

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

MEDICINÁLNÍ CHEMIE



BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Koordinčně nenasycené komplexy makrocyclických amidů
Coordinatively unsaturated complexes of macrocyclic amides

Adéla Mojžíšová

Vedoucí závěrečné práce/Školitel:
Prof. RNDr. Jan Kotek, Ph. D.

Praha, 2022

Prohlášení:

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

V Praze, 9. 8. 2022

Adéla Mojžíšová

Abstrakt

Neurodegenerativní choroby jsou onemocnění postihující stále větší procento obyvatel vyspělých zemí. Dle Světové zdravotnické organizace (WHO) dnes postihuje demence 55,2 milionů lidí, za posledních 20 let se počet případů více než zdvojnásobil. I přes tento nárůst stále není dostupný efektivní způsob jejich diagnostiky a léčby.

S dalším rozvojem implantologie jsou stále čtenější bakteriální infekce v důsledku tvorby biofilmů na tělu nevlastních povrchích. Vývoj syntetických nukleáz, které by byly schopny zabránit tvorbě biofilmů či je štěpit, je proto stále jedním z vědeckých zájmů.

Cílem této bakalářské práce je příprava polyazamakrocyklů obsahujících aminové i amidové funkční skupiny. U těchto látek lze při komplexaci měďnatého iontu předpokládat deprotonizaci amidových skupin. Ligandy jsou navrženy tak, aby jejich komplexy mohly sloužit pro diagnostiku neurodegenerativních chorob pomocí pozitronové emisní tomografie, ale také mimikovat přirozené nukleázy a hydrolyticky štěpit bakteriální biofilmy.

Klíčová slova: neurodegenerativní choroby; pozitronová emisní tomografie; bakteriální biofilmy; nukleázy; měď

Abstract

Growing number of citizens in developed countries suffers from neurodegenerative diseases. According to World Health Organization (WHO) dementias affect 55,2 million people and their incidence was doubled over last 20 years. Although the number of cases is increasing, there is still no effective way for their diagnostics or treatment.

With development of implantology, there are still common bacterial diseases as a result of formation of bacterial biofilms on unnatural surfaces. The development of synthetic nucleases which could prevent formation of biofilms is therefore one of the scientific aims.

The aim of this bachelor thesis is preparation of polyazamacrocycles which contain amino and amidic functional groups. It can be assumed that these compounds will deprotonate amidic groups after coordination of copper(II) ion. These systems are designed to serve as agents for diagnostics of neurodegenerative diseases using positron emission tomography. In addition, as the complexes are coordinatively unsaturated, they can potentially show an artificial nucleases activity and ability to hydrolytically cleave bacterial biofilms.

Key words: neurodegenerative diseases; positron emission tomography; bacterial biofilms; nucleases; copper

Poděkování

V první řadě bych chtěla poděkovat své rodině, především pak rodičům a sestře, za veškerou podporu, která mi byla dávana po celou dobu mého studia.

Dále bych chtěla poděkovat svému školiteli Honzovi Kotkovi za vedení mé bakalářské práce, jeho trpělivost, cenné rady a v neposlední řadě za velmi vstřícný přístup. Poděkování patří také celému kolektivu laboratoře č. 19 za skvělé pracovní prostředí, praktické rady a kamarádský kolektiv. Jmenovitě bych pak chtěla poděkovat Filipovi za měření NMR spekter a Robertovi za návrh a pomoc se syntézou 1,4,7,10-tetraazadekanu.

Poděkování patří také paní doktorce Ivaně Císařové za naměřené RTG struktury.

Obsah

1	Teoretický úvod.....	8
1.1	Neurodegenerativní onemocnění a jejich diagnostika	8
1.2	Pozitronová emisní tomografie (PET)	11
1.2.1	[¹⁸ F] PET	12
1.2.2	Kovové radioizotopy pro PET	13
1.2.3	Využití PET pro diagnostiku ND	15
1.3	Bakteriální biofilmy	18
1.3.1	Potenciální cesty léčby infekcí způsobených biofilmy	21
1.3.2	Výzkum syntetických nukleáz.....	23
1.4	Měď a její vlastnosti	24
1.5	Cíl práce.....	26
2	Experimentální část.....	27
2.1	Seznam použitých chemikálií	27
2.2	Metody charakterizace	27
2.2.1	NMR spektroskopie	27
2.2.2	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie spojená s hmotnostní spektrometrií	27
2.2.3	Tenkvrstvá chromatografie.....	27
2.2.4	RTG difrakce	28
2.3	Syntetická část	29
2.3.1	Obecné schéma práce	29
2.3.2	Příprava dimethyl(4-nitrobenzyl)malonátu (1a).....	30
2.3.3	Příprava diethyl(4-nitrobenzyl)malonátu (1b).....	31
2.3.4	Čištění komerčně dostupného 1,4,7,10-tetraazadekanu (3).....	35
2.3.5	Příprava 1,4,7,10-tetraazadekanu (3).....	37
2.3.6	Cyklizační reakce	39

3	Diskuze.....	43
3.1	Syntéza <i>mono</i> - substituovaných malonátů.....	43
3.2	Čištění a příprava 1,4,7,10-tetraazadekanu.....	44
3.3	Cyklizační reakce.....	47
3.3.1	Templátový efekt kovů.....	47
3.3.2	Cyklizace	48
4	Závěr.....	49
5	Seznam použitých zkratk.....	50
6	Seznam použité literatury	52

1 Teoretický úvod

1.1 Neurodegenerativní onemocnění a jejich diagnostika

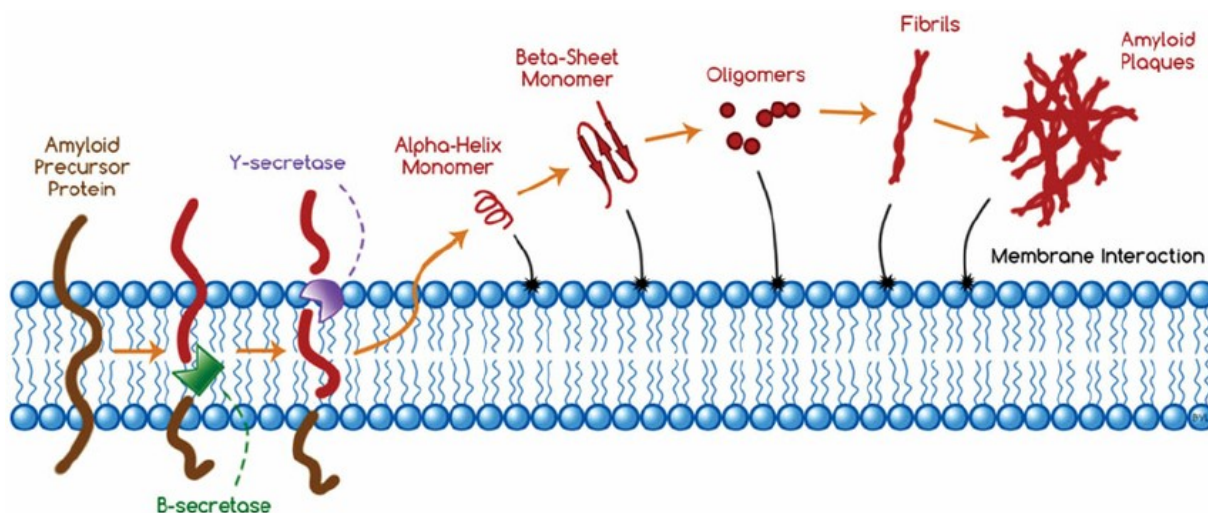
Neurodegenerativní choroby jsou onemocnění projevující se zánikem neuronů, zmnožením gliových buněk či akumulací specifických proteinů. Právě akumulace proteinů, jednoho či více druhů, vede ke vzniku amyloidních plaků. Tyto amyloidní plaky mohou být lokalizovány jak intracelulárně, v cytoplazmě neuronů a mikroglíí, tak extracelulárně a tvořit depozity ve funkčních částech mozku. Lokalizace tvorby plaků je pro různá onemocnění charakteristická, stejně jako jsou charakteristické proteiny tyto choroby způsobující.¹

Dnes je známo okolo 50 proteinů, které mohou tvořit proteinové plaky. Tyto proteiny jsou označovány termínem amyloidní proteinové prekurzory (APP).² APP se nacházejí v buněčných membránách a jsou enzymaticky štěpeny pomocí sekretáz. Při štěpení pomocí sekretázy α a γ vznikají neškodné intermediáty, avšak při současném štěpení β a γ sekretázou vznikají amyloidogenní peptidy.^{3,4} Mezi nejznámější z APP patří amyloid- β peptid ($A\beta$), skládající se z 40 ($A\beta$ -40) či 42 ($A\beta$ -42) aminokyselin, způsobující Alzheimerovu chorobu (AD), α -synuclein způsobující Parkinsonovu chorobu (PD) a protein Tau podílející se na rozvoji AD i PD. Dále je pro APP typické opakování stejných tripletů aminokyselin, jež může způsobit Huntingtonovu chorobu (HD). Neurodegenerativní choroby lze právě dle proteinů je způsobujících patogeneticky dělit na amyloidopatie (AD), synukleopatie (PD), tauopatie (AD a PD) a onemocnění s opakováním tripletů (HD).³

Vznikající amyloidní plaky se od sebe odlišují v různých faktorech. Může se jednat o odlišné primární sekvence APP, a tedy pořadí aminokyselin v proteinovém řetězci, nebo odlišný způsob ukládání jednotlivých fibril (vlákna tvořená více souběžně orientovanými proteinovými řetězci) za tvorby extracelulárních plaků. Další odlišností je akumulace neproteinových komponent v placích.²

Pro vznik amyloidních fibril je typická změna sekundární konformace v globulárních proteinech z α -helixů na β -skládané listy a jejich následná akumulace. $A\beta$ jsou v buňce syntetizovány v nativní konformaci, která je heterogenní a flexibilní. Následně dochází ke tvorbě sekundární struktury, pomocí procesu self-assembly (samosložení), která již obsahuje opakující se motivy β -skládaných listů.⁵ Jednotlivé molekuly $A\beta$ se postupně spojují za tvorby dimerů, trimerů a následně jsou tvořeny

proteinové fibrily, které se vzájemně paralelně ukládají za tvorby plaků. Dostatečná pevnost amyloidních plaků je zajištěna uspořádáním jednotlivých fibril, které tvoří tzv. β -cross struktury – organizované β -řetězce jsou připojovány k fibrilové ose tak, že jednotlivá protofilamenta jsou k sobě vzájemně vázána kolmo. Celý proces stavby probíhá ve třech fázích nazývaných: nukleační (lag), elongační (exponenciální) a stacionární fáze.^{2,6} Proces tvorby amyloidních plaků je znázorněn na *Obrázku 1*.



Obrázek 1: Proces tvorby amyloidních plaků. Štěpení APP pomocí β - a γ - sekretáz za tvorby monomeru složeného z α -helixů a následná přeměna na strukturu bohatou na β -skládané listy. Interakcí monomerů vznikají oligomery, které tvoří fibrily a ty se následně ukládají za tvorby amyloidních plaků. Převzato z literatury.⁴

Na zahájení agregace amyloidních fibril má vliv celá řada faktorů, jako jsou reaktivní formy kyslíku (ROS), změny pH a výskyt iontů kovů. Jedním z iontů kovů ovlivňujících propuknutí nukleační fáze je ion měďnatý, který se váže přes N-terminální oblast $A\beta$ a koordinace je zprostředkována přes imidazolové skupiny tří molekul histidinu. Propuknutí onemocnění je ovlivněno počtem iontů $Cu(II)$, které se váží na $A\beta$.⁶

Speciálním druhem proteinopatie je prionová choroba (PrD), která je způsobena prionovými proteiny (PrP). Ty se chovají jako infekční částice a způsobují degradaci centrálního nervového systému. Přírodním prionem je membránový glykoprotein PrP^C (označení C pochází z anglického cellular – buněčný) syntetizovaný neurony. Jeho spontánní konverze na PrP^{Sc} (označení Sc je zkratkou onemocnění scrapie, drbavky, díky které byla objevena PrD patologie) zapříčiní propuknutí onemocnění. Tyto dvě formy se odlišují ve své sekundární a terciární struktuře. Základním rozdílem je fakt, že infekční PrP^{Sc} je strukturně bohatý na β -skládané listy.⁷ PrP obsahují čtyřikrát se opakující

sekvenci, která je složena z osmi aminokyselin. Tato struktura je schopna vychytávat měď a blokovat její toxicitu. Měď je vázána pomocí imidazolového kruhu histidinu. Histidin je obsažen v oktameru aminokyselinové sekvenci složené z ProHisGlyGlyGlyTrpGlyGln.^{8,9}

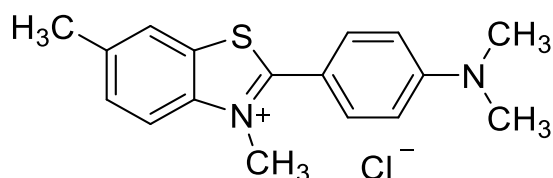
Akumulace PrP^{Sc} způsobuje ztrátu neuronálních synapsí či změnu struktury v kortikálních částech mozku. Mezi nejznámější PrD patří Creutzfeldova–Jakobova choroba (CJD) projevující se jako vysoce progresivní demence.¹ Specifická je pro PrD infekčnost projevující se přenosem jak mezi lidmi, tak mezi zvířaty. Tato vlastnost je unikátní a ostatní typy neurodegenerativních chorob ji nevykazují.

Amyloidní struktury působící neurodegenerativní choroby jsou díky specifickým konformacím odolné i k přirozeným procesům fyziologické degradace. Amyloidní plaky se též projevují cytotoxicitou a implikují rozvoj některých dalších onemocnění. Mezi další projevy vzniku amyloidních plaků patří narušování cytoplazmatických membrán buněk i organel, jako jsou mitochondrie, endoplazmatické retikulum či lysozomy. Narušování cytoplazmatických membrán neuronálních buněk vede ke styku intracelulárního a extracelulárního prostředí. Dochází tak k úniku Ca²⁺ iontů, což vede k narušení osmotického tlaku a následně k apoptóze neuronů. Vznik amyloidních depozit má vliv i na další tkáň, ovlivňuje například propuknutí diabetu II. typu, pokud se plaky usazují v srdci a ledvinách. Plaky se mohou též tvořit v kostních tkáních.²

Jak již bylo zmíněno, jednotlivá neurodegenerativní onemocnění se odlišují v proteinech je způsobujících. Tyto proteiny se dále odlišují individuálně ve své struktuře, což je důvodem komplikací diagnostiky a léčby. Vývoj nových technik diagnostiky ND by výrazně pomohl k dřívějšímu odhalení pacientů, u nichž je nutnost terapeuticky zasáhnout. Úspěšnost léčby zvyšuje časná diagnostika, propuknutí onemocnění je v takových případech možné moderovat pomocí cholinergních inhibitorů (neurotransmitery působící inhibičně na acetylcholinové synaptické kanály).¹⁰

Jediným definitivním způsobem pro diagnostiku ND jsou histopatologické rozboru mozkové tkáň *post mortem*.¹⁰ Mozek postižený AD vykazuje zmenšené frontální laloky, hippokampus a amygdalu, což jsou části mozku podmiňující paměť a schopnost učení. Při histopatologických rozbořech je využíváno barvivo kongo červeň, které bylo využito pro první diagnostiku AD Aloisem Alzheimerem a byla tak odhalena amyloidní podstata nemoci.^{2,4} Kongo červeň se totiž váže nekovalentně do amyloidních struktur. Pokud k takovému navázání dojde, vykazuje toto barvivo po ozáření polarizovaným světlem červený a zelený dvojlom.^{2,6}

Jednou z možností diagnostiky ND *in vitro* je využití Thioflavinu T (ThT), který je využíván jako standardní prostředek pro sledování amyloidní agregace v reálném čase, a měření kinetiky tohoto procesu. ThT je fluorofor skládající se z benzothiazolového kruhu a dimethylanilinu, přičemž tyto dva kruhy jsou spojeny pomocí C–C vazby, viz *Obrázek 2*.¹¹



Obrázek 2: Struktura ThT.

K vazbě ThT do amyloidních plaků dochází tak, že ThT je interkalován mezi boční řetězce paralelních β -skládaných listů a aromatické kruhy jsou poté natočeny tak, že dochází k delokalizaci π elektronů přes oba aromatické kruhy. Po navázání na amyloidní fibrily je změněna vlnová délka excitačního maxima ThT z původních 385–450 nm na 455–482 nm.⁶

Diskutovaným tématem pro brzkou diagnózu ND je využití pozitronové emisní tomografie (PET) či magnetické rezonance (MRI).

1.2 Pozitronová emisní tomografie (PET)

Pozitronová emisní tomografie je zobrazovací metoda, která odráží koncentraci radiofarmaka v organismu. Do organismu je vpravena látka vykazující biologickou aktivitu, která je označena radionuklidem emitujícím pozitron. Emitovaný pozitron anihiluje s elektronem z okolí, přičemž dochází k emisi gama záření v podobě dvou fotonů. Dva odlétající fotony mají stejnou energii (511 keV) a jejich směr šíření je přesně opačný. Právě emitované záření je zachyceno detektory a matematicky je rekonstruována distribuce radioaktivní látky v organismu.¹² Radioizotop používaný pro PET musí být dostupný na denní bázi, jeho poločas přeměny musí být dostatečně dlouhý na to, aby pronikl do sledované tkáně, ale zároveň krátký, aby bylo eliminováno přílišné vystavení pacienta radioaktivitě. S připravovaným radioizotopem je též nutné chemicky pracovat a zavádět jej do sloučenin a i proto musí být poločas přeměny dostatečně dlouhý.¹³ Mezi nejdůležitější pozitronové zářiče jsou řazeny nuklidy ^{15}O , ^{13}N , ^{11}C a ^{18}F , které jsou připravovány pomocí cyklotronů. Nevýhodou ^{15}O , ^{13}N a ^{11}C je krátký poločas přeměny, musí tedy být připravovány přímo v místě jejich použití. Jejich výhodou je, že se jedná o tělu přirozené

prvky, kterými je možné značit i malé (fyziologické) molekuly a využít i molekuly vody H_2^{15}O .¹⁴ Vhodnější poločas přeměny vykazuje ^{18}F , který může být distribuován i do vzdálenějších pracovišť od místa výroby.¹³ Poločasy přeměny zmíněných radioizotopů jsou shrnuty v *Tabulce 1*.

Tabulka 1: Poločasy přeměny radioizotopů ^{15}O , ^{13}N , ^{11}C a ^{18}F a malé fyziologické molekuly, které mohou být využity pro zobrazování metodou PET.¹²

Radioizotop	$t_{1/2}$ [min]	Značená molekula
^{15}O	2	O_2 , H_2O
^{13}N	11	NH_3 , aminokyseliny
^{11}C	20	CO_2 , alkoholy
^{18}F	110	^{18}F -glukóza

Pro diagnostiku pomocí PET je možné využívat i kovové radioizotopy. Ty jsou získávány pomocí cyklotronů nebo generátorů, vykazují rozmanité poločasy rozpadu a jejich záření má zpravidla vyšší energii. Mezi vhodné kovové radioizotopy lze zařadit více izotopů Cu (^{60}Cu , ^{64}Cu ,...), ^{52}Fe , ^{68}Ga a mnoho dalších.¹⁵ Jako PET zářiče lze využít i halogeny, například ^{75}Br či ^{76}Br pro mapování metabolismu mastných kyselin v kardiovaskulárním oběhu či ^{124}I , který může cílit na systém neurotransmiterů a štítnou žlázu.¹⁶

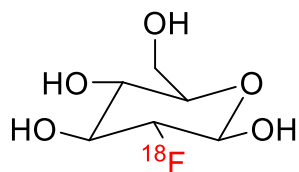
Výhodou metody PET oproti MRI či SPECT (jednofotonová emisní výpočetní tomografie) je vysoká přesnost, jelikož vznikající pozitrony ztrácí většinu své kinetické energie po uražení dráhy dlouhé pouze několik milimetrů a místo jejich anihilace lze zjistit s velkou přesností. Další možností, jak vylepšit získaný obraz, je zahrnutí informace time-of-flight (TOF), tedy informace o době letu vznikajících fotonů, do matematických rekonstrukcí.^{12,13}

1.2.1 [^{18}F] PET

Radioizotop fluoru ^{18}F má vhodný poločas přeměny 110 minut a při své přeměně uvolňuje pozitron za vzniku stabilního izotopu kyslíku ^{18}O . Izotop ^{18}F je možné připravit v cyklotronu bombardováním jader ^{18}O protony za vzniku izotopu fluoru a neutronu. Tuto přeměnu je tedy možné zapsat rovnicí $^{18}\text{O}(p,n)^{18}\text{F}$.¹⁷ Tímto způsobem přípravy je získán vodný roztok $^{18}\text{F}^-$, který může být použit pro přípravu radioaktivně značených látek

pomocí stereospecifické nukleofilní substituce. Nukleofilní substituce probíhá mechanismem S_N2 , při němž dochází k ataku nukleofilem z opačné strany, než ze které se odštěpuje slabě bazická odstupující skupina. Nukleofilně lze zavádět ^{18}F i na aromatické sloučeniny mechanismem S_NAr , kdy dochází k nahrazování odstupující skupiny, která je aktivována elektron-odtahujícími skupinami v polohách *ortho* a *para*. Další možností zavedení ^{18}F do sloučenin je elektrofilní substituce, pro niž je fluor připravován reakcí $^{20}\text{Ne}(d,\alpha)^{18}\text{F}$ za vzniku radioaktivního plynu $[^{18}\text{F}]\text{F}_2$.^{18,19} Dále je výhodou využití ^{18}F fakt, že přeměna β^+ probíhá s vysokou konverzí 97 % a kinetická energie emitovaného pozitronu je poměrně nízká (před anihilací urazí přibližně 2 mm).¹⁷

Značením izotopem ^{18}F je možné připravit derivát ^{18}F -2-fluor-2-deoxyglukózu ($[^{18}\text{F}]\text{-FDG}$). Tato příprava vychází z mannosy. Sloučenina $[^{18}\text{F}]\text{-FDG}$ (viz *Obrázek 3*) je formálně derivátem glukózy, ve které je hydroxylová skupina v pozici 2 nahrazena atomem fluoru, který je podobně velký jako atom kyslíku, a proto vykazuje vznikající $[^{18}\text{F}]\text{-FDG}$ podobnou biodistribuci jako glukóza. Na rozdíl od glukózy však buňky neumí $[^{18}\text{F}]\text{-FDG}$ zpracovat (štěpit), a proto dochází k její kumulaci v metabolicky aktivních tkáních.



Obrázek 3: Struktura $[^{18}\text{F}]\text{-FDG}$.

Tato sloučenina je proto využívána pro studium a mapování metabolismu glukózy v organismu, zvláště v onkologii a neurologii. Další diagnosticky využívané sloučeniny obsahující ^{18}F jsou $[^{18}\text{F}]\text{-thymidin}$ a $[^{18}\text{F}]\text{-misonidazol}$. Obě látky lze využít pro klinickou diagnostiku v neurologii, ale i v kardiologii a především v onkologii.¹⁷

1.2.2 Kovové radioizotopy pro PET

Výhodou potenciálního využití vybraných radionuklidů z řady přechodných kovů či lanthanoidů s vyššími hmotnostními čísly je zpravidla jejich delší poločas přeměny. Tyto radionuklidy je proto možné využívat pro studium biochemických drah na molekulární a buněčné úrovni.¹⁴ Některé ze zajímavých radioizotopů nejsou čistě krátko-dosahové β^+ zářiče, ale přeměňují se na stabilní izotopy i jinými druhy přeměn. Radioizotop ^{68}Ga , využívaný pro značení peptidů a regulačních proteinů nervového a trávicího traktu, se přeměňuje s poločasem 67,8 minut na stabilní ^{68}Zn souběžně dvěma cestami, z 88,9 %

dochází k β^+ přeměně a zbylých 11,1 % se přeměňuje pomocí elektronového záchytu.^{16,20} Pro produkci kovových radioizotopů jsou využívány tři možné cesty – generátory, nukleární reaktory a cyklotrony.¹⁶

Radiofarmakum, využívající kovových radionuklidů, se zpravidla skládá z požadovaného izotopu kovu, který je navázán vhodným ligandem za tvorby komplexu. Pro biogenní kovy v organismu existují přirozené transportní a metabolické biochemické dráhy. Naopak radioizotopy, které nejsou biogenní a nejsou navázány do vhodných ligandů, se primárně akumulují v kostní tkáni.¹⁵ Ligand může být bifunkční, jedna jeho část slouží pro komplexaci iontu kovu a druhá jako reaktivní skupina, pomocí které se naváže na vhodnou biologicky aktivní látku (tzv. targetující molekulu).¹⁵ Jak targetující molekula, tak i radioaktivní kov jsou vybírány dle procesu, který je třeba vizualizovat a zkoumat.¹⁶

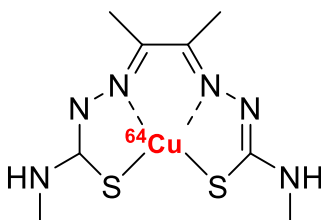
Z kovových izotopů mají zvláštní postavení radionuklidy mědi. Ty jsou využívány jak pro diagnózu, tak mohou být použity i pro cílenou terapii v závislosti na použitém nuklidu. Pro diagnostické zobrazování pomocí PET jsou používány izotopy ^{60}Cu , ^{61}Cu , ^{62}Cu a ^{64}Cu , pro terapii ^{64}Cu a ^{67}Cu . Všechny tyto izotopy, s výjimkou ^{67}Cu , se přeměňují β^+ rozpadem a zároveň vzniká γ záření, avšak výrazně se liší ve svých poločasech přeměn.^{14,21} Poločasy a vlastnosti přeměn jednotlivých radioizotopů jsou shrnuty v *Tabulce 2*.

Tabulka 2: Poločasy přeměny vybraných radioizotopů mědi, typy přeměn, kterým podléhají, a jejich intenzita a energie vyzářená po dané přeměně.²¹

Radioizotop	$t_{1/2}$ [min]	Typ přeměny (%)	Energie [keV]
^{60}Cu	23	β^+ (88)	511
		EC (12)	1332
^{61}Cu	204	β^+ (62)	511
		EC (38)	283
^{62}Cu	10	β^+ (98)	511
		EC (2)	1173
^{64}Cu	761	β^+ (17)	511
		β^- (39)	–
		EC (44)	1345
^{67}Cu	3709	β^- (100)	93

Nejvíce využívané pro PET jsou radioizotopy ^{61}Cu a ^{64}Cu s nejdelšími poločasy přeměn. Jejich kinetická energie β^+ přeměny je srovnatelná s energií pozitronů emitovaných ^{18}F . Nuklid ^{64}Cu je možné využívat i pro terapii, jelikož podléhá také β^- přeměně. Příprava ^{64}Cu je prováděna dle rovnice $^{64}\text{Ni}(p,n)^{64}\text{Cu}$, dochází tedy k ostřelování terčového jádra ^{64}Ni protony.¹⁶ Prekurzorem pro přípravu radiofarmak je ion $^{64}\text{Cu}^{2+}$, který je komplexován do připravených ligandů.²¹

Ionty Cu^{2+} jsou v organismu potřebné pro mnoho biologických procesů. Jsou komponenty funkčních proteinů a hrají roli při replikaci buněk. Distribuce v organismu probíhá pomocí plazmy, ve které jsou ionty Cu^{2+} vázány na plazmatické proteiny, jako jsou ceruloplasmin či albumin a transcuprein, které je po redukci na Cu^+ transferují do buněk. Značením pomocí ^{64}Cu lze studovat patologické změny v metabolismu mědi. Nevýhodou tohoto radioizotopu je jeho potenciální toxicita, a proto je obtížné vypočítat bezpečné dávky farmak.²¹ Poprvé byl radioizotop ^{64}Cu využit pro zobrazování lidského nádoru ve stavu hypoxie ve formě ^{64}Cu -diacetyl-bis(N4-metylthiosemikarbazonu) ($[^{64}\text{Cu}]\text{ATSM}$), viz Obrázek 4.¹⁶



Obrázek 4: Strukturální vzorec radiofarmaka $[^{64}\text{Cu}]\text{ATSM}$.

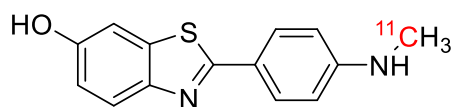
1.2.3 Využití PET pro diagnostiku ND

Amyloidní-PET je metoda používaná pro zobrazování amyloidních plaků *in vivo* u pacientů, kteří již mají diagnostikovanou AD. Lze takto odhalit přesnější amyloidní patologii a konkrétní formu nemoci.²² Používaná radiofarmaka musí mít afinitu pro fibrilární A β struktury, avšak zatím nejsou využívána farmaka zcela specifická a váží se částečně i na přirozené A β neuložené v placích. Dále je při mapování AD sledován hypometabolismus glukózy, který zcela odráží intenzitu aktivity astrocytů, anebo také snížení hydrolytického štěpení neurotransmiterů pomocí acetylcholinesterázy.^{22,23}

Látky využívané pro diagnostiku by měly vykazovat takové vlastnosti, aby její molekula procházela přes hemoencefalitickou membránu (blood-brain barrier, BBB) a byla tak schopna se šířit do mozku. BBB tvoří bariéru mezi mozkovou tkání a krevními

kapilárami, které ji zásobují živinami. Obecně by farmaka měla splňovat vlastnosti drug-likeness, která popsal na základě pozorování Lipiski a zformuloval pravidlo pěti (RO5). RO5 říká, že absorpce farmaka do organismu je vyšší, pokud sloučenina obsahuje maximálně 5 donorů a 5 akceptorů vodíkových vazeb, molekulová hmotnost nepřekračuje 500 Da a rozdělovací koeficient $\log P$ mezi *n*-oktanol a vodu je menší než 5.²⁴ Pro radiofarmaka cílicí CNS jsou kritéria průchodu látek kvůli BBB ještě přísnější. Ideálními vlastnostmi pro PET radiodiagnostika jsou tedy vysoká afinita a specifita, malá molekulová hmotnost, lipofilita a stabilita po navázání radioizotopu.²⁵

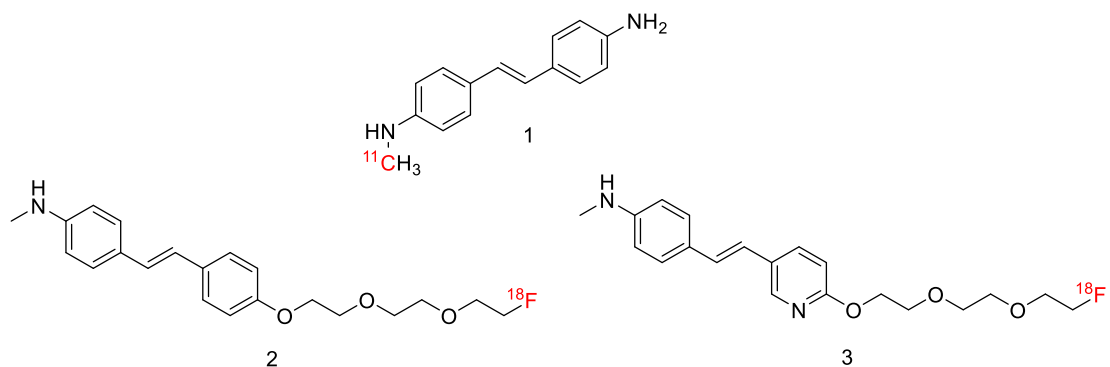
Prvním specifickým použitým radiotracerem pro amyloidní PET byla sloučenina [¹¹C]-2-(4-methylaminofenyl)-6-hydroxybenzothiazol (¹¹C-PIB), která je derivátem ThT (viz Obrázek 5).²⁶



Obrázek 5: Struktura farmaka ¹¹C-PIB.

Vazba ¹¹C-PIB je specifická a irreverzibilní především v šedé tkáni mozkové a výhodou diagnostiky je možnost rozlišit mezi AD a jinými ND. Neuvedení do celkové klinické praxe je důsledkem krátkého poločasu přeměny izotopu ¹¹C (20 min), tato sloučenina tak může být využita jen v PET centrech s vlastním cyklotronem.^{25,27} Využívaným derivátem ¹¹C-PIB je ¹⁸F-flutemetamol, který díky značení fluorem vykazuje příznivější poločas přeměny pozitronového zářiče a jeho chování v organismu vykazuje stejné vlastnosti. ¹⁸F je v této sloučenině navázán na benzenovém jádře v *meta* pozici k methylaminové funkční skupině.²⁷

Dalšími radiofarmaky jsou tři deriváty stilbenu – ¹¹C-MeDAS, ¹⁸F-fluorbetapir a ¹⁸F-fluorbetaben, které jsou zobrazeny na Obrázku 6.^{25,27,28}

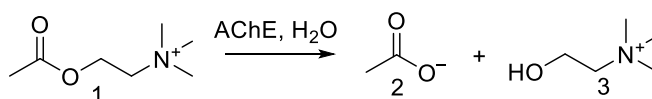


Obrázek 6: Struktury radiofarmak na bázi stilbenů. 1 – ^{11}C -MeDAS, 2 – ^{18}F -fluorbetaben a 3 – ^{18}F -fluorbetapir.

Stilbeny jsou sloučeniny rostlinného původu, které ve své struktuře obsahují dvě fenylové skupiny propojené ethylenovou spojkou. Bylo prokázáno, že tyto látky vykazují širokou biologickou aktivitu, která čítá i neuroprotektivní funkci. U některých stilbenů byla ve studiích prokázána antiagregativní aktivita při tvorbě A β plaků.^{29,30} Pomocí ^{11}C -MeDAS lze mapovat degradaci myelinových obalů neuronů a jejich reparaci. Jeho výhodou je vysoká specifita a selektivita k myelinovým vláknům. Tato molekula snadno prochází přes BBB.³¹ Oba fluorové deriváty vykazují vysokou specifitu vazby a afinitu k A β strukturám. Pro derivát ^{18}F -fluorbetapir je dosahováno lepšího poměru signál:šum při zobrazování.²⁸

Další z možností, jak zobrazovat amyloidní plaky, by byla derivatizace ^{64}Cu -ATSM pomocí benzothiazolové či stilbenové komponenty, které by zaručovaly navázání na A β struktury. Již bylo prokázáno, že některé takovéto struktury jsou schopny velice dobře penetrovat přes BBB. Navíc je výhodou těchto sloučenin příznivý poločas přeměny ^{64}Cu , což je činí vhodnějšími, než látky značené pomocí ^{11}C i ^{18}F .³²

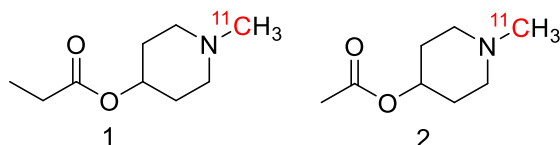
Pro zobrazování AD a PD *in vivo* je možné využívat i látky vázající se selektivně jako substráty do aktivního místa enzymu acetylcholinesterázy (AChE).³³ AChE je enzym, který provádí hydrolyzu neurotransmiteru acetylcholinu (ACh), ten má vliv jak na centrální, tak i na periferní nervový systém (viz Obrázek 7).



Obrázek 7: Hydrolytické štěpení ACh (1) pomocí AChE na acetát (2) a cholin (3).

Využívaná farmaka jsou tedy radioaktivně značené sloučeniny strukturně podobné ACh a musí se chovat selektivně. Pro selektivitu musí být splněn předpoklad, že je možné je hydrolyticky štěpit na dvě menší molekuly podobné acetátu a cholinu.³⁴ Mapování aktivity

AChE při ND je využíváno pro zjištění její snížené aktivity, která je při AD a PD typická. Využívanými farmaky pro zobrazování cholinergní dráhy jsou *N*-¹¹C-methylpiperidin-4-yl propionát (¹¹C-PMP) či *N*-¹¹C-methylpiperidin-4-yl acetát (¹¹C-MP4A), jejichž strukturní vzorce jsou zobrazeny na *Obrázku 8*. Tímto způsobem lze mapovat i mechanismus vzniku ND. Látky vznikající štěpením pomocí AChE jsou uvězněny v mozku a lze je dobře mapovat pomocí PET.^{33,35}



Obrázek 8: Navržená radiofarmaka na bázi ACh. 1 – ¹¹C-PMP, 2 – ¹¹C-MP4A.

[¹⁸F]-FDG je radiofarmakem, využívaným pro studium metabolismu glukózy. Glukóza je v organismu transportována do buněk pomocí glukóza-1-transportéru a následně fosforylována pomocí hexokinázy. Přítomnost fluoru znemožní proces glykolýzy, tyto buňky jsou tedy hladové, a proto neustále pohlcují [¹⁸F]-FDG a akumulují ji v sobě v nezměněné formě. Díky akumulaci je poškozené buňky možné zobrazovat metodou PET. Využití nachází tato metoda také při určení stádia nemoci, ale neposkytuje možnost pro určení neuropatologie ND.^{22,23}

1.3 Bakteriální biofilmy

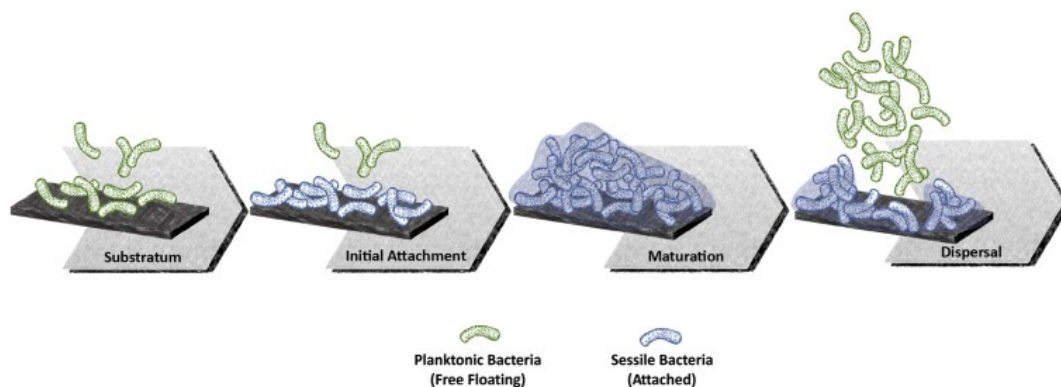
V přírodě je běžné, že mikroorganismy (MO) vyhledávají mnohobuněčné organizmy a společně žijí v symbióze. Symbióza nebo-li soužití může být mnoha typů, příkladem mohou být parazitizmus (jednostranně prospěšné soužití, při němž nejde primárně o zabití hostitele ale o jeho využití), komenzalizmus (jednostranně prospěšné soužití, avšak nezpůsobující nebezpečí hostiteli) či mutualismus (oboustranně prospěšné soužití). Často se nesprávně jako symbióza označuje pouze mutualismus.³⁶ Symbiotickým způsobem života mohou MO získávat potřebné živiny, zpravidla esenciální aminokyseliny. V lidském organismu se tak přirozeně vyskytuje až 10¹⁴ bakterií. Například v gastrointestinálním traktu tyto bakterie pomáhají se zpracováním potravy procesy fermentace, nebo zabraňují propuknutí onemocnění tak, že neutralizují oportunní MO, které podmiňují propuknutí onemocnění. MO se v lidském organismu vyskytují ve dvou možných formách, volně – planktonicky, či vázané na povrchy.^{37,38}

Bakteriální biofilm je organizovaná struktura agregovaných MO. Tvořit se může jak na tělu vlastních, tak i nevlastních povrchů. Biofilm se skládá ze tří komponent a sice z MO, extracelulární matrix a povrchu, na kterém se tvoří.³⁹ Tvorba biofilmu probíhá ve více fázích, kterými jsou fáze iniciace, maturace a poté dochází k přechodu do disperzního stádia.^{38,40}

Ve fázi iniciace dochází k zachycení planktonických MO na povrchy pomocí jejich vnějších struktur, pilů a bičíků, nebo i fyzikálními interakcemi, jako jsou elektrostatické či van der Waalsovy síly. Interakce jsou v tomto stádiu velmi slabé, a proto je tento stav zpočátku reverzibilní. Reverzibilita je potlačena ve chvíli, kdy bakterie začínají produkovat extracelulární polymerní substance (EPS). EPS jsou molekuly polysacharidů, proteinů složených především z D-aminokyselin, mastných kyselin a nukleových kyselin. Tvoří se tak první mono vrstva bakterií.^{38,41}

Ve stádiu maturace se nejdříve tvoří mikro-kolonie, jelikož produkcí EPS dochází k signalizaci pro dělení MO. Prostřednictvím EPS dochází mezi jednotlivými bakteriemi k výměně a sdílení substrátů, společné distribuci metabolických produktů i exkreci.⁴⁰ Spojením mikro-kolonií vzniká makro-kolonie. Jednotlivé MO společně komunikují pomocí signalizačních molekul – autoinduktorů. Tato signalizace ovlivňuje genovou expresi a také vznik třídídimenzionální struktury biofilmu a jeho hustotu či stabilitu.⁴⁰

Disperzní stádium je stav, při kterém dochází k uvolňování buněk z biofilmu. Ty tak opět přechází do planktonické formy a jejich cílem je kolonizace nového povrchu. Přechod do tohoto stavu je podmíněn nedostatkem potřebných živin v biofilmu.^{38,40} Celý proces tvorby bakteriálních biofilmů je znázorněn na *Obrázku 9*.



Obrázek 9: Tvorba bakteriálního biofilmu. Planktonické bakterie přisedají na substrát, tvoří se první monovrstva bakterií. Dále dochází k maturaci bakteriální kolonie, a nakonec k přechodu do disperzního stádia a uvolnění planktonických buněk. Převzato z literatury.³⁹

Biofilmy tvoří jak gram-pozitivní, tak i gram-negativní bakterie. Mezi nejčastější MO tvořící biofilmy patří například *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* či *Streptococcus viridans*. Výhodou tvorby biofilmů je pro bakterie zvýšená rezistence k antibiotikům (ATB) a antimikrobiálním terapiím. Biofilm tvoří fyzikální bariéru, díky které se sníží možnost přímého kontaktu molekul léčiva se samotnými bakteriemi.³⁸ Tvorba biofilmu je pravděpodobnější na rozhraní tekutiny a pevné fáze. Vyšší pravděpodobnost vazby MO je na hydrofobní a nepolární povrchy.⁴⁰ Proto vznikají bakteriální biofilmy velmi často na implantátech.

Implantáty jsou medicínální přístroje či umělé tkáně, které jsou umístěny do organismu nebo na jeho povrch. Jejich funkcí je náhrada chybějící tkáně, ale mohou zajišťovat

i monitorování tělesných funkcí, rozvod živin či napomáhat správné funkci orgánů.⁴² Mezi implantáty se tak řadí katetry, kloubní náhrady, umělé srdeční chlopně a zavedené kanyly, ale i kontaktní čočky či zubní implantáty a další.³⁹ MO mohou do organismu pronikat již při operaci vedoucí k zavedení implantátu, a proto je třeba dodržovat sterilitu, avšak ke tvorbě biofilmu může docházet i kdykoliv po dobu přítomnosti implantátu v organismu.³⁸

Pokud se biofilm na implantátu tvoří, může způsobit jeho selhání (selhání zavedených přístrojů) a vždy vede k ohrožení na životě infekcí, která může přejít až do chronického stadia.³⁸ Vliv na tvorbu biofilmu má zvolený materiál implantátu. Materiál by měl být co nejvíce biokompatibilní, a tedy hydrofilní, polární a anti-alergenní. Dále by měl zvolený materiál mít podobné fyzikální vlastnosti jako nahrazovaná tkáň. Důležitá je podobná elasticita, podle které lze rozlišit měkké a tvrdé tkáně. Vysokou biokompatibilitu

pro výrobu katetrů tak vykazují například silikony či polyuretany. Náhrady zubní či kostní tkáně pak mohou být například z keramických či kovových materiálů.^{39,43}

1.3.1 Potenciální cesty léčby infekcí způsobených biofilmy

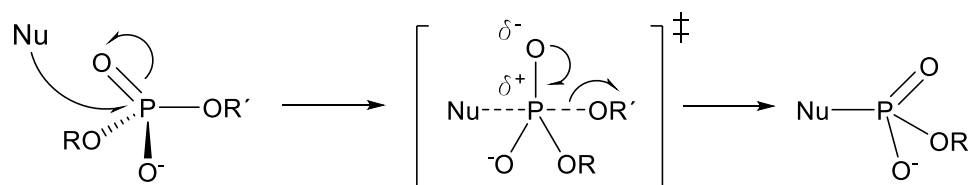
První možností pro léčbu veškerých bakteriálních infekcí je využití ATB. Avšak zvýšená rezistence biofilmů k ATB tuto léčbu značně komplikuje a musí tak být podávány vysoké dávky.³⁸ Jednou z metod, jak zabránit kolonizaci na implantátech, je využití antibiotických povrchů, ze kterých jsou ATB uvolňována v místě implantace. Tyto povrchy však mají nízkou odolnost a stabilitu.⁴⁴ Proto je ničení biofilmů a léčba jimi způsobených infekcí stále důležitým tématem výzkumu.

Veškeré buňky, i ty bakteriální, jsou citlivé na stres, proto je jednou z možných cest pro léčbu vyvolání stresových podmínek. Stresu může být docíleno například pomocí elektrického či elektromagnetického pole. Tato metoda způsobuje tvorbu pórů v buněčné membráně a následně její zhroucení. Dalšími způsoby, jak vyvolat stres, může být snížení pH, bioakustický efekt, fotodynamická terapie založená na produkci ROS pomocí světla či kryogenní efekt.^{38,44}

Vhodnou metodou pro odstranění biofilmů je naštěpení jejich extracelulární matrix, která je tvořena pomocí EPS. Složkami EPS jsou i nukleové kyseliny (NK), které jsou komponentou zprostředkovávající jak adhezi k povrchu, tak agregaci a komunikaci MO. Nukleové kyseliny je možné ničit jejich hydrolýzou a výzkum nukleáz je tedy jedním z potenciálních směrů pro léčbu infekcí způsobených biofilmy.⁴⁵

Nukleové kyseliny jsou biopolymerní molekuly, které mají nezastupitelnou funkci v živých organizmech. V DNA je uložena genetická informace, kterou je možné přepisovat do mRNA a podle ní dále syntetizovat nové proteiny procesem proteosyntézy. Základním stavebním kamenem NK jsou nukleotidy. Ty jsou složeny ze tří komponent – zbytku kyseliny fosforečné, purinové nebo pyrimidinové báze a pětiuhlíkatého monosacharidu. Jednotlivé nukleotidy tvoří polymerní kostru, do které se spojují pomocí fosfodiesterové vazby.⁴⁶

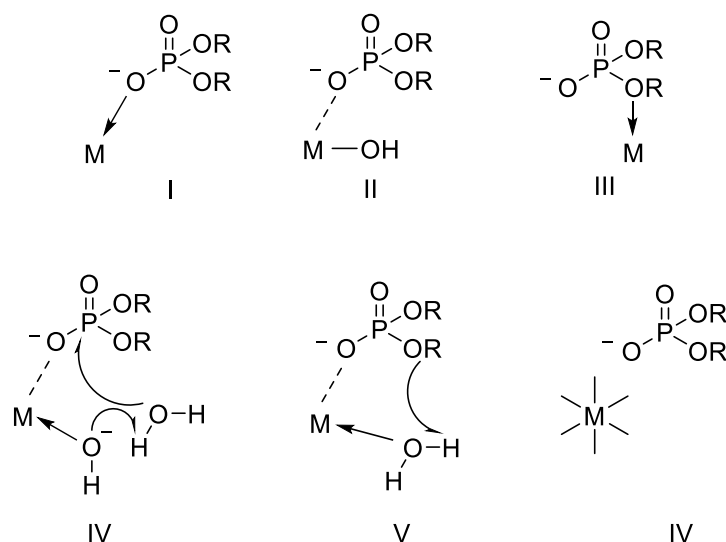
Právě fosfodiesterová vazba je vazbou, která je při degradaci hydrolyticky štěpena pomocí nukleáz. Štěpení vazby probíhá S_N2 mechanismem a je možné rozlišit tři fáze. Štěpení je zahájeno nukleofilním atakem, ten je následován tvorbou pentakoordinovaného intermediátu na atomu fosforu, poté dochází k rozštěpení požadované vazby a uvolnění odstupující skupiny. Mechanismus je znázorněn na *Obrázku 10*.^{47,48}



Obrázek 10: Mechanismus štěpení fosfodiesterové vazby.

Přirozené nukleázy ve svém aktivním místě obsahují atom iontu kovu. Typicky se jedná o ionty Mg(II), nebo také Ca(II) či Zn(II), Mn(II), nebo ionty železa. Běžné je také, že nukleázy mají více aktivních center, která vzájemně kooperují. Známa je například kombinace dvou iontů Zn(II), které kooperují s iontem Mg(II).⁴⁹

Důvodem přítomnosti kovu jako kofaktoru je snížení energetické bariéry reakce, a také má vliv na samotný proces štěpení vazby. Efekt aktivace kovovým iontem může být přímý, ovlivňující přímo štěpenou vazbu, či nepřímý, ovlivňující míru štěpení. Přímá aktivace spočívá ve vazbě fosfátu (I), v aktivaci nukleofilu (hydroxidového iontu) koordinací na kov (II) a v aktivaci odstupující skupiny (III). Nepřímým vlivem je aktivace molekuly vody koordinovaným hydroxylem (IV), koordinace molekuly vody, která figuruje jako intramolekulární kyselina (V) a elektrostatická interakce mezi centrálním kovem a nekoordinovaným fosfátem (VI). Jak přímý, tak nepřímý efekt vlivu centrálního kovu jsou znázorněny na *Obrázku 11*.^{48,50,51}



Obrázek 11: Vliv centrálního iontu kovu na hydrolyzu fosfodiesterové vazby. (I) vazba fosfátu na centrální kov, (II) aktivace nukleofilu koordinací na kov, (III) aktivace odstupující skupiny, (IV) nepřímá aktivace molekuly vody, (V) koordinace molekuly vody a (VI) elektrostatická interakce mezi centrálním iontem a fosfátem.

Využívaný ion kovu musí mít vysokou hustotu náboje a jeho koordinační okolí by mělo být stabilní. Při vývoji umělých nukleáz založených na makrocyclických polyaminech jsou využívány jak ionty přechodných kovů, tak i lanthanoidů, jako například Cu(II), Zn(II), Ln(III), nebo Eu(III).⁴⁸

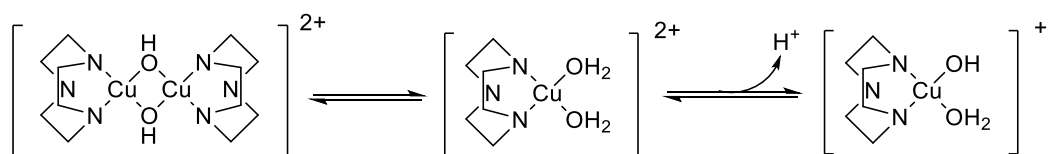
1.3.2 Výzkum syntetických nukleáz

Důvodů pro výzkum umělých nukleáz lze najít mnoho. Přirozené nukleázy štěpí DNA na krátké sekvence obsahující 4–8 bází. Tímto způsobem je získáno velké množství fragmentů, které je obtížné od sebe dělit. Umělé nukleázy by mohly být navrženy tak, aby štěpily delší sekvence. Praktický význam by měly sekvence obsahující cca 15 bází, které by bylo snadné oddělovat. Dále by umělé nukleázy mohly rozeznávat charakteristické struktury, jako například levotočivé helixy v DNA, a mohly by tak napomáhat k určování třidimenzionální struktury. Vývojem nukleáz cílících přímo na bakteriální či virové struktury v DNA a RNA je možné vyvíjet anti-infekční léčiva. Dalším důvodem pro výzkum je lepší porozumění samotnému mechanismu hydrolyzy.^{49,52}

Při navrhování nových syntetických nukleáz je třeba, aby byly schopny snižovat aktivační energii štěpení. K tomu může docházet například snížením vzdálenosti mezi reaktanty, nebo pomocí acidobazické katalýzy. Inspiraci je možné přebírat z přírody, a tak

co nejvíce mimikovat přirozené kovy ať už velikostí hustoty náboje, tak acidobazickými vlastnostmi či ionizačním potenciálem.^{49,52}

Velký potenciál pro hydrolytickou aktivitu vykazují komplexy makrocyclických polyaminů, do kterých je koordinován ion Cu(II). Jednou z výhod mědi je, že za fyziologických podmínek může tvořit oxidačně-redukční systém Cu(II)/Cu(I). Další výhodou je, že komplexy mědi jsou dle Irvingovy–Williamsovy řady vysoce stabilní.⁵³ Často jsou zkoumány například komplexy derivátů 1,4,7-triazacyklononanu (tacn), např. modelový $[\text{Cu}(\text{tacn})(\text{OH})(\text{OH}_2)]^+$. Tento komplex je v dimerické formě inaktivní. Mechanismus štěpení fosfodiesterové vazby je podmíněn přeměnou na monomerní strukturu. Při této přeměně dochází ke změně celkových nábojů komplexu, jak znázorňuje Obrázek 12.⁵²



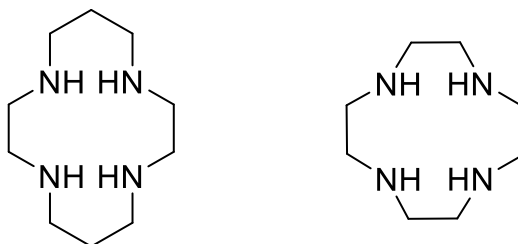
Obrázek 12: Přeměna inaktivní dimerní formy komplexu na monomerní jednotku $[\text{Cu}(\text{tacn})(\text{OH})(\text{OH}_2)]^+$, která je schopna štěpit fosfodiesterovou vazbu.

1.4 Měď a její vlastnosti

Měď je kov řadící se mezi přechodné kovy a společně se stříbrem a zlatem patří mezi ušlechtilé kovy. Stabilní elektronová konfigurace valenční vrstvy je $4s^1 3d^{10}$. Běžné oxidační stavy mědi jsou I a II, z nichž typičtější a stálejší je oxidační číslo II. Velmi vzácná, avšak v koordinačních sloučeninách zaznamenaná, jsou oxidační čísla III a IV. Měď má celkem velké množství izotopů, z nichž základními a potenciálně medicínsky využitelnými radioizotopy jsou ^{60}Cu , ^{61}Cu , ^{62}Cu , ^{64}Cu a ^{67}Cu , jejichž vlastnosti jsou shrnuty v kapitole 1.2.2. Ve vodných roztocích může tvořit měď koordinační sloučeniny v oxidačních stavech I, II a III. Dominují ovšem komplexy obsahující Cu(II).

Diamagnetický ion Cu(I), který má konfiguraci valenční vrstvy $3d^{10}$, patří dle konceptu „hard and soft acids and basis“ (HSAB) mezi měkké lewisovské kyseliny. Jedná se tedy o větší ion, který je snadno polarizovatelný. Mezi preferované ligandy patří P- a S-donory, jako jsou fosfíny či thioláty a thioestery, běžné ligandy jsou ale i alkeny či jodidy. Nejběžnějším koordinačním číslem je 4 a preferovaná je tvorba tetraedrického okolí, vyskytují se však i komplexy trikoordinované.^{54,55}

Měď v oxidačním stavu Cu(II) má konfiguraci $3d^9$, jedná se tedy o paramagnetický ion. Dle konceptu HSAB je řazen do přechodné skupiny. Nejběžnějšími ligandy jsou *N*- a *O*- donorové ligandy, jako například aminy, iminy či ligandy obsahující amidické nebo karboxylové funkční skupiny. Velmi silnou vazbu vykazuje Cu(II) právě s dusíkatými ligandy, proto je populární komplexace iontu do polyazamakrocyklů, při níž je průběh navázání usnadněn makrocyclickým efektem, tj. preorganizací ligandu. S přihlédnutím k velikosti iontu jsou nejčastěji využívány dva makrocykly – dvanáctičlenný 1,4,7,10-tetraazacyklododekan (cyclen) a čtrnáctičlenný 1,4,8,11-tetraazacyklotetradekan (cyclam), viz *Obrázek 13*.

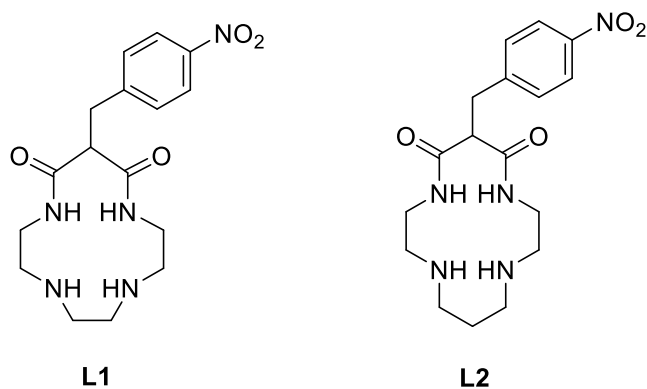


Obrázek 13: Struktura cyclamu (vlevo) a cyclenu (vpravo).

Běžná koordinační čísla jsou 4, 5 a 6. Koordinační geometrie je tak různorodá a liší se dle ligandu. V koordinačních sloučeninách Cu(II), v nichž má měď stabilní konfiguraci d^9 je tvar typicky ovlivněn Jahnovým–Tellerovým efektem. U oktaedrických komplexů tak dochází především k prodloužení axiálních vazeb. Méně symetrické komplexy ve tvaru trigonální bipyramidy a čtvercové pyramidy mají orbitály vhodně rozštěpené i bez uplatňování Jahnova–Tellerova efektu.^{55,56}

1.5 Cíl práce

Cílem bakalářské práce je příprava dvou nasycených makrocyclických amidických ligandů **L1** a **L2** (viz *Obrázek 14*). Makrocyclické ligandy jsou navrženy tak, aby při komplexaci mědi docházelo k deprotonizaci amidických skupin a výsledné komplexy tak byly elektroneutrální. Velikost makrocyclických kruhů je volena tak, aby výsledné systémy po koordinaci mědi byly ekvatoriální. Takovéto komplexy by měly mít vhodné vlastnosti pro prostup skrz plasmatickou membránu což by umožňovalo jejich využití v PET. Zároveň by díky koordinační nenasycenosti mohly vykazovat hydrolázovou aktivitu, což by mohlo být využito k ochraně povrchů implantátů před vznikem bakteriálních biofilmů. V syntéze bude využita cyklizační reakce a bude studován templátový efekt vybraných nepřechodných i přechodných kovů.



Obrázek 14: Navržené ligandy L1 a L2.

2 Experimentální část

2.1 Seznam použitých chemikálií

Pro přípravu veškerých sloučenin byly využity komerčně dostupné chemikálie. Tyto chemikálie byly dodány firmami Sigma-Aldrich, Penta, Fluka, Lachema, Lachner, VWR chemicals či Apolllo scientific.

2.2 Metody charakterizace

2.2.1 NMR spektroskopie

Spektra ^1H měřená v průběhu syntézy byla naměřena na přístroji VarianVNMRS300. Charakterizační ^1H a ^{13}C spektra a 2D experimenty byly měřeny na přístroji Bruker Avance III 600 MHz Mgr. Filipem Kouckým. Veškerá spektra byla zpracována v programu MestReNova x64.

2.2.2 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie spojená s hmotnostní spektrometrií

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) je spojená s detekcí pomocí hmotnostní spektrometrie (MS) a UV-VIS spektroskopií. Pro detekci byly využívány obě metody. Pro měření byl využit přístroj Waters ACQUITY QDa. Ionizaci byla provedena technikou ortogonálního elektrospreje s ionizací za atmosférického tlaku. Detekce byla prováděna pomocí kvadrupólového analyzátoru s rozsahem 50–1250 m/z . Vzorky byly připravovány v MeOH. Při měření HPLC byla využívána kolona Cortecs C18 2,7 μm 4,6x50 mm Column. Pro měření byla využívána metoda s gradientem acetonitril:voda s přídavkem

1 % trifluoroctové kyseliny (MeCN:H₂O) trvající 5 minut (iniciace: 95 % H₂O a 5 % MeCN, 1-3,5 minuty: postupné zvyšování na 100 % MeCN, 4. minuta: 100% MeCN, 5. minuta: 95% H₂O a 5 % MeCN).

2.2.3 Tenkovrstvá chromatografie

Pro tenkovrstvou chromatografii (TLC) byly použity silikagelové destičky TLC Aluminum plates Silica F254 komerčně dostupné od firmy VWR chemicals. Vizualizace byla prováděna pomocí činidla ninhydrin (0,5% roztok v ethanolu) a za pomoci UV lampy poskytující světla o vlnové délce 254 a 366 nm.

2.2.4 RTG difrakce

Krystalová struktura byla naměřena RNDr. Ivanou Císařovou, CSc., na difraktometru Bruker D8 VENTURE Kappa Duo PHOTON100 za použití záření o vlnové délce MoK_α ($\lambda = 0,71073 \text{ \AA}$) při teplotě 120 K. Dopřesnění krystalové struktury bylo provedeno školitelem. Experimentální údaje jsou uvedeny v *Tabulce 3*.

Tabulka 3: Experimentální parametry stanovené krystalové struktury.

Sloučenina	2-[(4-nitrofenyl)methyl]- 1,3-propandiol
Vzorec	$\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{NO}_4$
M_r	211,21
Krystalová soustava	Ortorombická
Prostorová grupa	$P2_12_12_1$
$a / \text{\AA}$	4,9568(2)
$b / \text{\AA}$	6,2411(3)
$c / \text{\AA}$	32,1041(13)
$\alpha / ^\circ$	90
$\beta / ^\circ$	90
$\gamma / ^\circ$	90
$U / \text{\AA}^3$	993,17(7)
Z	4
Nezávislé reflexe	2024
Pozorované reflexe	2024
$R(I > 2\sigma(I))$	0,0264
R'	0,0264
$wR(I > 2\sigma(I))$	0,0658
wR'	0,0658

2.3 Syntetická část

2.3.1 Obecné schéma práce

Schéma 1 znázorňuje přípravu navržených amidických makrocyclických ligandů – sloučeniny **L1** a **L2**. Výchozí látky pro přípravu jsou dimethyl(4-nitrobenzyl)malonát (**1a**) či diethyl(4-nitrobenzyl)malonát (**1b**), které při reakci kondenzují s triethyltetraaminem (**3**) či *N,N'*-bis(2-aminoethyl)-1,3-propanaminem (**6**).

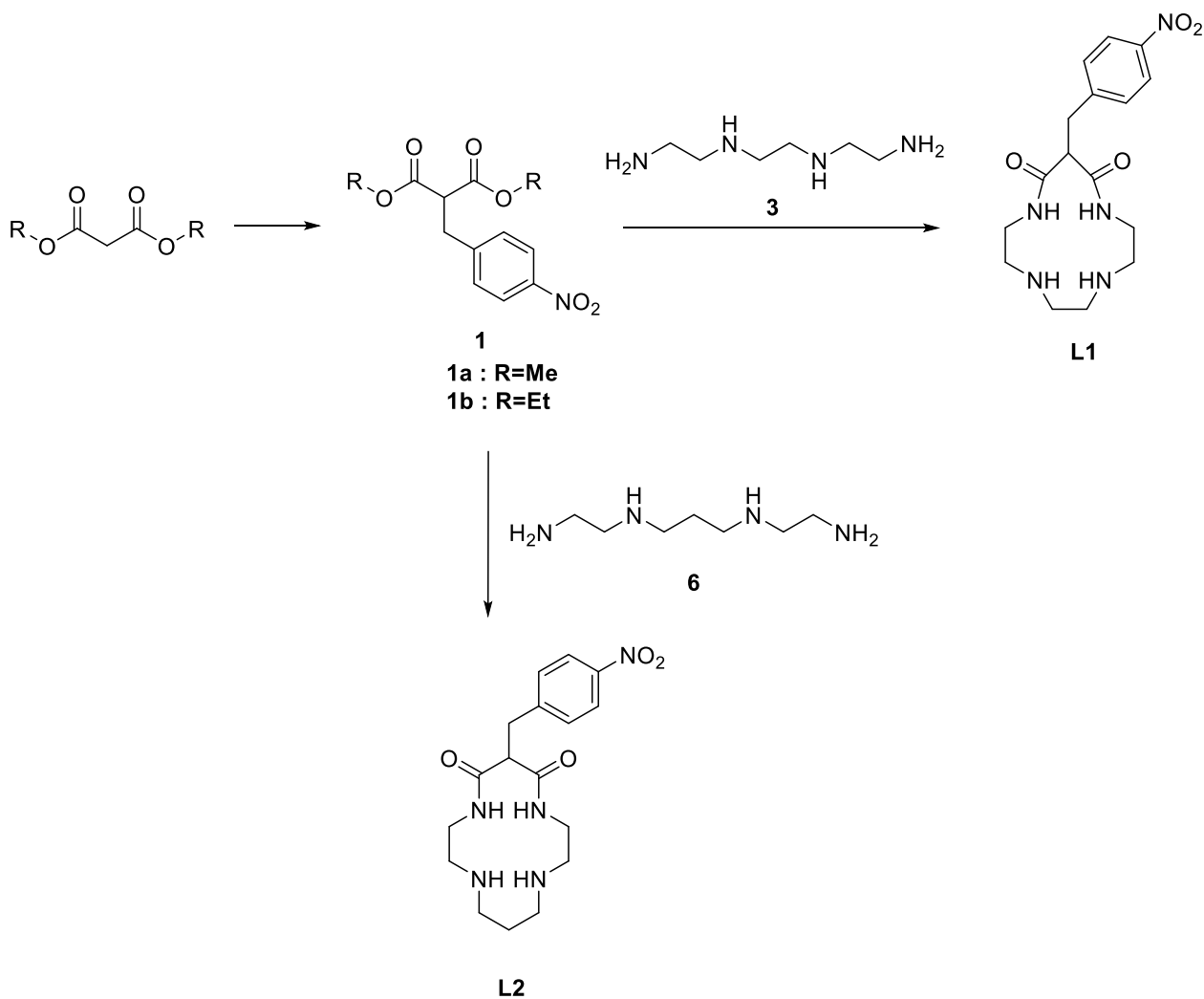
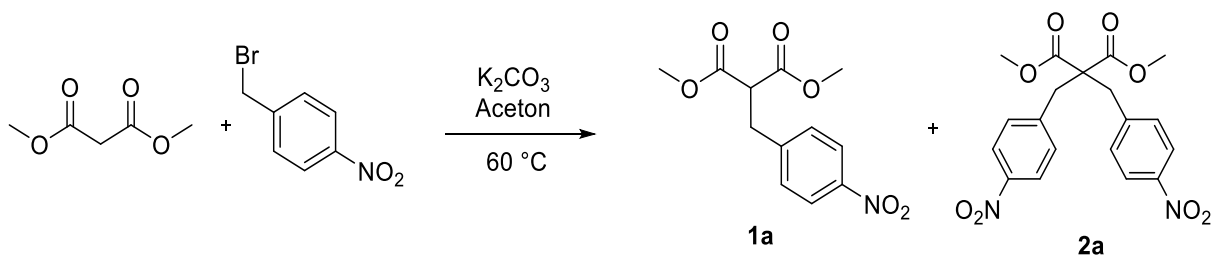


Schéma 1: Obecné schéma přípravy navržených ligandů **L1** a **L2**.

2.3.2 Příprava dimethyl(4-nitrobenzyl)malonátu (1a)

2.3.2.1 Metoda A: využití K_2CO_3 jako báze



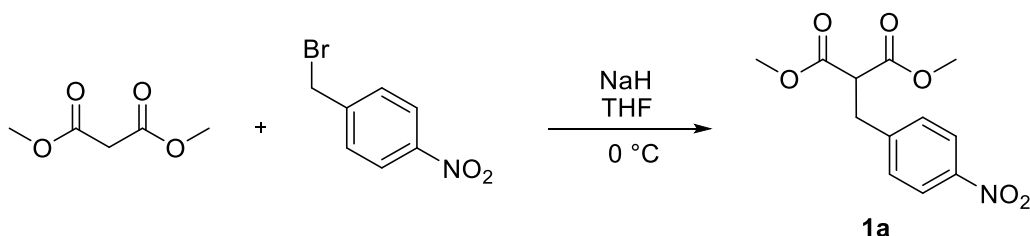
Syntéza byla inspirována publikovaným postupem.⁵⁷ Navážky 2,00 g 4-nitrobenzylbromidu (9,26 mmol, 1 ekv.), 2,57 g dimethylmalonátu (18,5 mmol, 2 ekv.) a 6,15 g K_2CO_3 (46,3 mmol, 5 ekv.) byly míchány v 5 ml acetonu v 50ml baňce. Reakční směs byla zahřívána při teplotě $60\text{ }^\circ\text{C}$ pod zpětným chladičem po dobu 1 hodiny. Následně byla provedena filtrace přes fritu S3 a kapalná fáze byla odpařena na RVO. Odparek byl rozpuštěn v hexanu za přidání minimálního množství tetrahydrofuranu (THF) a směs byla ponechána krystalizovat přes noc v lednici. Získané krystaly byly charakterizovány pomocí NMR jako *bis*-produkt (2a). Matečný louh byl následně odpařen na RVO, odparek byl rozpuštěn v 35 ml ethyl-acetátu (EtOAc) a byla provedena extrakce 3x35 ml nasyceným roztokem NaCl. Organická fáze byla odpařena na RVO a odparek byl následně ponechán rekrystalizovat z hexanu. Byl získán opět pouze produkt 2a a chtěný *mono*-produkt (1a) nebyl izolován.

Výtěžek: 0,96 g (13 %) látky 2a

$^1\text{H NMR}$ (299 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 8,19$ ppm (d, 4H); 7,42 ppm (d, 4H); 3,69 ppm (s, 6H); 3,34 ppm (s, 4H)

TLC: $CHCl_3$; $R_f = 0,7$ (UV)

2.3.2.2 Metoda B: využití NaH jako báze



Příprava byla prováděna dle publikovaného postupu.⁵⁸ Navážka 2,87 g NaH (0,12 mol, 2 ekv.) byla rozpuštěna ve 100 ml THF. Za stálého míchání a chlazení v ledové lázni bylo přikapáno 10 ml dimethylmalonátu (0,09 mol, 1,5 ekv.). K reakční směsi byla přidána

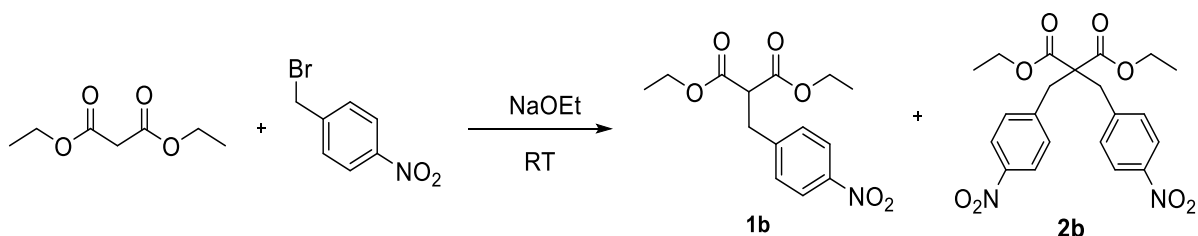
rozmíchány v 5 ml acetonu. Reakční směs byla zahřívána k varu (60 °C) pod zpětným chladičem po dobu 1 h. Následně byla reakční směs odpařena na RVO. Odparek byl extrahován v hexanu a ponechán krystalizovat v lednici přes noc. Vzniklé krystaly byly odsáty na fritě S2. Vznikající produkt byl charakterizován pomocí NMR jako *bis*-produkt (**2b**).

Výtěžek: 1,26 g (32 %) látky **2b**

¹H NMR (299 MHz, CDCl₃): δ = 8,18 ppm (m, 4H); 7,37 ppm (m, 4H); 4,14 ppm (q, 4H, ³J_{HH} = 7,0 Hz); 3,33 ppm (s, 4H); 1,19 ppm (t, 6H, ³J_{HH} = 7,1 Hz)

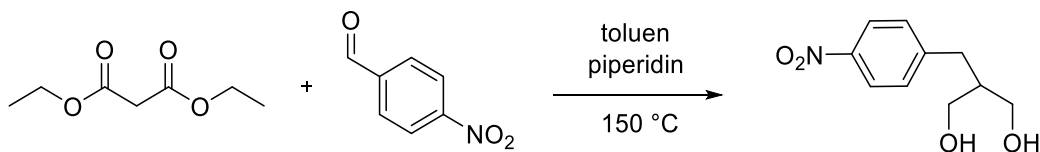
TLC: CHCl₃; R_f = 0,8 (UV)

2.3.3.2 Metoda B: využití ethanolátu sodného jako báze

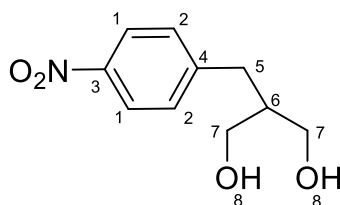


Byl připraven ethanolát sodný (NaOEt). Navážka 0,22 g (9,25 mmol, 6,6 ekv.) kovového sodíku byla přidávána pod inertní atmosférou (argon) do 50 ml EtOH. Aparatura byla opatřena chlorkalciovou trubičkou a reakční směs byla ponechána míchat. Do NaOEt byla nakapána navážka 3,2 g diethylmalonátu (2,00 mmol, 1,5 ekv.) a reakční směs byla míchána po dobu 30 minut. Dále byla přidána navážka 3,00 g 4-nitrobenzylbromidu (1,39 mmol, 1 ekv.) a směs byla ponechána míchat přes noc. Druhý den byla reakční směs odpařena na RVO, odparek byl rozpuštěn ve 35 ml ethylacetátu (EtOAc) a byla provedena extrakce 3x35 ml nasyceným vodným roztokem NaCl. Organická fáze byla odpařena na RVO. Odparek byl rozpuštěn v hexanu a byl ponechán krystalizovat v lednici přes noc. Krystaly byly odsáty na fritě S3 a byly charakterizovány pomocí NMR jako *bis*-produkt (**2b**). Charakterizace byla identická jako v Metodě A.

2.3.3.3 Metoda C: příprava vycházející z 4-nitrobenzylaldehydu



Příprava vychází z publikovaného postupu,⁶¹ který byl upraven. Navážka 1,0 g 4-nitrobenzylaldehydu (6,60 nmol, 0,95 ekv.) byla vpravena do 100ml slzovité baňky a byla rozpuštěna ve 40 ml toluenu. Dále byla přikapána navážka diethylmalonátu o hmotnosti 1,12 g (6,90 nmol, 1 ekv.). K baňce byl připevněn Deanův–Starkův nástavec opatřený chlorkalciovou trubičkou a zpětným chladičem a byla tepelně izolována pomocí alobalu. Reakční směs byla zahřívána v lázni vyhřáté na 150 °C do druhého dne. Následně bylo přikapáno katalytické množství piperidinu 0,29 g (0,39 nmol, 0,05 ekv.) a reakční směs byla zahřívána po dobu 24 hodin. Reakční směs byla odsáta na RVO. Dále byla provedena redukce vznikajícího meziproductu. Odparek byl rozpuštěn v 9,7 ml EtOH a za stálého míchání byl přidáván NaBH₄ (0,29 g, 7,65 nmol, 1,1 ekv.), směs byla ponechána míchat a následně byla odpařena na RVO. Odparek byl rozpuštěn v 5 ml destilované vody a byla provedena extrakce 3x10 ml EtOAc. Organické fáze byly slity a vysušeny pomocí Na₂SO₄. Sušidlo bylo následně odstraněno filtrací na fritě S2 a organická fáze byla odpařena na RVO. Poté byla provedena sloupcová chromatografie (200 ml silikagel, MF hexan:EtOAc 4:1). Z reakční směsi byla izolována látka 2-[(4-nitrofenyl)methyl]-1,3-propandiol, která je zobrazena ve schématu dané přípravy a struktura byla ověřena též pomocí rentgenové strukturní analýzy.



Obrázek 16: Označení atomů produktu reakce pro NMR charakterizaci.

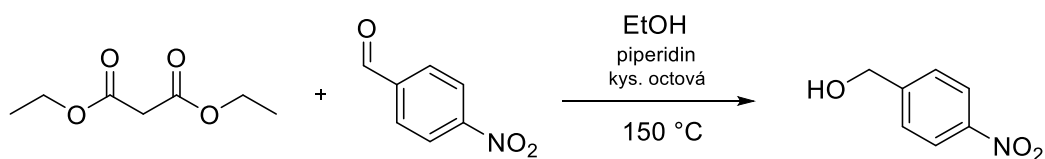
Výtěžek: 0,146 g (6 %)

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): δ = 8,17 ppm (m, 2H¹); 7,40 ppm (m, 2H²); 3,83-3,69 ppm (m, 4H⁷); 3,50 ppm (s, 2H⁸); 2,82 ppm (d, 4H⁵, ³J_{HH} = 7,6 Hz); 2,05 ppm (m, 2H⁶)

¹³C NMR (151 MHz, CDCl₃): δ = 148 ppm (2C^{3/4}); 146 ppm (2C^{3/4}); 129 ppm (4C^{1/2}); 123 ppm (4C^{1/2}); 65 ppm (4C⁷); 44 ppm (2C⁵); 34 ppm (2C⁶)

TLC: EtOAc; R_f = 0,3 (UV)

2.3.3.4 Metoda D: příprava vycházející z 4-nitrobenzylaldehydu s využitím kyselé katalýzy

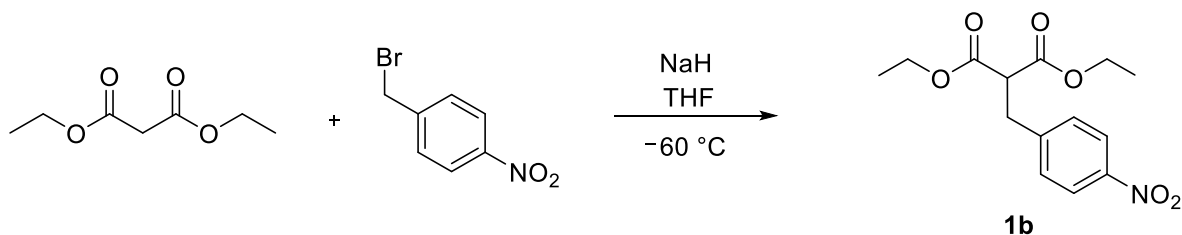


Syntéza byla prováděna dle publikovaného postupu.⁶¹ Do 50 ml baňky byla vpravena navážka 0,80 g diethylmalonátu (5,00 mmol, 1 ekv.) a bylo přidáno 20 ml EtOH. Směs byla míchána a následně bylo přidáno 0,756 g 4-nitrobenzaldehydu (5,00 mmol, 1 ekv.), 0,04 g piperidinu (0,50 mmol, 0,1 ekv.) a 0,03 g kyseliny octové (0,50 mmol, 0,1 ekv.). Reakční směs byla zahřívána na teplotu 100 °C pod zpětným chladičem přes noc. Následně byla směs odpařena na RVO za vzniku žlutého oleje, který byl rozpuštěn v 7,30 ml EtOH. Roztok byl ochlazen na 0 °C a byla přidána navážka 0,21 g NaBH₄ (5,50 mmol, 1,1 ekv.) a směs byla ponechána míchat po dobu 1 hodiny. Redukce byla ukončena přidáním 5 ml destilované vody a reakční směs byla odsáta na RVO, odparek byl rozpuštěn v destilované vodě. Byla provedena extrakce 3x10 ml EtOAc a organická fáze byla sušena pomocí Na₂SO₄. Sušidlo bylo odsáto na fritě S2 a matečný louh byl zahuštěn na RVO za vzniku žlutého oleje. Byla provedena sloupcová chromatografie (230 ml silikagel, MF EtOAc). Izolovaná frakce byla charakterizována dle NMR jako *para*-nitrobenzylalkohol.

¹H NMR (299 MHz, CDCl₃): δ = 8,26 ppm (m, 2H); 7,57 ppm (m, 2H); 4,86 ppm (s, 1H), 2,10 ppm (s, 2H)

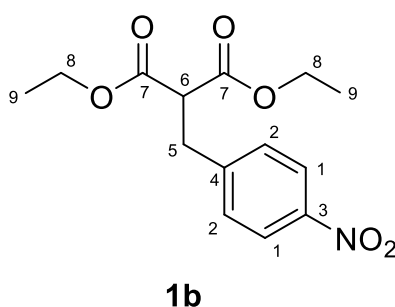
TLC: Hexan:EtOAc 4:1; R_f = 0,4 (UV)

2.3.3.5 Metoda E: využití NaH jako báze



Příprava diethyl(4-nitrobenzyl)malonátu, látky **1b**, byla inspirována publikovaným postupem,⁶⁰ avšak jako báze byl využit hydrid sodný. Navážka 4,29 g NaH (0,18 mol, 5 ekv.) byla vpravena do 100ml baňky a byla rozpuštěna v 70 ml THF. Ke směsi bylo po kapkách a za stálého míchání přidáváno 11,6 g diethylmalonátu (0,07 mol, 2 ekv.), reakční směs byla chlazená pomocí lázně se suchým ledem na teplotu -60 °C. Po ochlazení na

požadovanou teplotu byla k reakční směsi přidána navážka 7,82 g 4-nitrobenzylbromidu (0,04 mol, 1 ekv.) rozpuštěná v 10 ml THF. Směs byla ponechána míchat při laboratorní teplotě přes noc. Z reakční směsi byl přes fritu S3 odfiltrován pevný podíl a následně byla reakční směs odpařena na RVO a odparek byl rozpuštěn v 50 ml EtOAc. Byla provedena extrakce nasyceným roztokem NaCl (3x30 ml). Organická fáze byla odsáta na RVO. Následně byl odparek extrahován ve vroucím EtOH, zbývající pevný podíl byl odsát přes fritu S2. Filtrát byl ponechán krystalizovat v lednici po dobu dvou dní. Vzniklé jehlicovité nažloutlé krystaly látky **1b** byly získány odsátím přes fritu S3. Filtrát byl zahuštěn a ponechán krystalizovat, produkt **1b** byl opět izolován.



Obrázek 17: Označení atomů látky **1b** pro NMR charakterizaci.

Výtěžek: 2,35 g (81 %) látky **1b**

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): δ = 8,16 ppm (m, 2H¹); 7,41 ppm (d, 2H², ³J_{HH} = 8,3 Hz); 4,02 ppm (m, 4H⁸); 3,68 ppm (t, 1H⁶, ³J_{HH} = 7,8 Hz); 3,33 ppm (d, 2H⁵, ³J_{HH} = 7,8 Hz); 1,25 ppm (t, 6H⁹, ³J_{HH} = 7,1 Hz)

¹³C NMR (151 MHz, CDCl₃): δ = 168,25 ppm (2C⁷); 146,98 ppm (1C³); 145,64 ppm (1C⁴); 129,84 ppm (2C^{1/2}), 123,75 ppm (2C^{1/2}); 61,82 ppm (2C⁸); 53,12 ppm (1C⁶); 34,32 ppm (1C⁵); 14,01 ppm (2C⁹)

TLC: Hexan:EtOAc 4:1; R_f = 0,9 (UV)

2.3.4 Čištění komerčně dostupného 1,4,7,10-tetraazadekanu (**3**)

Výchozí látka 1,4,7,10-tetraazadekanu (**3**) je komerčně dostupná, avšak průmyslově připravený produkt obsahuje značný podíl nečistot a vodu, a proto bylo potřeba provést čisticí operace.

Byla provedena vakuová frakční destilace, tlak v aparatuře se pohyboval mezi 14-20 mbar. Olejová lázeň byla vyhřívána nejdříve na teplotu 100 °C, poté byla teplota zvýšena na teplotu 200 °C. Do 100 ml baněk bylo jímáno pět frakcí. Frakce 3 a 4 byly

jímány při teplotě varu 149–152 °C a dle NMR byly téměř shodné, proto byly spojeny a byly s nimi provedeny další čisticí operace. Tyto frakce obsahovaly znečištěný 1,4,7,10-tetraazadekan, množství nečistot (tris(aminoethyl)aminu) odpovídalo 15 %.

$^1\text{H NMR}$ (299 MHz, CDCl_3): $\delta = 2,72\text{--}2,60$ ppm (t, 4H, $^3J_{\text{HH}} = 5,8$ Hz); 2,57 ppm (s, 4H); 2,52–2,48 ppm (t, 4H, $^3J_{\text{HH}} = 5,8$ Hz); 1,13 ppm (s, 6H)

V dalším kroku byla pro čištění využita krystalizace hydrochloridu. Získaná frakce 1,4,7,10-tetraazadekanu byla zahuštěna na RVO. Následně byla za stálého míchání přikapána směs HCl:EtOH v poměru 1:10. Do druhého dne se vytvořila nažloutlá sraženina. Sraženina obsahující nečistoty byla z výchozí látky odstraněna filtrací přes fritu S4. Filtrát byl zahuštěn na RVO a převrstven diethyletherem, dále byla přikapána 37% HCl. Vysrážený hydrochlorid byl odsát na fritě S4. Do zbylého filtrátu byla opět přikapána koncentrovaná HCl a byla prováděna rekrystalizace.

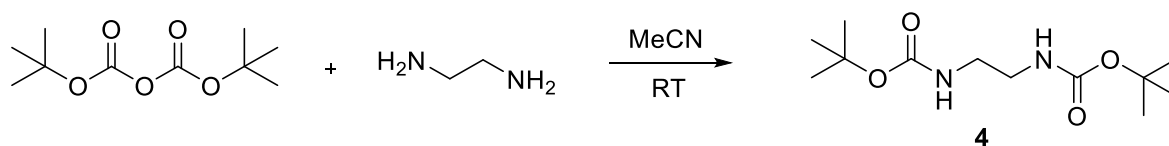
Frakce hydrochloridu 1,4,7,10-tetraazadekanu získané tímto způsobem byly rozpuštěny v destilované vodě a byla přikapána koncentrovaná HCl do zákalu. Baňka byla uložena do lednice a byla provedena rekrystalizace. Vzniklá sraženina byla izolována na fritě S4 a charakterizována pomocí NMR. Bylo zjištěno, že takto připravený hydrochlorid látky **3** obsahuje 6 % nečistot.

$^1\text{H NMR}$ (299 MHz, D_2O): $\delta = 3,47$ ppm (s, 4H); 3,44–3,39 ppm (ddd, 4H, $^3J_{\text{HH}} = 7,6$; 6,1; 1,2 Hz); 3,34–3,29 (ddd, 4H, $^3J_{\text{HH}} = 7,7$; 6,2; 1,2 Hz)

Pro získání 1,4,7,10-tetraazadekanu byla využita iontová chromatografie. Byl využit anex (Dowex 1 – 75 g), který byl aktivován v cyklu HCl:EtOH 1:10 a 5% roztokem NaOH v EtOH. Navážka 2,00 g hydrochloridu byla vpravena na anex uvedený do OH^- cyklu a volný amin byl z kolony vymyt destilovanou vodou. Izolovaný produkt byl odsát na RVO. Tento postup byl opakován třikrát. Připravená látka **3** byla charakterizována pomocí NMR.

$^1\text{H NMR}$ (299 MHz, CDCl_3): $\delta = 2,51\text{--}2,45$ ppm (m, 4H); 2,43 ppm (s, 4H); 2,39–2,34 ppm (t, 4H, $J_{\text{HH}} = 5,69$ Hz); 1,65–1,30 ppm (s, 6H)

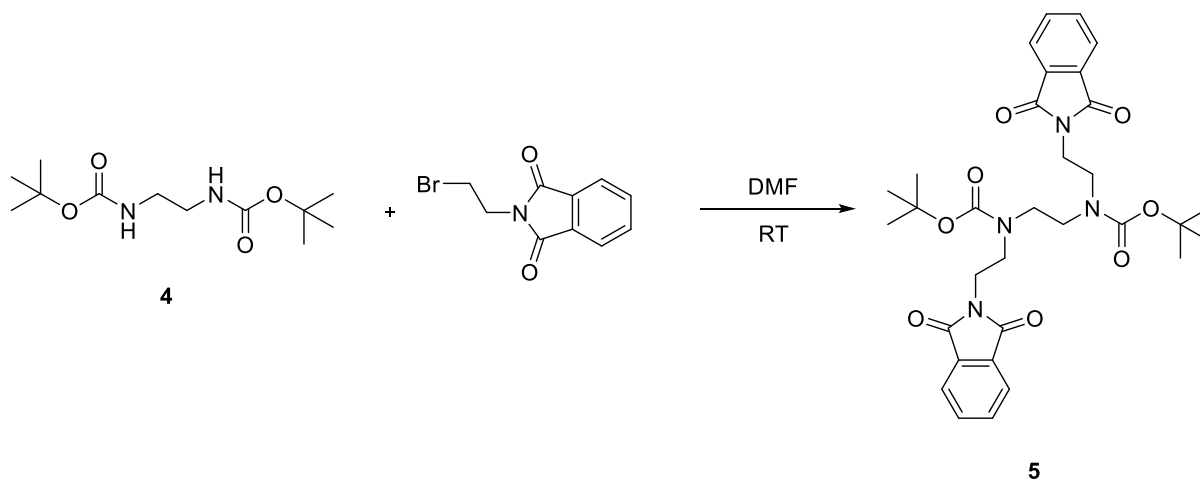
2.3.5 Příprava 1,4,7,10-tetraazadekanu (3)



V prvním kroku syntézy bylo provedeno chránění ethylendiaminu. Navážka 1,00 g ethylendiaminu (16,6 mmol, 1 ekv.) byla rozpuštěna v 20 ml acetonitrilu (MeCN). Dále byl připraven roztok 7,90 g di-*tert*-butyldikarbonátu (boc₂O) (36,6 mmol, 2,2 ekv.) ve 40 ml MeCN. Tento roztok byl za stálého míchání přikapán k ethylendiaminu pomocí přikapávací nálevky. Směs byla ponechána míchat při pokojové teplotě po dobu 3 hodin. Následně byla směs odpařena na RVO za vzniku bílého prášku.

Výtěžek: 4,1 g (95 %) látky **4**

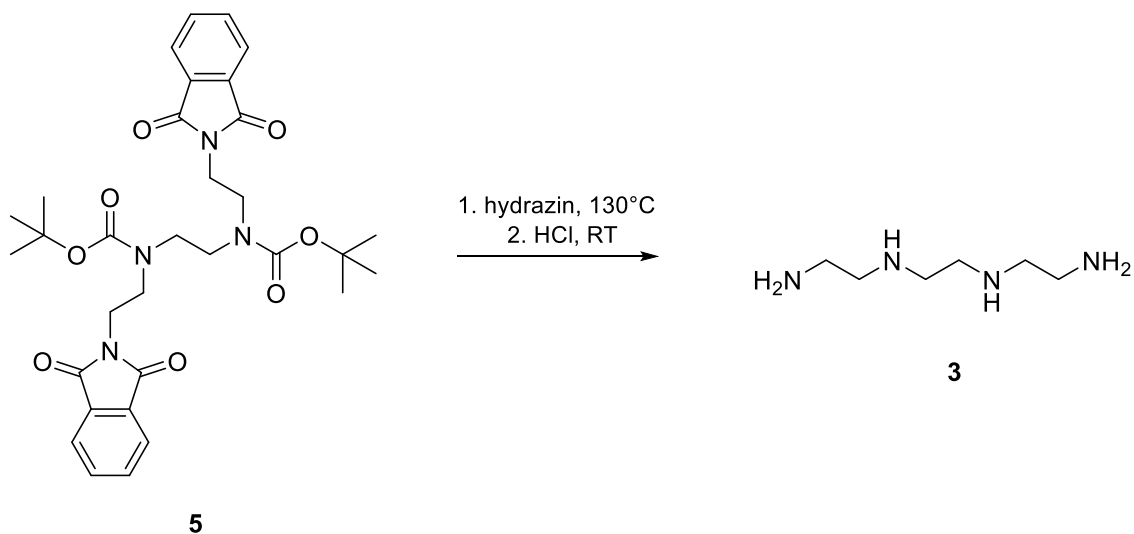
¹H NMR (299 MHz, CDCl₃): δ = 4,83 ppm (s, 2H); 3,22 ppm (s, 4H); 1,44 ppm (s, 18H)



Dále byla provedena alkylační reakce. Navážka 0,25 g látky **4** (0,9 mmol, 1 ekv.) byla rozpuštěna v 25 ml dimethylformamidu (DMF). Do reakční směsi bylo vpraveno 0,51 g *N*-(2-bromomethyl)ftalimidu (2,10 mmol, 2,15 ekv.) a za stálého míchání bylo přidáno 0,115 g NaH (0,96 mmol, 1 ekv.). Reakční směs byla ponechána míchat při pokojové teplotě po dobu dvou dní. Následně bylo rozpouštědlo odpařeno na RVO. Odparek byl rozpuštěn v 20 ml EtOAc a byla provedena extrakce 3x20 ml 10% NaOH. Organická fáze byla odpařena na RVO a byla získána látka **5**, která byla charakterizována pomocí NMR jako požadovaný produkt obsahující nečistoty.

Výtěžek: 0,35 g (63 %) látky **5**

$^1\text{H NMR}$ (299 Hz, CDCl_3): $\delta = 7,89$ ppm (d, 4H); 7,86 ppm (d, 4H); 4,14 ppm (t, 2H); 3,91 ppm (t, 2H); 3,64 ppm (t, 2H); 3,24 ppm (s, 4H); 2,01 ppm (s, 2H); 1,44 ppm (s, 18H)



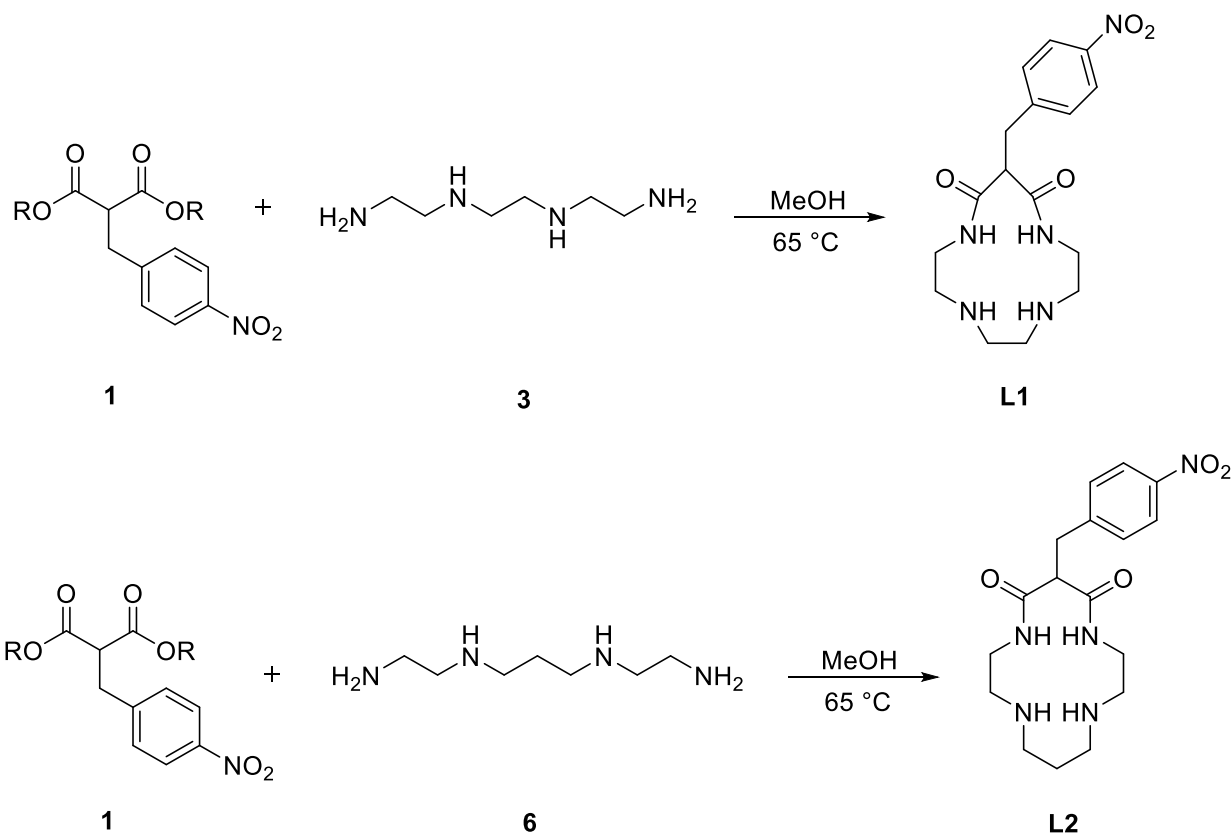
Následně bylo provedeno odštěpení ftalimidových a Boc chránících skupin. Získaný meziprodukt **5** o hmotnosti 0,35 g (0,57 mmol) byl rozpuštěn v 20 ml hydrazinu. Směs byla ponechána míchat pod zpětným chladičem při teplotě 130 °C po dobu dvou dnů. Následně byla reakční směs vychlazená a odsáta na RVO, odparek byl zalit 20 ml CHCl_3 a zfiltrován přes fritu S3. Směs byla opět odsáta na RVO a odparek byl zalit 37% HCl. Směs byla ponechána míchat při pokojové teplotě po dobu dvou dnů. Po odpaření byla získána růžová práškovitá látka. Byla provedena sloupcová chromatografie (100 ml silikagel, MF NH_3 :EtOH 1:5). Charakterizace byla provedena pomocí NMR.

Výtěžek: 0,06 g (66 %) látky **3**

$^1\text{H NMR}$ (299 MHz, D_2O): $\delta = 3,54$ ppm (t, 4H); 3,39 ppm (s); 3,20 ppm (t)

TLC: NH_3 :EtOH 1:5; $R_f = 0,8$ (Ninhydrin)

2.3.6 Cyklizační reakce



Pro získání makrocyclických ligandů **L1** a **L2** je třeba provést cyklizační reakce. Tyto reakce byly provedeny nejdříve pouze s výchozími látkami **1a** či **1b** a aminem **3**. Následně byl proveden screening reakcí, ve kterých byly využity soli kovů a byl zkoumán jejich templátový efekt. Na základě screeningu byl pro další reakce vyhodnocen jako vhodný draselný ion, a proto byl využit v dalších reakcích. Všechny uvedené reakce byly v jejich průběhu sledovány za využití HPLC-MS.

2.3.6.1 Cyklizace látky **1a** a 1,4,7,10-tetraazadekanu (**RC_1**)

Syntéza byla inspirována publikovaným postupem.⁶⁰ Navážka 0,87 g (3,95 mmol, 1,5 ekv.) látky **1a** a 0,5 g (2,60 mmol, 1 ekv.) látky **3** byly rozpuštěny v 25 ml MeOH. Pro přípravu byla využita látka **3** získaná dle postupu 2.3.4. Reakční směs byla míchána a zahřívána na 60 °C po dobu 21 dnů). Následně byla reakční směs odpařena na RVO.

Pomocí MS/HPLC byla charakterizována reakční směs, ve které byl nalezen signál příslušící produktu **L1**. Pro separaci vznikajícího cyklu z reakční směsi byla zvolena krystalizace. Reakční směs byla odpařena na RVO a získaný odparek byl rozpuštěn

v absolutním EtOH, směs byla zahřáta k varu a následně ponechána krystalizovat. Krystalizace nebyla úspěšná a produkt nebyl izolován.

MS(+): 350,26 [L1+H]⁺

HPLC: $t = 5,48$ min (gradient MeCN:H₂O: $t = 15$ min, iniciace: 95 % H₂O a 5 % MeCN, 1-13,5 minuty: postupné zvyšování na 100 % MeCN, 14. minuta: 100% MeCN, 15. minuta: 95% H₂O a 5 % MeCN)

2.3.6.2 Cyklizace látky **1b** a 1,4,7,10-tetraazadekanu (**RC_2**)

Syntéza byla prováděna dle publikovaného postupu.⁶⁰ Navážky 1,96 g (7,84 mmol, 1,5 ekv.) látky **1b** a 0,98 g (5,10 mmol, 1 ekv.) látky **3** byly rozpuštěny v 25 ml methanolu (MeOH). Pro přípravu byla využita látka **3** získaná dle 2.3.4. Reakční směs byla ponechána míchat po dobu dvou dní pod zpětným chladičem při 65 °C. Následně byla směs ponechána míchat dalších 19 dní bez zpětného chladiče pouze při zahřívání na teplotu pod bodem varu (60°C). Reakční směs byla odpařena na RVO. Požadovaný produkt **L1** nebyl při charakterizaci reakční směsi pomocí MS/HPLC pozorován.

2.3.6.3 Screening templátového efektu kovových iontů

Vždy bylo naváženo 0,10 g (0,456 mmol, 1 ekv.) komerčně připravené výchozí látky **3**·2HCl, 0,12 g (0,456 mmol, 1 ekv.) látky **1a** a 0,14 g (0,456 mmol, 1 ekv.) látky **1b**. Dále byly naváženy soli příslušných kationtů kovů (0,456 mmol, 1 ekv.). Navážky výchozích látek byly smíchány v 4 ml vialkách a rozpuštěny ve 2,5 ml MeOH. Celkem tak bylo získáno 18 reakčních směsí. Ty byly zahřívány v kovovém bloku na teplotu 65 °C. Přesné složení reakčních směsí je popsáno v *Tabulce 4*. Po 14 dnech byl do reakčních směsí přidáván též hydroxid příslušného iontu kovu (2,5 ekv.), pro kovy, jejichž hydroxid nebyl dostupný, byl využit roztok KOH v MeOH. Zásobní roztok KOH byl připraven o definované koncentraci 7,6 mol·dm⁻³, bylo tedy rozpuštěno 1,28 g hydroxidu v 3 ml MeOH a do jednotlivých reakcí bylo přidáváno 0,15 ml připraveného roztoku.

Tabulka 4: Složení reakčních směsí využitých pro screening. Navážky využitých solí a bází, které byly v průběhu dodány.

Označení reakce	Výchozí malonát	Typ soli	$m_{\text{sůl}}$ [g]	Typ hydroxidu	$m_{\text{báze}}$ [g]
RC_3	1a	–	–	KOH	0,064
RC_3.1	1a	NaCl	0,026	NaOH	0,046
RC_3.2	1a	KCl	0,034	KOH	0,064
RC_3.3	1a	CaCl ₂	0,051	Ca(OH) ₂	0,084
RC_3.4	1a	LiCl	0,019	LiOH	0,027
RC_3.5	1a	MgCl ₂	0,043	KOH	0,064
RC_3.6	1a	CuCl ₂	0,061	KOH	0,064
RC_3.7	1a	ZnCl ₂	0,062	KOH	0,064
RC_3.8	1a	NiCl ₂	0,059	KOH	0,064
RC_4	1b	–	–	KOH	0,064
RC_4.1	1b	NaCl	0,026	NaOH	0,046
RC_4.2	1b	KCl	0,034	KOH	0,064
RC_4.3	1b	CaCl ₂	0,051	Ca(OH) ₂	0,084
RC_4.4	1b	LiCl	0,019	LiOH	0,027
RC_4.5	1b	MgCl ₂	0,043	KOH	0,064
RC_4.6	1b	CuCl ₂	0,061	KOH	0,064
RC_4.7	1b	ZnCl ₂	0,062	KOH	0,064
RC_4.8	1b	NiCl ₂	0,059	KOH	0,064

Naměřená data jsou uvedena pro reakční směs RC_2.2, jelikož templátový efekt K⁺ byl využit i v dalších reakcích. Potřebná data pro ostatní reakční směsi budou uvedeny dále v diskuzi výsledků.

MS(+): 350,27; 351,32 [L1+H]⁺

HPLC: $t = 1,69$ (gradient MeCN:H₂O)

2.3.6.4 Cyklizace látky 1b s komerčně dostupným dihydrochloridem 1,4,7,10-tetraazadekanu (RC_5)

Cyklizační reakce byla prováděna ve větším měříku. Navážky 0,50 g (2,28 mmol, 1 ekv.) látky **3**·2HCl, 0,83 g (2,28 mmol, 1 ekv.) látky **1b** byly vpraveny do 100 ml kulaté baňky a byly rozpuštěny v 30 ml MeOH. K reakční směsi bylo přidáno 0,17 g (2,28 mmol,

1 ekv.) KCl a 0,32 g (5,70 mmol, 2,5 ekv.) KOH. Reakční směs byla ponechána míchat při teplotě 60 °C po dobu 21 dní. Pro separaci byl zvolen postup srážení chtěné látky **L1** ve formě hydrochloridu. Reakční směs byla odsáta na RVO. Odparek byl rozpuštěn v 30 ml DCM a byla provedena extrakce 3x40 ml 2,5% roztokem NaOH ve vodě. Organická fáze byla odpařena na RVO a odparek byl rozpuštěn v 5 ml absolutního EtOH. Dále byla přikapána 37% HCl do zákalu (cca 4 ml). Tímto způsobem nevznikala sraženina, proto byla směs odpařena na RVO a srážení bylo opakováno. Odparek byl rozpuštěn v 5 ml vysušeného THF a byla přidána 37% HCl do zákalu (cca 3 ml), směs byla ponechána stát do druhého dne. Vzniklá sraženina byla z roztoku separována centrifugací. Kapalná fáze byla odebrána Pasteurovou pipetou a vznikající sraženina byla na vzduchu vysušena. Kapalná fáze byla odsáta na RVO a postup srážení a centrifugace byl zopakován. Sraženina byla charakterizována pomocí MS/HPLC a NMR. Izolovaná látka byla určena jako látka **2b** přítomná patrně jako stopová nečistota ve vstupní látce **1b**.

¹H NMR (299 MHz, CDCl₃): δ = 8,81 ppm (m, 4H); 7,36 ppm (dd, 4H); 4,13 ppm (k, 4H); 3,33 ppm (s, 4H); 1,16 ppm (t, 6H)

MS(+): 350,31 [L1+H]⁺

HPLC: $t = 1,63$ min (gradient MeCN:H₂O)

2.3.6.5 Cyklizace látky **1a** s *N,N'*-bis(2-aminoethyl)-1,3-propanaminem (**6**) (**RC_6**)

Bylo odváženo 0,5 g (3,13 mmol, 1 ekv.) výchozí látky **6** a 0,92 g (3,13 mmol, 1 ekv.) látky **1b**. Navážky byly rozpuštěny v 30 ml MeOH a do reakční směsi bylo přidáno 0,23 g (3,13 mmol, 1 ekv.) KCl. Reakční směs byla ponechána míchat po dobu 21 dní při teplotě 60 °C. Reakční směs byla odsáta na RVO. Odparek byl rozpuštěn v 30 ml DCM a byla provedena extrakce 3x40 ml 2,5% roztokem NaOH ve vodě. Pro separaci byl zvolen postup srážení chtěné látky **L2** ve formě hydrochloridu. Odparek byl rozpuštěn v 5 ml vysušeného THF a byla přidána 37% HCl do zákalu (cca 3 ml), směs byla ponechána stát do druhého dne. Vzniklá sraženina byla z roztoku separována centrifugací při 16 800 otáčkách po dobu 45 minut. Kapalná fáze byla odebrána Pasteurovou pipetou a vznikající sraženina byla na vzduchu vysušena. Kapalná fáze byla odsáta na RVO a postup srážení a centrifugace byl zopakován. Vzniklé množství sraženiny bylo nedostatečné pro charakterizaci pomocí NMR.

MS(+): 364,36; 365,41 [L2+H]⁺

HPLC: $t = 1,59$ min (gradient MeCN:H₂O)

3 Diskuze

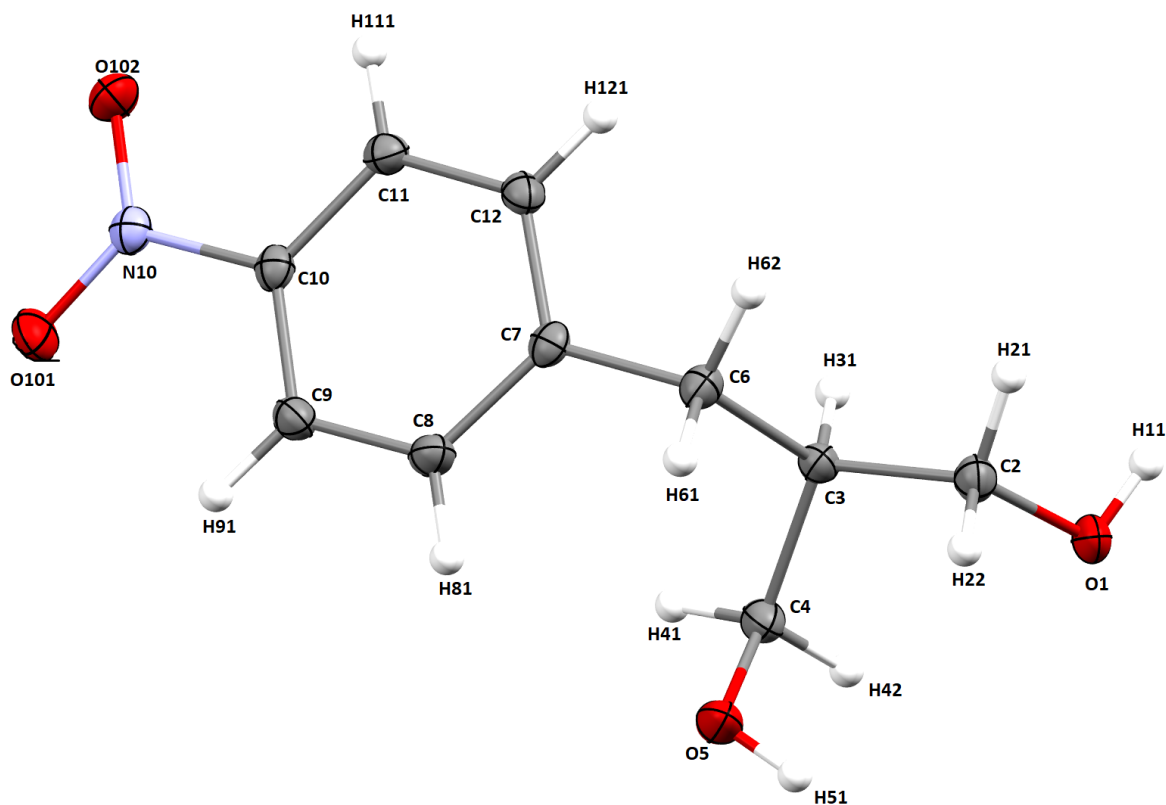
3.1 Syntéza *mono*- substituovaných malonátů

Pro syntézu *mono*- substituovaných malonátů **1a** a **1b** bylo vyzkoušeno více publikovaných metod. Dle publikací měly tyto metody slibné výtěžky, avšak mnoho z těchto syntetických cest bylo v praxi komplikováno přednostním vznikem *bis*- produktů **2a** a **2b**.

Při této reakci dochází k odtržení kyselého vodíku, který je v α pozici vůči karboxylovým funkčním skupinám, pomocí báze a následně k alkylaci této polohy 4-nitrobenzylovou skupinou pocházející z výchozí látky 4-nitrobenzylbromidu. Po substituci do prvního stupně se ovšem druhý vodík stává značně kyselejším a je tak snadno odštěpen. Následně probíhá alkylace do druhého stupně. Kyselost druhého vodíku je způsobena přítomností nitrobenzylové skupiny, která vykazuje silný indukční elektronakceptorní efekt.

Při přípravě *mono*- substituovaného diethyl-malonátu **1b** bylo využito celkem 5 metod. Metody A, B a E využívaly jako výchozí látku 4-nitrobenzylbromid, vystupující v reakci jako alkylační činidlo. Metoda A využívala jako bázi K_2CO_3 a metoda B EtONa, ty se ukázaly být jako příliš slabé a pro syntézu nevhodné. Úspěšná byla metoda E využívající jako rozpouštědlo THF, jako bázi NaH a počáteční kroky reakce byly prováděny za intenzivního chlazení až na teplotu -60 °C. Dále bylo zjištěno, že při reakci je klíčové i pořadí, ve kterém jsou jednotlivé reaktanty smíchány. Je nutné, aby nejdříve byla k malonátu přidána báze, která odštěpí kyselý vodík, dále došlo k ochlazení a až následně bylo pomalu po částech přidáváno menší než-li stechiometrické množství 4-nitrobenzylbromidu. Výtěžek této syntézy byl vysoký a činil 81%.

Další přípravy látky **1b**, metody C a D, byly provedeny za použití 4-nitrobenzaldehydu a byla při nich využita katalýza. V případě metody C byla prováděna katalýza pouze pomocí piperidinu, syntetická cesta D využívala katalýzu piperidinem a kyselinou octovou. Při této reakci by měl vznikat intermediát obsahující dvojnou vazbu, díky čemuž není v požadované poloze volný další vodík, a tak nemůže vznikat *bis*-produkt. Následnou redukcí dvojně vazby by vznikal požadovaný produkt. Pomocí metody C byl připraven a následně vykrytalizován 2-[(4-nitrofenyl)methyl]-1,3-propandiol, v němž byly při redukčním kroku redukovány karbonylové funkční skupiny na hydroxylové. Krystalová struktura připravené sloučeniny je vyobrazena na *Obrázku 18*.



Obrázek 18: Krystalová struktura sloučeniny 2-[(4-nitrofenyl)methylu]-1,3-propandiolu.

Při přípravě metodou D byl připraven a z reakční směsi izolován především *para*-nitrobenzylalkohol, který vznikal redukcí výchozí látky *para*-nitrobenzaldehydu.

Příprava látky **1a** byla prováděna až jako druhá v pořadí a proto byla úspěšná již při druhém pokusu. Syntéza byla provedena téměř analogicky k přípravě látky **1b** syntetickou metodou E, jediným rozdílem byla vyšší teplota 0 °C. Provedením této syntézy byla připravena látka **1a** s výtěžkem 51%.

3.2 Čištění a příprava 1,4,7,10-tetraazadekanu

U komerčně dostupného 1,4,7,10-tetraazadekanu bylo zjištěno, že je značně znečištěn a obsahuje také vysoké procento vody. Proto byly pro jeho další použití navrženy čisticí operace. Frakční destilací byla získána poměrně čistá frakce, z níž byl požadovaný produkt srážen ve formě hydrochloridu. Nejdříve byl izolován tris(2-aminoethyl)amin, který byl zřejmě hlavní nečistotou. Dále izolovaný hydrochlorid 1,4,7,10-tetraazadekanu nevykazoval dostatečnou kvalitu, proto bylo třeba jej srážet opakovaně. Aby byla získána volná báze byla prováděna chromatografie na iontoměničích. Veškeré tyto kroky bylo třeba

opakovat a získat tak potřebná množství ideálně čisté látky **3** bylo ztrátové i časově náročné.

Dále byla navržena syntetická cesta (viz *Schéma 2*) pro přípravu výchozí látky **3**, která se skládala ze tří po sobě jdoucích reakčních kroků. Ty byly prováděny v návaznosti na sebe bez předchozího čištění.

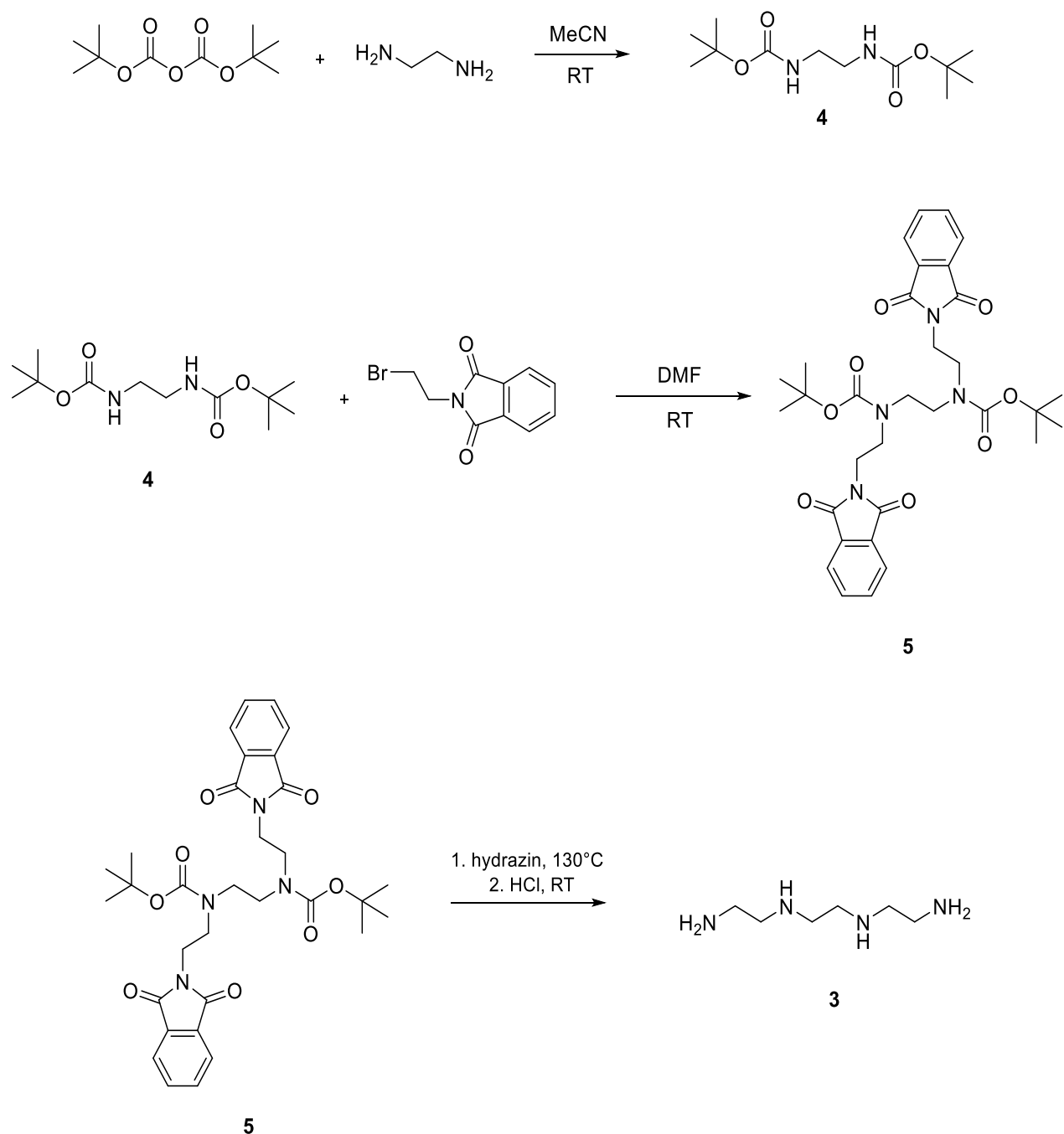


Schéma 2: Syntetická cesta pro přípravu výchozí látky 3

V prvním kroku byly substituovány aminové skupiny ethylendiaminu pomocí chránicích skupin Boc, pocházejících z Boc-oxykarboxylu. Tato reakce probíhala bez obtíží a s vysokým výtěžkem 95 % a produkt **4** byl získán ve vysoké čistotě. Druhý krok, ve kterém docházelo k alkylaci amidoskupin pomocí alkylačního činidla *N*-(2-bromethyl)ftalimidu probíhal pouze za silně bazických podmínek a sice při využití NaH, kdy jako rozpouštědlo byl zvolen DMF. Touto reakcí vznikala látka **5** s výtěžkem 63 %. V posledním kroku byla prováděna eliminace ftalimidových funkčních skupin povážením s hydrazinem. Následně byly v kyselém prostředí HCl eliminovány též chránicí *boc* skupiny. Byla získána látka **3**, avšak i přes provedení chromatografického čištění nebyl získaný produkt zcela čistý, a výtěžek lze pouze zhruba odhadnout na cca 66 %. Vliv na výsledek reakce mělo také provedení ve velmi malé škále. V naměřeném NMR spektru bylo možné nalézt signály patřící pravděpodobně ftalhydrazidu. Bylo tedy zjištěno, že navrženou syntetickou cestou opravdu lze produkt **3** připravit. Pokud by ovšem měla tato syntéza být používána bylo by třeba čištění provádět po všech reakčních krocích. Díky tomu se syntéza stává nevýhodnou jak s ohledem na reakční výtěžek, tak časově.

Z důvodů komplikací při čištění i při syntéze bylo rozhodnuto, že je nejvýhodnější zakoupit komerčně dostupný dihydrochlorid 1,4,7,10-tetraazadekanu (**3**·2HCl).

3.3 Cyklizační reakce

3.3.1 Templátový efekt kovů

Naměřená data získaná při screeningu vlivu templátového efektu rozličných kovů jsou uvedena v *Tabulce 5*.

Tabulka 5: Data naměřená z reakčních směsí při screeningu templátového efektu kovových iontů. Data byla měřena po přidavku báze, reakce probíhala po dobu 8 dní.

Označení reakce	Využitý kov	MS [3+H] ⁺	MS [3+M-H] ⁺	MS [L1+H] ⁺
RC_3	–	147,19		350,25
RC_3.1	Na		169,19	350,28
RC_3.2	K	147,19		350,24
RC_3.3	Ca		169,15	350,24
RC_3.4	Li	147,21		
RC_3.5	Mg			350,26
RC_3.6	Cu	147,15	208,16	
RC_3.7	Zn	147,19		
RC_3.8	Ni	147,19	203,15	
RC_4	–	147,19		350,26
RC_4.1	Na			350,27
RC_4.2	K	147,21		350,27
RC_4.3	Ca		169,18	350,28
RC_4.4	Li			350,27
RC_4.5	Mg			350,26
RC_4.6	Cu	147,14	208,15	
RC_4.8	Ni	147,20	203,18	

Při screeningu vlivu templátového efektu přechodných a nepřechodných kovů bylo zjištěno, že příznivý vliv pro cyklizaci vykazují kovy I. a II. skupiny periodické soustavy prvků. Tento trend je vidět z dat naměřených v reakčních směsích **RC_3.1-RC_3.5** a **RC_4.1-RC_4.5**. V těchto reakčních směsích byl přednostně pozorován chtěný produkt **L1**. V reakčních směsích, ve kterých byly využity přechodné kovy Cu a Ni, byl pozorován pouze adukt příslušného kovu a výchozí látky **3**, který je vysoce stabilní a nedochází tak k cyklizační reakci. Z naměřených dat není ovšem zcela zřejmé, zda vliv templátového

efektu reakci urychluje, jelikož chtěný produkt byl pozorován i v reakčních směsích **R_3** a **R_4**, které neobsahovaly přídavek kovu.

Dále bylo zjištěno, že cyklizační reakce neprobíhá, pokud je jako výchozí látka využit **3·2HCl**, reakci je tedy nutné provádět s přídavkem báze. Z uvedených dat se také zdá, že cyklizační reakce funguje lépe při využití výchozí látky **1a**. Substituce methylenové skupiny a tvorba amidické vazby probíhá v případě dimethyl-4-nitrobenzylmalonátu snadněji. Tento trend je způsoben snazším odstoupení methanolu než ethanolu při amidaci.

3.3.2 Cyklizace

Reakce **R_5** a **R_6** byly provedeny s přídavkem KCl a ve větším měřítku. Jako rozpouštědlo v těchto reakcích byl využit MeOH. Předpokladem bylo, že v reakčních směsích bude probíhat transesterifikace ethylesteru látky **1b** za vzniku methylesteru.

Průběh cyklizace byl sledován pomocí HPLC-MS a v reakčních směsích byla pozorována hmota odpovídající požadovaným produktům **L1** a **L2**. Pro separaci produktu bylo využito srážení ve formě hydrochloridu. Tímto způsobem bylo získáno zanedbatelné množství sraženiny, kterou bylo možné charakterizovat pomocí HPLC-MS. Při této charakterizaci bylo zjištěno, že sraženiny obsahují chtěný produkt **L1** a **L2**. V případě reakce **R_5** byla sraženina charakterizována též pomocí NMR, její spektrum, avšak odpovídalo látce **2b**, která byla jako nečistota přítomna v reaktantu **1b**. V NMR spektru byly nalezeny i signály patřící vodíkům amidické funkční skupiny, což by mohlo značit, že docházelo k částečné amidaci látky **2b**. Identitu vznikající sloučeniny nebylo možné jednoznačně určit. Dle spekter naměřených pomocí HPLC-MS je však patrné, že produkt v reakční směsi vzniká. Reakční směs je ovšem velmi bohatá a vznikající ligandy **L1** a **L2** jsou její minoritní složkou.

4 Závěr

V rámci bakalářské práce byla optimalizována metoda pro přípravu mono-substituovaných *para*-nitrobenzylmalonátů **1a** a **1b**. Dály byly provedeny cyklizační reakce, kterými měly být připraveny navržené ligandy **L1** a **L2**. Bylo ověřeno že v reakční směsi vznikají, avšak nebyly izolovány. Příprava těchto ligandů a následně jejich komplexů tak bude předmětem diplomové práce.

5 Seznam použitých zkratek

[¹⁸ F]–FDG	¹⁸ F-2-fluor-2-deoxyglukóza
[⁶⁴ Cu]ATSM	⁶⁴ Cu-diacetyl-bis(N4-metylthiosemikarbazon)
¹¹ C-MP4A	<i>N</i> - ¹¹ C-methylpiperidin-4-yl acetát
¹¹ C-PMP	<i>N</i> - ¹¹ C-methylpiperidin-4-yl propionát
AD	Alzheimerova choroba
Ach	acetylcholin
AChE	acetylcholinesteráza
APP	amyloidní proteinové prekurzory
ATB	antibiotika
Aβ	amyloid–β peptid
BBB	blood-brain barrier, hematoencefalitická membrána
Boc ₂ O	di- <i>terc</i> -butyldikarbonát
CJD	Creutzfeld–Jakubova nemoc
d	dublet
DMF	dimethylformamid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EPS	extracelulární polymerní substance
EtOAc	ethylacetát
EtOH	ethanol
HD	Hungtingtonova nemoc
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HSAB	hard and soft acids and basis, koncept tvrdých a měkkých kyselin a bází
m	multiplet
MeCN	acetonitril
MeOH	methanol
MF	mobilní fáze
MO	mikroorganismus
MRI	magnetická rezonance
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina
NaOEt	ethanolát sodný
NK	nukleové kyseliny

PD	Parkinsonova choroba
PET	pozitronová emisní tomografie
PrD	prionová choroba
PrP	prionový protein
PrP ^C	prionový protein přirozený – celulární
PrP ^{Sc}	prionový protein patologický – scrapie
q	kvartet
RNA	ribonukleová kyselina
RO5	Lipinskeho pravidla pěti
ROS	reaktivní formy kyslíku
RT	room temperature, pokojová teplota
RVO	rotační vakuová odparka
s	singlet
SPECT	jednofotonová emisní výpočetní tomografie
t	triplet
THF	tetrahydrofuran
ThT	Thioflavin T
TLC	thin layer chromatography, chromatografie na tenké vrstvě
TOF	time-of-flight

6 Seznam použité literatury

- (1) Dugger, B. N.; Dickson, D. W. Pathology of Neurodegenerative Diseases. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2016**, *9* (7), 1–23.
- (2) Iadanza, M. G.; Jackson, M. P.; Hewitt, E. W.; Ranson, N. A.; Radford, S. E. A New Era for Understanding Amyloid Structures and Disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2018**, *19* (12), 755–773.
- (3) Zámečník, J.; kolektiv autorů. *Patologie 3*, První vydání.; LD, s.r.o. - PRAGER PUBLISHING: Praha 5 - Zbraslav, **2019**; Vol. 2019.
- (4) Drolle, E.; Hane, F.; Lee, B.; Leonenko, Z. Atomic Force Microscopy to Study Molecular Mechanisms of Amyloid Fibril Formation and Toxicity in Alzheimer's Disease. *Drug Metab. Rev.* **2014**, *46* (2), 207–223.
- (5) Seeman, P.; Seeman, N. Alzheimer's Disease: β -Amyloid Plaque Formation in Human Brain. *Synapse* **2011**, *65* (12), 1289–1297.
- (6) Owen, M. C.; Gnutt, D.; Gao, M.; Wärmländer, S. K. T. S.; Jarvet, J.; Gräslund, A.; Winter, R.; Ebbinghaus, S.; Strodel, B. Effects of *in Vivo* Conditions on Amyloid Aggregation. *Chem. Soc. Rev.* **2019**, *48* (14), 3946–3996.
- (7) Prusiner, S. B. Neurodegenerative Diseases and Prions. *N. Engl. J. Med.* **2001**, *344* (20), 1516–1526.
- (8) Imran, M.; Mahmood, S. An Overview of Human Prion Diseases. *Viol. J.* **2011**, *8* (1), 559–568.
- (9) Brown, D. R. Copper and prion disease. *Brain Research Bulletin* **2001**, *55* (2), 165–173.
- (10) Silverman, D. H. S. Brain 18F-FDG PET in the Diagnosis of Neurodegenerative Dementias: Comparison with Perfusion SPECT and with Clinical Evaluations Lacking Nuclear Imaging. *J. Nucl. Med.* **2004**, *45* (4), 594–607.
- (11) Jung, S. J.; Park, Y. D.; Park, J. H.; Yang, S. D.; Hur, M. G.; Yu, K. H. Synthesis and Evaluation of Thioflavin-T Analogs as Potential Imaging Agents for Amyloid Plaques. *Med. Chem. Res.* **2013**, *22* (9), 4263–4268.
- (12) Ter-Pogossian, M. M.; Raichle, M. E.; Sobel, B. E. Positron-Emission Tomography. *Sci. Am.* **1980**, *243* (4), 170–181.
- (13) Muehllehner, G.; Karp, J. S. Positron Emission Tomography. *Phys. Med. Biol.* **2006**, *51* (13), 117–137.

- (14) Williams, H. A.; Robinson, S.; Julyan, P.; Zweit, J.; Hastings, D. A Comparison of PET Imaging Characteristics of Various Copper Radioisotopes. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2005**, *32* (12), 1473–1480.
- (15) Singh, N. *Radioisotopes: Applications in Bio-Medical Science*; BoD – Books on Demand, **2011**.
- (16) George, K. J. H.; Borjian, S.; Cross, M. C.; Hicks, J. W.; Schaffer, P.; Kovacs, M. S. Expanding the PET Radioisotope Universe Utilizing Solid Targets on Small Medical Cyclotrons. *RSC Adv.* **2021**, *11* (49), 31098–31123.
- (17) Perrin, D. M. [18F]-Organotrifluoroborates as Radioprosthetic Groups for PET Imaging: From Design Principles to Preclinical Applications. *Acc. Chem. Res.* **2016**, *49* (7), 1333–1343.
- (18) Biricová, V.; Kururc J. Synthesis of the Radiopharmaceuticals for Positron Emission Tomography. *Minulosť a súčasné trendy jadrovej chemie*, OMEGA INFO, Bratislava **2007**, 211–238.
- (19) Vallabhajosula, S. 18F-Labeled Positron Emission Tomographic Radiopharmaceuticals in Oncology: An overview of Radiochemistry and Mechanisms of Tumor Localization. *Semin. Nucl. Med.* **2007**, 400–420.
- (20) Conti, M.; Eriksson, L. Physics of Pure and Non-Pure Positron Emitters for PET: A Review and a Discussion. *EJNMMI Phys.* **2016**, *3* (1), 8.
- (21) Boschi, A.; Martini, P.; Janevik-Vanovska, E.; Duatti, A. The emerging role of copper-64 radiopharmaceuticals as cancer theranostics. *Drug Discovery Today* **2018**, *23* (8), 1489–1501
- (22) Chélatat, G.; Arbizu, J.; a kol. Amyloid-PET and 18F-FDG-PET in the diagnostic investigation of Alzheimer's disease and other dementias. *Lancet. Neurol.* **2020**, *19*, 951–961.
- (23) Barhel, H.; Schroeter, M. L.; Hoffman, K.-T.; Sabri, O. PET/MR in Dementia and Other Neurodegenerative Diseases. *Semin. Nucl. Med.* **2015**, *12* (3), 224–233.
- (24) Zang, M.-Q.; Wilkinson, B. Drug Discovery Beyond the 'Rule-of-Five'. *Cur. Opinion Biotech.* **2007**, *18* (6), 478–488.
- (25) Camacho, V.; Gómez-Grande, A.; Sopena, P.; García-Solís D.; Gómez-Río M.; Lorenzo, C.; Rubí, S.; Arbizu, J. Amyloid PET in neurodegenerative diseases with dementia. *Rev. Esp. Med. Nucl. Imagen. Mol.* **2018**, *37* (6), 397–406.
- (26) Rowe, C.; Pejoska, S.; Mulligan, R.; Jones, G.; Chan, G.; Svensson, S.; Cselényi, Z.; Masters, C.; Villemagne, V. Head-to-Head Comparison Of11C-PiB And18F-

- AZD4694 (NAV4694) for β -Amyloid Imaging in Aging and Dementia. *J. Nucl. Med. Off. Publ. Soc. Nucl. Med.* **2013**, *54* (6), 880–886.
- (27) Rowley, P. A.; Samsonov, A. A.; Betthausen, T. J.; Pirasteh, A.; Johnson, S. C.; Eisenmenger, L. B. Amyloid and Tau PET Imaging of Alzheimer Disease and Other Neurodegenerative Conditions. *Seminars in ultrasound CT and MRI.* **2020**, *41* (6), 572–583.
- (28) Kung, H. F.; Choi, S. R.; Qu, W.; Zhang, W.; Skovronsky, D. 18F Stilbenes and Styrylpyridines for PET Imaging of A β Plaques in Alzheimer's Disease: A Miniperspective. *J. Med. Chem.* **2010**, *53* (3), 933–941.
- (29) Nagumo, M.; Ninomiya, M.; Oshima, N.; Itoh, T.; Tanaka, K.; Nishina, A.; Koketsu, M. Comparative analysis of stilbene and benzofuran neolignan derivatives as acetylcholinesterase inhibitors with neuroprotective and anti-inflammatory activities. *Bioorg. Med. Chem Lett.* **2019**, *29* (17), 2475–2479.
- (30) Shen, J.; Zhou, Q.; Li, P.; Wang, Z.; Liu, S.; He, C.; Zhang, C.; Xiao, P. Update on Phytochemistry and Pharmacology of Naturally Occurring Resveratrol Oligomers. *Molecules* **2017**, *22* (12), 2050–2076.
- (31) Auvity, S.; Tonietto, M.; Caillé, F.; Bodini, B.; Bottlaender, M.; Tournier, N.; Kuhnast, B.; Stankoff, B. Repurposing Radiotracers for Myelin Imaging: A Study Comparing 18F-Florbetaben, 18F-Florbetapir, 18F-Flutemetamol, 11C-MeDAS, and 11C-PiB. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2020**, *47* (2), 490–501.
- (32) Krasnovskaya, O.; Naumov, A.; Guk, D.; Gorelkin, P.; Erofeev, A.; Beloglazkina, E.; Majouga, A. Copper Coordination Compounds as Biologically Active Agents. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21* (11), 3965–4002.
- (33) Schildt, A. PET Methodology in Rat Models of Parkinson's Disease, PhD. Dissertation, University of Groningen, **2020**.
- (34) Dvir, H.; Silman; Harel, M.; Rosenberry, T. L.; Sussman, J. L. Acetylcholinesterase: From 3D structure to function. *Chem. Biol. Interact.* **2010**, *187* (3), 10-22.
- (35) Shinotoh, H.; Fukushi, K.; Nagatsuka, S.; Irie, T. Acetylcholinesterase Imaging: Its Use in Therapy Evaluation and Drug Design. *Curr. Pharm. Des.* **2004**, *10* (13), 1505–1517.
- (36) Douglas, A. E.; *Symbiotics interaction*, Oxford University Press, Vol. **1994**.
- (37) Fraune, S.; Bosch, T. C. G. Why Bacteria Matter in Animal Development and Evolution. *BioEssays* **2010**, *32* (7), 571–580.

- (38) Khatoon, Z.; McTiernan, C. D.; Suuronen, E. J.; Mah, T.-F.; Alarcon, E. I. Bacterial Biofilm Formation on Implantable Devices and Approaches to Its Treatment and Prevention. *Heliyon* **2018**, *4* (12), e01067.
- (39) Donné, J.; Dewilde, S. The Challenging World of Biofilm Physiology. *Adv. in Microb. Physiology* **2015**, *67*, 235–292.
- (40) Jamal, M.; Ahmad, W.; Andleeb, S.; Jalil, F.; Imran, M.; Nawaz, M. A.; Hussain, T.; Ali, M.; Rafiq, M.; Kamil, M. A. Bacterial Biofilm and Associated Infections. *J. Chin. Med. Assoc.* **2017**, *2018*, 7–11.
- (41) Richards, J. J.; Melander, C. Controlling Bacterial Biofilms. *ChemBioChem* **2009**, *10* (14), 2287–2294.
- (42) Implants and Prosthetics. <https://www.fda.gov/medical-devices/products-and-medical-procedures/implants-and-prosthetics> (accessed 2022 -04 -11).
- (43) Scholten, K.; Meng, E. Materials for Microfabricated Implantable Devices: A Review. *Lab. Chip* **2015**, *15* (22), 4256–4272.
- (44) Bi, Y.; Xia, G.; Shi, C.; Wan, J.; Liu, L.; Chen, Y.; Wu, Y.; Zhang, W.; Zhou, M.; He, H.; Liu, R. Therapeutic Strategies against Bacterial Biofilms. *Fundamental Research* **2021**, *1*, 193–212.
- (45) Mann, E. E.; Rice, K. C.; Boles, B. R.; Endres, J. L.; Ranjit, D.; Chandramohan, L.; Tsang, L. H.; Smeltzer, M. S.; Horswill, A. R.; Bayles, K. W. Modulation of EDNA Release and Degradation Affects Staphylococcus Aureus Biofilm Maturation. *PLoS ONE* **2009**, *4* (6), e5822.
- (46) Adams, R. L. P.; Knowler, J. T.; Leader, D. P. The Structure of the Nucleic Acids. In *The Biochemistry of the Nucleic Acids*. Springer Netherlands: Dordrecht, **1992**; 5–39.
- (47) Yang, W. Nucleases: Diversity of Structure, Function and Mechanism. *Q. Rev. Biophys.* **2011**, *44* (1), 1–93.
- (48) Xiaoqi, J. J.; Zhang J. Z. Chemical Nucleases Based on Macrocyclic Polyamines. *Macrocyclic Polyamines*; **2018**; 45–81.
- (49) Hegg, E. L.; Burstyn, J. N. Toward the Development of Metal-Based Synthetic Nucleases and Peptidases: A Rationale and Progress Report in Applying the Principles of Coordination Chemistry. *Coord. Chem. Rev.* **1998**, *173* (1), 133–165.
- (50) Dupereur, C. M. Roles of Metal Ions in Nucleases. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2008**, *12* (2), 250–255.

- (51) Sigel, R. K. O.; Pyle, A. M. Alternative Roles for Metal Ions in Enzyme Catalysis and the Implications for Ribozyme Chemistry. *Chem. Rev.* **2007**, *107* (1), 97–113.
- (52) Desbouis, D.; Troitsky, I. P.; Belousoff, M. J.; Spiccia, L.; Graham, B. Copper(II), Zinc(II) and Nickel(II) Complexes as Nuclease Mimetics. *Coord. Chem. Rev.* **2012**, *256* (11), 897–937.
- (53) McGivern, T. J. P.; Afsharpour, S.; Marmion, C. J. Copper Complexes as Artificial DNA Metallonucleases: From Sigman's Reagent to next Generation Anti-Cancer Agent? *Inorg. Chim. Acta* **2018**, *472*, 12–39.
- (54) Lawrance, G. A. *Introduction to Coordination Chemistry*; Wiley, **2010**; Vol. 2010.
- (55) Housecroft, C.; Sharpe, A. *Inorganic Chemistry*, 4.; Pearson Education Limited, 2012.
- (56) Wadas, T. J.; Wong, E. H.; Weisman, G. R.; Anderson, C. J. Coordinating Radiometals of Copper, Gallium, Indium, Yttrium, and Zirconium for PET and SPECT Imaging of Disease. *Chem. Rev.* **2010**, *110* (5), 2858–2902.
- (57) Pandya, D. N.; Bhatt, N.; An, G. I.; Ha, Y. S.; Soni, N.; Lee, H.; Lee, Y. J.; Kim, J. Y.; Lee, W.; Ahn, H.; Yoo, J. Propylene Cross-Bridged Macrocyclic Bifunctional Chelator: A New Design for Facile Bioconjugation and Robust ⁶⁴ Cu Complex Stability. *J. Med. Chem.* **2014**, *57* (17), 7234–7243.
- (58) Linden, L.; Cuthbertson, A. Radio-Pharmaceutical Complexes. WO2017162555A1, September 28, **2017**.
- (59) Zahara, A. J.; Hinds, E. M.; Nguyen, A. L.; Wilkerson-Hill, S. M. Programmed Sequential Additions to Halogenated Mucononitriles. *Org. Lett.* **2020**, *22* (20), 8065–8069.
- (60) Mishra, A. K.; Panwar, P.; Hosono, M.; Chuttani, K.; Mishra, P.; Sharma, R. K.; Chatal, J.-F. A New Bifunctional Chelating Agent Conjugated with Monoclonal Antibody and Labelled with Technetium-99m for Targeted Scintigraphy: 6-(4-Isothiocyanatobenzyl)-5,7-Dioxo-1,11-(Carboxymethyl)-1,4,8,11-Tetraazacyclotridecane. *J. Drug Target.* **2004**, *12* (9–10), 559–567.