Chem. Lett.* **1999**, (12), 1303-1304.
177. Kobayashi, N.; Miwa, H.; Isago, H.; Tomura, T.: An Adjacent Dibenzotetraazaporphyrin: A Structural Intermediate between Tetraazaporphyrin and Phthalocyanine. *Inorg. Chem.* **1999**, 38, (3), 479-485.
178. Knorr, R.; Trzeciak, A.; Bannwarth, W.; Gillissen, D.: New coupling reagents in peptide chemistry. *Tetrahedron Lett.* **1989**, 30, (15), 1927-1930.
179. Han, S.-Y.; Kim, Y.-A.: Recent development of peptide coupling reagents in organic synthesis. *Tetrahedron* **2004**, 60, (11), 2447-2467.
180. Smith, M.; Rammler, D. H.; Goldberg, I. H.; Khorana, H. G.: Studies on Polynucleotides. XIV.1 Specific Synthesis of the C_{3'}-C_{5'}; Interribonucleotide Linkage. Syntheses of Uridyl-(3'→5')-Uridine and Uridyl-(3'→5')-Adenosine₂. *J. Am. Chem. Soc.* **1962**, 84, (3), 430-440.
181. Mørkved, E. H.; Holmaas, L. T.; Kjösen, H.; Hvistendahl, G.: Preparation of magnesium azaphthalocyanines by cyclotetramerisation of S-substituted 4,5-disulfanylpyrazine-2,3-dicarbonitriles. *Acta Chem. Scand.* **1996**, 50, (12), 1153-1156.
182. Zimcik, P.; Miletin, M.; Ponec, J.; Kostka, M.; Fiedler, Z.: Synthesis and studies on photodynamic activity of new water-soluble azaphthalocyanines. *J. Photochem. Photobiol. A, Chem.* **2003**, 155, (1-3), 127-131.
183. Foks, H.; Manowska, W.; Sienicka, J.: Synthesis and tuberculostatic activity of some derivatives of pyrazine 2 carboxylic acid. *Acta Pol. Pharm.* **1976**, 33, (6), 687-693.
184. Michelsen, U.; Kliesch, H.; Schnurpfeil, G.; Sobbi, A. K.; Wöhrle, D.: Unsymmetrically substituted benzonaphthoporphyrazines: A new class of cationic photosensitizers for the photodynamic therapy of cancer. *Photochem. Photobiol.* **1996**, 64, (4), 694-701.
185. *Model 392 and 394 DNA/RNA Synthesizers, Users Manual*. Applied Biosystems, Inc.: Foster City, CA, USA, 1994.
186. Gumus, G.; Ahsen, V.: Synthesis and characterization of di-n-hexylamino-substituted phthalocyanines. *J. Porphyrins Phthalocyanines* **2002**, 6, (7-8), 489-493.
187. Ried, W.; Tsiotis, G.: New Fused Nitrogen-Rich Heterocycles from 5,6-Dichloropyrazine-2,3-Dicarbonitrile. *Liebigs Ann. Chem.* **1988**, (12), 1197-1199.
188. Kostka, M.; Zimcik, P.; Miletin, M.; Klemra, P.; Kopecky, K.; Musil, Z.: Comparison of aggregation properties and photodynamic activity of phthalocyanines and azaphthalocyanines. *J. Photochem. Photobiol. A, Chem.* **2006**, 178, (1), 16-25.
189. Mørkved, E. H.; Ossletten, H.; Kjösen, H.: Preparation of octa(alkoxy) azaphthalocyanines. *Acta Chem. Scand.* **1999**, 53, (12), 1117-1121.
190. Vagin, S. I.; Hanack, M.: Synthesis and Spectroscopic Properties of Non-Symmetrical Benzo-Annulated Porphyrazines and Their Metal Complexes. *Eur. J. Org. Chem.* **2002**, 2002, (16), 2859-2865.
191. Petrik, P.; Zimcik, P.; Kopecky, K.; Musil, Z.; Miletin, M.; Loukotova, V.: Protonation and deprotonation of nitrogens in tetrapyrazinoporphyrazine macrocycles. *J. Porphyrins Phthalocyanines* **2007**, 11, (7), 487-495.
192. Bergami, C.; Donzello, M. P.; Ercolani, C.; Monacelli, F.; Kadish, K. M.; Rizzoli, C.: Tetra-2,3-pyrazinoporphyrazines with externally appended pyridine rings. 3. A new highly electron-deficient octacationic macrocycle: Tetrakis-2,3-[5,6-di{2-(N-

methylpyridiniumyl}pyrazino]porphyrazine, [(2-Mepy)(8)TPyzPzH(2)](8+). *Inorg. Chem.* **2005**, 44, (26), 9852-9861.

193. Donzello, M. P.; Ou, Z. P.; Monacelli, F.; Ricciardi, G.; Rizzoli, C.; Ercolani, C.; Kadish, K. M.: Tetra-2,3-pyrazinoporphyrazines with externally appended pyridine rings. 1. Tetrakis-2,3-[5,6-di(2-pyridyl)pyrazino]porphyrazine: A new macrocycle with remarkable electron-deficient properties. *Inorg. Chem.* **2004**, 43, (26), 8626-8636.

194. Marras, S. A. E.; Kramer, F. R.; Tyagi, S.: Efficiencies of fluorescence resonance energy transfer and contact-mediated quenching in oligonucleotide probes. *Nucleic Acids Res.* **2002**, 30, (21), e122.

195. Stuzhin, P. A.: Azaporphyrins and phthalocyanines as multicentre conjugated ampholites. *J. Porphyrins Phthalocyanines* **1999**, 3, (6-7), 500-513.

196. Stuzhin, P. A.; Khelevina, O. G.: Azaporphyrins: Structure of the reaction centre and reactions of complex formation. *Coord. Chem. Rev.* **1996**, 147, 41-86.

197. Sheinin, V. B.; Berezin, B. D.; Khelevina, O. G.; Stuzhin, P. A.; Telegin, F. Y.: Acidic Ionization of Tetraazaporphin in Dimethyl-Sulfoxide. *Zh. Org. Khim.* **1985**, 21, (7), 1571-1576.