

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
Přírodovědecká fakulta
Katedra anorganické chemie



Bc. Jan Holub

KOMPLEXY GALLIA PRO
MOLEKULÁRNÍ ZOBRAZOVÁNÍ
KOSTNÍ TKÁNĚ

Gallium complexes for
molecular imaging
of bone tissue

Diplomová práce
studijního oboru Anorganická chemie

Školitel: RNDr. Vojtěch Kubíček, PhD.

Praha, 2011

Tato diplomová práce vznikla v souvislosti s řešením výzkumného záměru MSM0021620857

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracoval samostatně, pod vedením školitele RNDr. Vojtěcha Kubíčka, PhD. a že jsem všechny použité prameny řádně citoval. Tato práce, ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 31. srpna 2011.

Název: Komplexy gallia pro molekulární zobrazování kostní tkáně

Řešitel: Bc. Jan Holub

Ústav: Katedra anorganické chemie, Přírodovědecká fakulta UK

Školitel: RNDr. Vojtěch Kubíček, PhD.

Email školitele: kubicek@natur.cuni.cz

ABSTRAKT

Tato práce se zabývá přípravou nových ligandů pro selektivní komplexaci gallia, které by mohly sloužit jako potenciální základ radiofarmak pro ^{68}Ga -PET vyšetření kostní tkáně. V této práci byly připraveny 2 nové ligandy kombinující skelet 1,4,7-triazacyklononan-1,4-dioctové kyseliny s bis(fosfonátovým) pendantním ramenem navázaným k volnému atomu dusíku na makrocyclu. Makrocyclický skelet je zodpovědný za vysokou kinetickou i termodynamickou stabilitu komplexu s Ga^{3+} , zatímco bis(fosfonátové) pendantní rameno je zodpovědné za cílenou dopravu komplexu na kostní tkáň. Oba nové ligandy byly plně charakterizovány pomocí NMR a hmotnostní spektroskopie. Byla studována komplexační reakce obou ligandů s Ga^{3+} pomocí ^{31}P a ^{71}Ga NMR spektroskopie, dále byly studovány adsorpční vlastnosti komplexů na hydroxoapatit, který byl použit jako model pro kostní tkáň. Ve spolupráci s Johannes-Gutenberg Universität Mainz v Německu byly provedeny radiochemické experimenty, zahrnující studium kinetiky komplexace ^{68}Ga a dále byly provedeny základní *in-vivo* zvířecí experimenty zahrnující sledování biodistribuce komplexu a PET vyšetření. Získaná data byla porovnána se známými analogickými sloučeninami se stejným pendantním ramenem navázaným na odlišný makrocyclický skelet.

Klíčová slova: bis(fosfonát), kostní tkáň, ^{68}Ga , PET

Title: Gallium Complexes for Molecular Imaging of Bone Tissue

Author: Bc. Jan Holub

Department of Inorganic Chemistry, Faculty of Science, Charles University

Supervisor: RNDr. Vojtěch Kubiček, PhD.

Supervisor's Email address: kubicek@natur.cuni.cz

ABSTRACT

This thesis is focused on preparing new ligands for selective complexation of gallium, which might serve as potential radiopharmaceuticals for ^{68}Ga -PET bone imaging. Two new ligands were prepared, combining 1,4,7-triazacyclonone-1,4-diacetic acid macrocyclic skeleton and bis(phosphonate) pendant arm, bound to the remaining free nitrogen atom on the macrocycle. Macrocyclic skeleton is responsible for high kinetic and thermodynamic stability of the Ga^{3+} complex and the bis(phosphonate) pendant arm insures selective delivery of the complex to the bone tissue. Both new ligands were fully characterized by NMR and mass spectroscopy. Complexation of Ga^{3+} was studied by ^{31}P and ^{71}Ga NMR spectroscopy. Binding to bone tissue was simulated by adsorption of the complexes to hydroxoapatite. Radiochemical experiments including study of ^{68}Ga complexation kinetics and basic *in-vivo* experiments including biodistribution studies and PET examination were done in cooperation with Johannes-Gutenberg Universität Mainz in Germany. Data obtained from these experiments were compared with known analogic compounds with the same pendant arm bound on different macrocyclic skeleton.

Keywords: bis(phosphonate), bone tissue, ^{68}Ga , PET

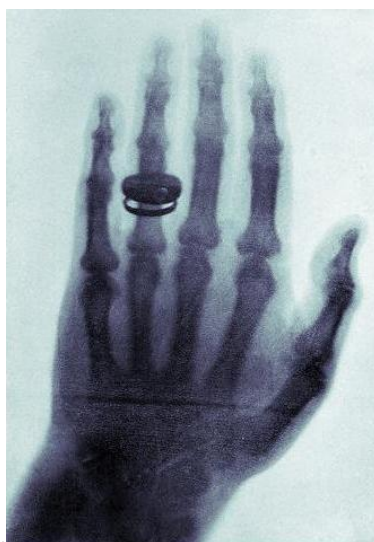
1. OBSAH

| | |
|---|-----------|
| 1. Obsah | 5 |
| 2. Úvod | 6 |
| 2.1 Úvod do studia struktury tkání | 6 |
| 2.2 Pozitronová emisní tomografie (PET) | 9 |
| 2.3 Příprava nuklidu ⁶⁸ Ga | 12 |
| 2.4 Gallium a jeho koordinační vlastnosti..... | 14 |
| 2.5 Fosfor, geminální bisfosfonáty | 17 |
| 2.6 Cíl práce | 19 |
| 3. Experimentální část | 20 |
| 3.1 Seznam použitých chemikálií | 20 |
| 3.2 Metody charakterizace | 20 |
| 3.3 Vlastní syntéza | 21 |
| 3.3.1 <i>1-benzyl-1,4,7-triazacyklononan</i> | 21 |
| 3.3.2 <i>1-benzyl-4,7-bis(tBu-acetyl)-1,4,7-triazacyklononan</i> ... | 22 |
| 3.3.3 <i>1,4-bis(tBu-acetyl)-1,4,7-triazacyklononan</i> | 23 |
| 3.3.4 <i>tBu-BPAMN</i> | 25 |
| 3.3.5 <i>BPAMN</i> | 26 |
| 3.3.6 <i>tBu-BPPEN</i> | 28 |
| 3.3.7 <i>BPPEN</i> | 30 |
| 3.4 Sorpce Fe ³⁺ komplexů na hydroxoapatit | 32 |
| 3.5 Komplexace ⁶⁸ Ga | 34 |
| 3.6 Komplexace Ga ³⁺ sledovaná pomocí ⁷¹ Ga a ³¹ P NMR | 35 |
| 4. Výsledky a diskuze | 36 |
| 4.1 Chemická syntéza..... | 36 |
| 4.2 Výsledky sorpčních studií | 39 |
| 4.3 Výsledky radiochemického značení | 43 |
| 4.4 Kinetika komplexace Ga ³⁺ sledovaná pomocí NMR | 48 |
| 4.4 Úvahy pro budoucí pokračování práce | 51 |
| 5. Závěr | 53 |
| 6. Seznam použité literatury | 54 |

2. ÚVOD

2.1 Úvod do studia struktury tkání

První pokusy o studium vnitřní struktury tkáně bez vzniku viditelného poškození byly uskutečněny na konci 19. století. Wilhelm Röntgen tehdy objevil, že dopadem elektronů, urychlených vysokým napětím, na vhodný kovový terčik, vzniká záření schopné procházet i materiály, které běžné světlo nepropustí. Exponováním různých částí těla tomuto záření proti fotografické desce byly získány první snímky kosterní struktury (obr. 1), neboť kostní tkáň absorbuje Röntgenovo záření více než okolní tkáň. Za objev byla W. Röntgenovi udělena v roce 1901 Nobelova cena za fyziku a tato metoda se bez větších modifikací používá pro zobrazování např. kostí nebo zubů dodnes (skiografie).



*Obrázek 1: jeden z prvních snímků
pořízených W. Röntgenem v roce 1895*

Cílem moderní medicíny bylo zlepšení rozlišovací schopnosti vyšetření a zároveň snížení radiační zátěže vývojem nových metod. Významný pokrok v tomto odvětví byl učiněn s rozvojem výpočetní techniky, kvantové fyziky a jaderné chemie během 70. let minulého století. V roce 1971 byl do komerčního provozu uveden první přístroj využívající metodu výpočetní tomografie (Computed Tomography, CT). Pacient je umístěn v přístroji, kde jej po kruhové ose obíhá zařízení složené z rentgenky a detektorů. Pacient je tak prozářen z nejrůznějších úhlů a podle rozdílu intenzity emitovaného a detekovaného záření jsou následně pomocí počítače rekonstruovány plošné řezy, případně prostorový model zkoumané tkáně. Za vynález této metody byla G. Hounsfieldovi a A. Cormackovi v roce 1979 udělena

Nobelova cena za medicínu. Výhodou této metody je dobrá rozlišovací schopnost, nevýhodou je velká radiační zátěž pacienta.

Tabulka 1: Srovnání radiační zátěže během vyšetření

| Vyšetření | Typická efektivní dávka (mSv) |
|-------------------------------|-------------------------------|
| Průměrná roční dávka z pozadí | 2,4 ^[1] |
| Rentgen končetiny | 0,001 ^[2] |
| Rentgen hrudi | 0,02 ^[2] |
| CT hlavy | 1,5 ^[3] |
| CT břicha | 5,3 ^[3] |
| CT hrudi | 5,8 ^[3] |
| Srdeční CT angiogram | 6,7 – 13,0 ^[4] |

Další běžnou zobrazovací metodou, uvedenou do komerčního provozu v roce 1977, je magnetická rezonance (Magnetic Resonance Imaging, MRI), která je fyzikálním principem velmi podobná nukleární magnetické rezonanci (NMR), používané pro studium chemických sloučenin. Nejpočetněji zastoupený prvek v organismu je vodík, jehož jaderné spinové číslo může nabývat stavů $+\frac{1}{2}$ a $-\frac{1}{2}$. Za běžných podmínek je energetický rozdíl mezi těmito stavy zanedbatelný a oba jsou přibližně stejně obsazeny. Při umístění takového jádra do statického magnetického pole B_0 , dochází k energetickému oddělení uvedených stavů a nasměrování spinového vektoru podle tohoto pole, přičemž energetický rozdíl ΔE mezi stavy je přímo úměrný velikosti působícího pole B_0 . Pokud je přidáno druhé, kolmo působící proměnné magnetické pole B_1 , jehož frekvence ν odpovídá podle vztahu $\Delta E = h \cdot \nu$ energetickému rozdílu hladin vyvolanému působícím polem B_0 , dojde k rezonanci jaderných spinů mezi oběma stavy. Například pro atom vodíku je při poli $B_0 = 1$ T rezonanční frekvence $\nu = 42,58$ MHz. Tato frekvence záleží na druhu jádra a mírně také na jeho chemickém okolí. Čím vyšší je pole B_0 a tím i rezonanční frekvence ν , tím vyšší je rozlišovací schopnost přístroje. Správnou volbou parametrů polí B_0 a B_1 lze velmi přesně určit, která jádra budou v rezonanci. Se změnou orientace jaderného spinu dochází i ke změně jeho magnetického momentu. Přiblížením cívky do blízkosti měnícího se magnetického momentu se v ní indukuje napětí, které je následně měřeno. Zjednodušeně řečeno je tedy velikost indukovaného napětí závislá na poloze a typu tkáně. Pomocí výpočetní techniky je následně rekonstruován prostorový model zkoumané tkáně. Výhodou této metody je dobrá rozlišovací schopnost a tělo během

vyšetření není vystaveno škodlivému ionizujícímu záření, díky čemuž bylo možné poprvé neinvazivně zobrazit mozek nebo nervové tkáně. Podáním kontrastní látky, která se selektivně váže na zkoumanou tkáň lze rozlišení dále vylepšit na úroveň dalece přesahující možnosti rentgenu nebo CT. Nevýhodou jsou vysoké pořizovací a provozní náklady, časové nároky vyšetření a obtíže při vyšetření pacientů s kardiostimulátory a jinými kovovými implantáty.



Obrázek 2: MRI snímek kolenního kloubu

Další neinvazivní zobrazovací metodou je sonografie. Při této metodě se využívá ultrazvukové vlnění o frekvencích přibližně 2 až 18 MHz, které je v mikrosekundových pulzech vysíláno do těla pacienta. S rostoucí frekvencí roste přesnost vyšetření, ale klesá hloubka průniku. Povrchové části těla jako např. svaly se skenují při vyšších frekvencích, hlubší struktury jako například ledviny nebo játra se zobrazují při nižších frekvencích. Využívá se faktu, že akustická impedance, a tedy i rychlost šíření ultrazvuku není ve všech tkáních stejná. Na rozhraní dvou tkání s odlišnou akustickou impedancí pak dochází k částečnému odrazu vlnění, přičemž se registruje intenzita odraženého signálu, i doba za jakou se vysílání vrátí do senzoru. Výpočetní technika pak rekonstruuje obraz zkoumaného orgánu. Výhodou metody je velmi dobré zobrazení svalů a jiných měkkých tkání, žádné známé vedlejší efekty vyšetření a cenová dostupnost. Nevýhodou je omezená možnost ultrazvuku penetrovat přes kosti a díky velké akustické impedanci plynů není možno provádět skenování, pokud se mezi sondou a cíleným orgánem nachází vrstva plynu. Z tohoto důvodu také nelze skenovat např. plíce nebo zažívací ústrojí. Limitované možnosti penetrace také způsobují problémy při zobrazování hlouběji uložených orgánů, zvláště pak u obézních pacientů.

Mezi radiochemické metody patří především pozitronová emisní tomografie (Positron

Emission Tomography, PET) – viz níže a jednofotonová emisní výpočetní tomografie (Single Photon Emission Computed Tomography, SPECT). Metoda SPECT využívá γ -zářiče s krátkým poločasem rozpadu. Do krevního oběhu pacienta je vpraven γ -zářič navázaný na vhodné radiofarmakum, které ho dopraví na cílené místo v organismu. Okolo pacienta rotuje γ -kamera, která nasnímá dvourozměrné projekce pacienta ze všech úhlů a výpočetní technika z nich následně sestaví tomografickou rekonstrukci distribuce radionuklidu v dané tkáni. Na přibližně 80% všech vyšetření se používá nuklid ^{99m}Tc .

Tabulka 2: Přehled γ -zářičů používaných pro SPECT

| Nuklid | Poločas rozpadu [hodiny] | Vyšetření |
|-------------------|--------------------------|----------------------------|
| ^{99m}Tc | 6,01 | Kosti, srdeční sval, mozek |
| ^{123}I | 13,22 | Štítná žláza |
| ^{111}In | 67,31 | Bílé krvinky |

Výhodou metody je použití levnějších a snáze připravitelných radioisotopů, než v případě PET, nevýhodou je nižší rozlišení a dlouhý čas vyšetření (15-20 minut) během kterých se pacient nesmí pohybovat.

2.2 Pozitronová emisní tomografie

Pozitronová emisní tomografie (Positron Emission Tomography, PET) je druh lékařského vyšetření, založený na metodách zobrazení prostorového modelu tkáně pomocí jaderné medicíny. Do krevního oběhu pacienta je vpraven β^+ zářič navázaný na vhodné radiofarmakum, které má za úkol jeho dopravu na cílené místo v organismu (targeting). Při radioaktivním rozpadu β^+ zářiče dojde k emisi pozitronu, který v těle urazí v závislosti na své energii jen velmi krátkou vzdálenost (řádově desítky mm), než se srazí s elektronem z okolí. Vzájemná anihilace těchto částic resultuje především ve dva γ -fotony o energii 511 keV, které opouštějí místo anihilace v přímém úhlu 180° . Tyto páry fotonů jsou detekovány scintilačním zařízením ve tvaru tunelu, ve kterém je pacient umístěn a které dokáže určit souřadnice místa, kde došlo k anihilaci. Pro zajištění přesnosti jsou ignorovány fotony, které nedorazí v párech, tedy v časech lišících se o více než cca. 10 nanosekund. Z řádově stovek tisíc takových událostí již za pomoci výpočetní techniky lze složit plošné řezy nebo prostorové modely zkoumané tkáně. Vývoj této metody počal již koncem padesátých let 20. století,

v sedmdesátých letech byla navržena metoda syntézy ^{18}F -FDG, dnes nejpoužívanějšího radiofarmaka, a první dobrovolníci byli touto metodou vyšetřeni v roce 1976. Pro rozšíření možností molekulárního zobrazování se často výše uvedené metody kombinují v rámci jednoho vyšetření pomocí přístroje schopného obsluhovat alespoň dvě metody současně, nejčastěji PET + CT a PET + MRI.

Vhodnost nuklidů prvků podléhajících β^+ rozpadu z hlediska použití pro PET se posuzuje podle několika kritérií:

1) **Poločas rozpadu**

Dolní hranice je limitována časem potřebným pro izolaci nuklidu, přípravu daného radiofarmaka, podání přípravku pacientovi a časem nutným pro distribuci radiofarmaka v organismu dříve, než veškerá aktivita vymizí. Naopak příliš dlouhý poločas rozpadu znamená nutnost prodloužené hospitalizace a tím i vyšší finanční náklady vyšetření, dokud veškerá aktivita za kontrolovaných podmínek neopustí tělo pacienta. Ideální poločas rozpadu daného nuklidu by se tedy měl pohybovat v řádech desítek minut až jednotek hodin.

2) **Energie emitovaného pozitronu**

Čím vyšší je energie emitovaného pozitronu, tím delší urazí vzdálenost, než dojde k anihilaci a tím také klesá rozlišovací schopnost vyšetření. Žádoucí tedy je, aby energie emitovaného pozitronu byla co nejnižší.

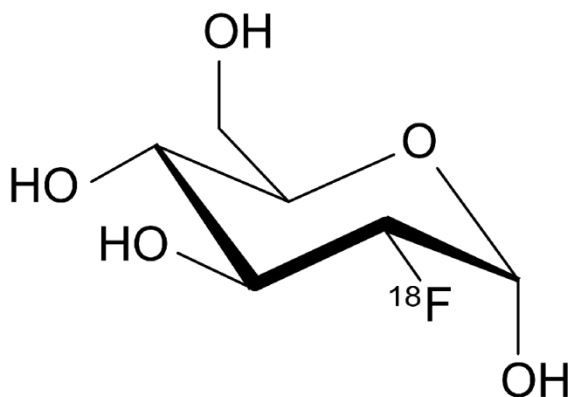
3) **Nároky na přípravu a manipulaci s daným nuklidem**

Nuklidy nejčastěji používané pro PET (^{11}C , ^{13}N , ^{15}O a ^{18}F) se připravují pomocí cyklotronu, což je zařízení velmi náročné na provoz, obsluhu i finance. Alternativou je možnost přípravy některých nuklidů těžších prvků, pomocí tzv. generátoru (viz sekce 2.3), který tyto nevýhody potlačuje.

4) **Možnosti cílené dopravy nuklidu na dané místo v organismu**

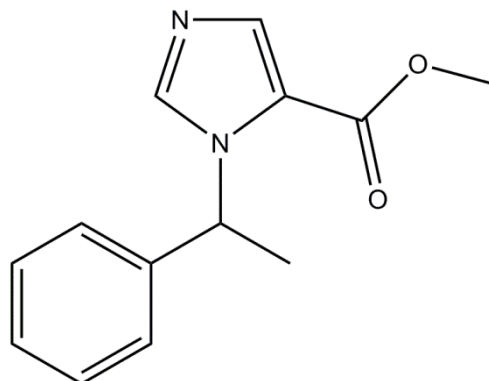
Nejčastěji používanými nuklidy, viz výše, lze značit látky běžně používané v organismu, tedy cukry, různé peptidy, vodu, nebo amoniak, aniž by došlo k jejich chemické změně. Například nuklid ^{18}F se používá ve formě 2-deoxy-2- (^{18}F) fluoro-D-glukózy (FDG), která se jako analog běžné glukózy selektivně hromadí v tkáních s vysokou spotřebou cukru, především v mozku, ledvinách a rakovinných buňkách. FDG vstoupí do glykolýzového cyklu a pomocí hexokinázy je fosforylována na FGD-6-fosfát, avšak nemůže být dále metabolizována, neboť jí chybí potřebný atom kyslíku

v pozici 2. Až po radioaktivním rozpadu ^{18}F na $^{18}\text{O}^-$ a zachycení protonu z okolí se z molekuly FDG stane běžná glukóza, která je dále spotřebována v glykolýzovém cyklu.



Obrázek 3:

2-deoxy-2-(^{18}F)fluoro-D-glukóza (FDG)



Obrázek 4:

Metomidát (MTO)

Nuklid ^{11}C se používá např. ve formě (^{11}C)Metomidátu (MTO) pro skenování adrenokortikálních nádorů. Metomidát je velmi účinný inhibitor 11β -hydroxylázy, což je klíčový enzym v biosyntéze kortizolu a aldosterolu v adrenálním kortexu.^[5]

Nuklidy těžších, většinou kovových prvků jsou sice snadněji připravitelné pomocí generátorů, ale doprava těchto prvků na cílené místo je v porovnání s lehkými nekovovými nuklidy o poznání složitější. Většina volných kovových iontů je toxická. Kov je proto potřeba pomocí vhodného ligandu zakomplexovat, tak aby kinetická a termodynamická stabilita komplexu vylučovala následné uvolnění kovu v těle. Doprava na cílené místo v organismu se pak zajistí navázáním komplexu na vhodnou biomolekulu.

Tabulka 3: Běžné β^+ zářiče připravitelné pomocí cyklotronu

| Nuklid | Poločas rozpadu [minuty] | Maximální energie pozitronu [keV] ^[6] |
|-----------------|-----------------------------|---|
| ^{11}C | 20,38 | 970 |
| ^{13}N | 9,97 | 1190 |
| ^{15}O | 2,04 | 1720 |
| ^{18}F | 109,77 | 635 |

Tabulka 4: Běžné β^+ zářiče připravitelné pomocí generátoru

| Nuklid | Poločas rozpadu [minuty] | Maximální energie pozitronu [keV] | Generátor: |
|---------------------------|-----------------------------|--------------------------------------|--|
| ^{62}Cu | 9,74 | 2926 ^[6] | $^{62}\text{Zn}(\beta^-)^{62}\text{Cu}$, 9.3 h |
| ^{68}Ga | 67,71 | 1899 ^[6] | $^{68}\text{Ge}(\beta^-)^{68}\text{Ga}$, 271 d |
| ^{82}Rb | 1,27 | 3378 ^[6] | $^{82}\text{Sr}(\beta^-)^{82}\text{Rb}$, 25.6 d |
| $^{110\text{m}}\text{In}$ | 69,15 | 2300 ^[7] | $^{110}\text{Sn}(\beta^-)^{110}\text{In}$, 4.11 d |
| ^{128}Cs | 3,64 | 2885 ^[8] | $^{128}\text{Ba}(\beta^-)^{128}\text{Cs}$, 2.43 d |
| ^{134}La | 6,45 | 2688 ^[9] | $^{134}\text{Ce}(\beta^-)^{134}\text{La}$, 3.0 d |
| ^{140}Pr | 3,39 | 2300 ^[9] | $^{140}\text{Nd}(\beta^-)^{140}\text{Pr}$, 3.3 d |

Velmi slibné vlastnosti z hlediska použití pro PET má nuklid ^{68}Ga .

2.3 Příprava nuklidu ^{68}Ga

Gallium-68 je nuklid připravitelný pomocí tzv. generátoru - zařízení ve kterém se ^{68}Ge přeměňuje záchytem elektronu (>99%) s poločasem 271 dní na ^{68}Ga , které je možno díky rozdílným chemickým vlastnostem obou prvků ze zařízení selektivně extrahovat. První zařízení tohoto typu bylo vyrobené v 70. letech 20. století a díky rozvoji PET během poslední dekády byla zkoumána široká řada systémů, lišících se způsobem navázání germania, extrakcí gallia i jeho následným čištěním.

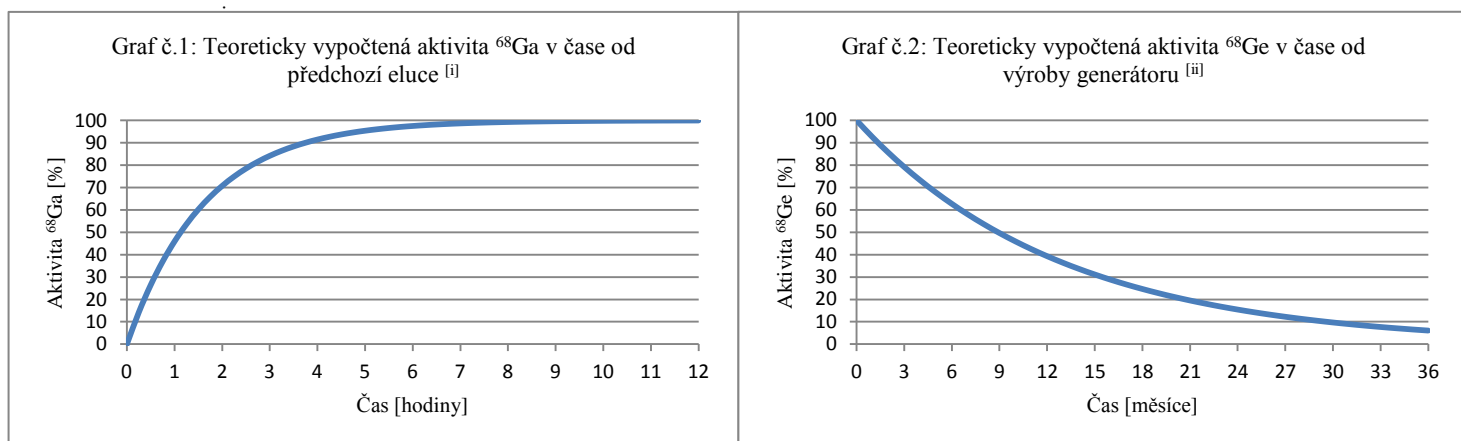
Pro přípravu ^{68}Ge je nejčastěji využito reakce $^{69}\text{Ga}(p,2n)^{68}\text{Ge}$. Toto může být následně adsorbováno na různé materiály (Al_2O_3 , TiO_2 , SnO_2 , ZnO_2 , ZrO_2 , Sb_2O_5 , organické matrice a další^[10,11,12]). Extrakce gallia bylo zprvu docíleno přímým promýváním roztokem ligandu, který pak bylo možno po úpravě pH a zakoncentrování rovnou použít pro některá PET vyšetření. Zkoumány byly i systémy, ze kterých bylo gallium získáváno elucí NaOH ve formě $[\text{Ga}(\text{OH})_4]^-$.^[13] Výrazné vylepšení radiochemické čistoty a rozšíření možností komplexace bylo docíleno vývojem systémů, ze kterých se gallium extrahuje pomocí HCl ve formě Ga^{3+} . Obsah nečistot (především Ge, Zn, Fe a kovy pocházející z adsorbční matrice) je minimalizován nejčastěji frakcionací eluátu podle aktivity a jeho průchodem přes kationtové nebo aniontové iontoměniče.

Před průchodem přes aniontový iontoměnič je eluát smíchán s HCl o koncentraci

vyšší než 5,5 M, čímž dojde k vytvoření komplexního iontu $[\text{Ga}(\text{Cl})_4]^-$, který je zachycen. Ostatní kovy, které lze v eluátu předpokládat, netvoří za těchto podmínek stabilní záporně nabitě chlorokomplexy a na aniontovém iontoměničči se nezachytí. Při následném promytí vodou se chlorokomplex rozpadá a dojde k eluci iontu Ga^{3+} .

Čištění eluátu průchodem přes kationtový iontoměnič spočívá v různě silné interakci mezi jednotlivými ionty a iontoměniččem. Nečistoty se eluují promytím směsí acetonu a HCl o koncentraci řádově 0,1 M. Pro následné uvolnění Ga^{3+} je potřeba koncentraci HCl zvýšit na více než 4 M (podle typu iontoměničče).^[14]

Vzhledem k poločas rozpadu ^{68}Ga (67,71 min, 89% β^+ , 11% EC) je již 8 hodin po předchozí extrakci ustavena rovnováha (>99 %) mezi formací nového ^{68}Ga a jeho rozpadem na ^{68}Zn a ze zařízení lze extrahovat novou dávku. Generátor je díky dlouhému poločasu rozpadu matečného izotopu ^{68}Ge možno využívat po dobu několika měsíců.



obrázek 5: Generátor $^{68}\text{Ge} / ^{68}\text{Ga}$

ⁱ při zanedbání rozpadové konstanty λ_{Ge} oproti λ_{Ga} , neboť poločas rozpadu $T_{1/2, \text{Ge}} \gg T_{1/2, \text{Ga}}$

ⁱⁱ při zanedbání úbytku aktivity ^{68}Ge průnikem do eluce společně s ^{68}Ga ; obsah $10^{-3} - 10^{-2} \%$ / eluce

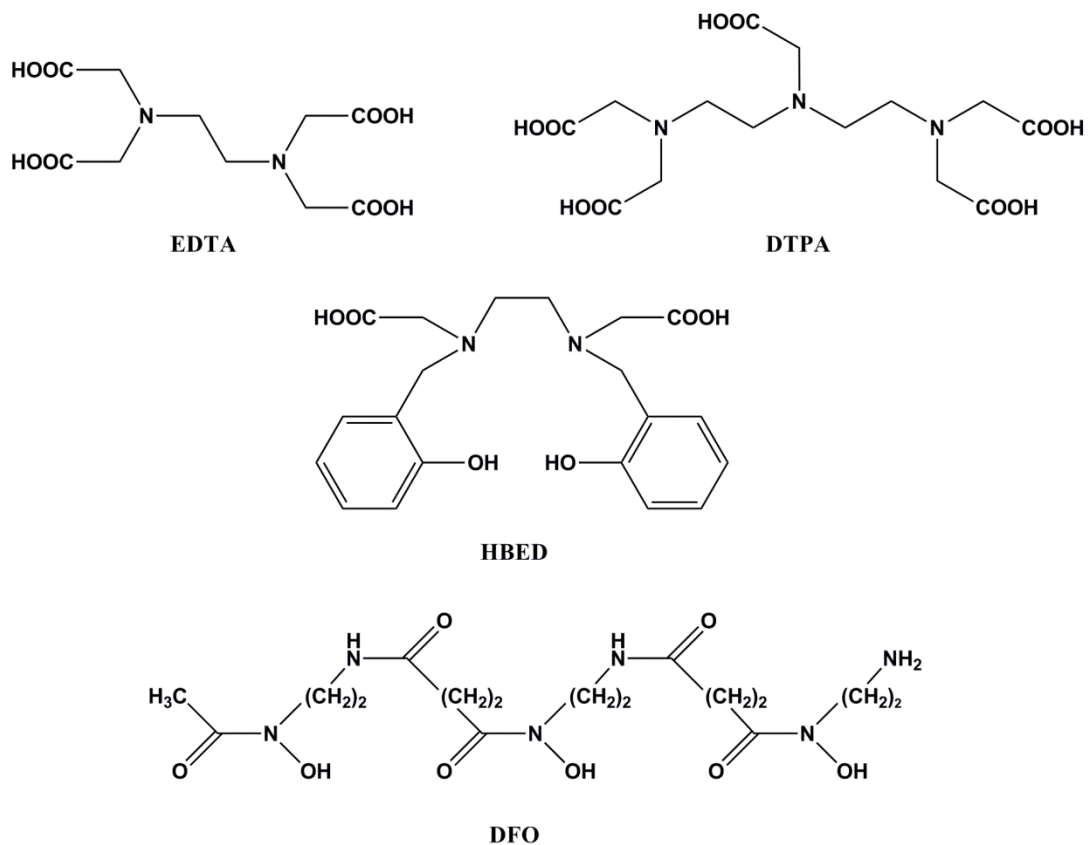
2.4 Gallium a jeho koordinační vlastnosti

Gallium je prvek 4. řady a III.A skupiny periodické tabulky, s elektronovou konfigurací $[\text{Ar}]3d^{10}4s^24p^1$, z čehož vyplývá nejběžnější oxidační číslo +3. Volný ion Ga^{3+} je stabilní pouze v kyselém prostředí. Při pH v rozmezí přibližně 3 – 9,5 se sráží jako velmi nerozpustný $\text{Ga}(\text{OH})_3$ ($K_s = 7,28 \times 10^{-36}$). Při pH vyšším než 9,5 se hydroxid opět rozpouští ve formě $[\text{Ga}(\text{OH})_4]^-$.

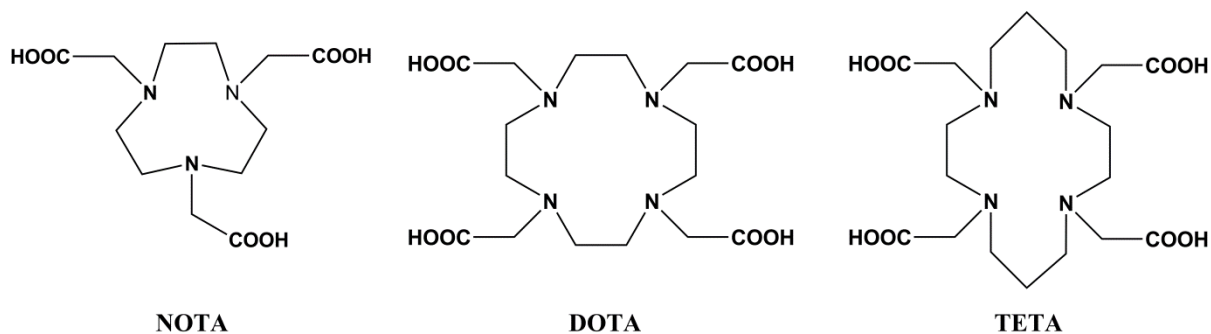
Koordinační chemie Ga^{3+} je velmi podobná Fe^{3+} , především díky téměř stejnému iontovému poloměru (62 pm pro Ga^{3+} a 65 pm pro Fe^{3+})^[15]. Lze proto očekávat, že Ga^{3+} by mohl nahrazovat Fe^{3+} v biologicky aktivních centrech v organismu. Toto bylo prokázáno např. u transferrinu, což je protein zodpovědný za transport železa v krevní plasmě. Transferrin obsahuje dvě vazebná místa, velmi selektivní pro Fe^{3+} ($\text{pK} \approx 23$), přičemž za fyziologických podmínek je Fe^{3+} nahrazován Ga^{3+} , taktéž s velmi vysokou afinitou ($\text{pK} \approx 20$)^[16].

Ga^{3+} je klasifikován jako tvrdá kyselina a tvoří proto stabilní komplexy především s ligandy obsahujícími kyslík, dusík, případně síru jako donorové atomy, přičemž je preferováno koordinační číslo 6 s oktaedrickým uspořádáním komplexu. Pro radiologické značení nejen ^{68}Ga byla vyzkoušena řada univerzálních acyklických bifunkčních ligandů, především derivátů ethylendiamintetraoctové kyseliny (EDTA), diethylentriaminpentaoctové kyseliny (DTPA), *N,N'*-bis(2-hydroxybenzyl)ethylendiamin-*N,N'*-dioctové kyseliny (HBED) a desferrioxoaminu-B (DFO). Většina těchto aniontových komplexů však vykazovala nízkou stabilitu *in-vitro*, což bylo dáno především tendencí ke kyselé nebo kationtové podpořené disociaci v těchto podmínkách.^[17]

Dále byly zkoumány vlastnosti makrocyclických ligandů, založených na 9, 12, nebo 14-členných kruzích se 3 nebo 4 heteroatomy a jejich derivátů. Velikost centrální kavity makrocyclického ligandu ovlivňuje jak termodynamickou, tak kinetickou stálost komplexů. Její rozměry lze optimalizovat tak, aby daný kovový kation uvnitř byl v ideální prostorové konformaci s co nejnižší energií. Při navázání jiného iontu konformační energie vzroste, což se projeví v poklesu stability komplexu. Makrocyclické ligandy lze proto používat k selektivní komplexaci daného kovu.

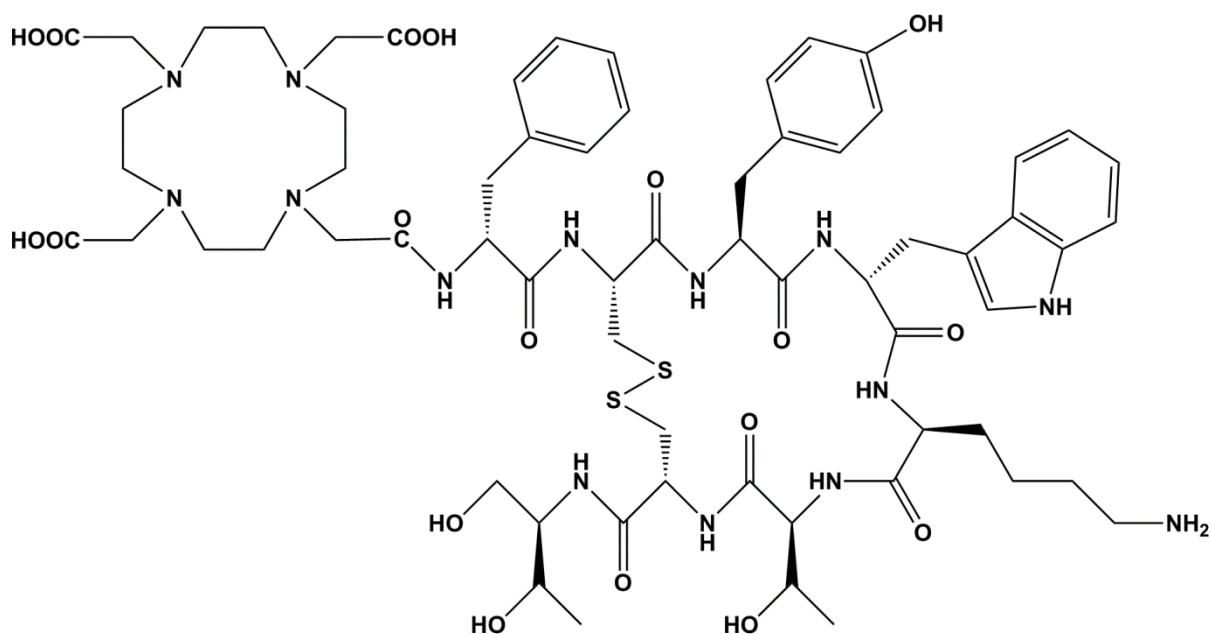


Obrázek 6: Vybrané acyklické ligandy



Obrázek 7: Vybrané makrocyclické ligandy

Doprava komplexu na cílené místo v organismu se zajistí nejčastěji kovalentním navázáním na vhodný biologický vektor. Například konjugát 1,4,7,10-tetraazacyklodekan-1,4,7,10-tetraoctové kyseliny s [Tyr3]-octreotidem (DOTA-TOC) se selektivně váže na některé nádorové tkáně a je kromě ^{68}Ga značen řadou jiných trojmocných kovových kationtů, např. ^{90}Y , ^{111}In a ^{177}Lu pro diagnostické i terapeutické účely. ^[18]



Obrázek 8: Struktura konjugátu DOTA-TOC

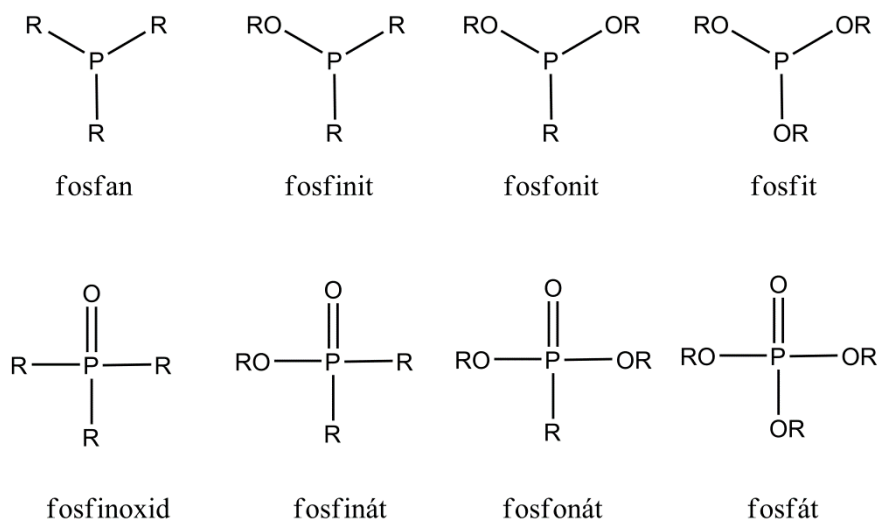
V případě Ga^{3+} odpovídá jeho iontový poloměr nejlépe rozměrům kavity 9-členného makrocyklu založeného na struktuře 1,4,7-triazacyklononan-1,4,7-trioctové kyseliny (NOTA). Kromě rychlosti komplexace a kinetické stálosti komplexu proti disociaci v *in-vivo* podmínkách patří mezi další faktory ovlivňující vhodnost jednotlivých ligandů také redoxní vlastnosti, náboj a lipofilicita. Neutrální komplexy jsou méně náchylné ke kyselé, nebo kationtově podpořené disociaci. Například u neutrálního komplex Ga-NOTA dochází ke kyselé disociaci až při velmi nízkém pH, které je mimo rozsah *in-vivo* podmínek^[17]. Komplexy Ga^{3+} s různými deriváty NOTA proto ukazují velmi slibné vlastnosti jako základ potenciálních radiofarmak pro PET.

Tabulka 5: Stabilita komplexů Ga^{3+} [19,20]

| Ligand | $\log [\text{ML}]/[\text{L}][\text{M}]$ | Ligand | $\log [\text{ML}]/[\text{L}][\text{M}]$ |
|-------------|---|--------|---|
| Transferrin | 20,3 | DFO | 27,6 |
| EDTA | 21,0 | NOTA | 30,1 |
| DTPA | 24,3 | DOTA | 21,3 |
| HBED | 38,5 | TETA | 19,7 |

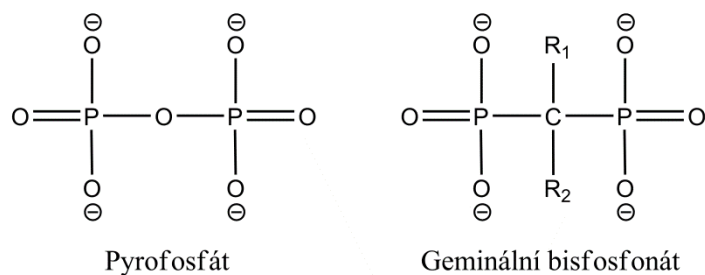
2.5 Fosfor, geminální bisfosfonáty

Fosfor je nekovový prvek, hojně se vyskytující se především jako aniont PO_4^{3-} v zemské kůře. V lidském těle se nachází ve formě ATP, dále v DNA a jako minerál hydroxoapatit; $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$, který tvoří až 50% hmotnosti kostí. Chemie sloučenin fosforu je díky široké škále organofosforových sloučenin velmi rozmanitá.



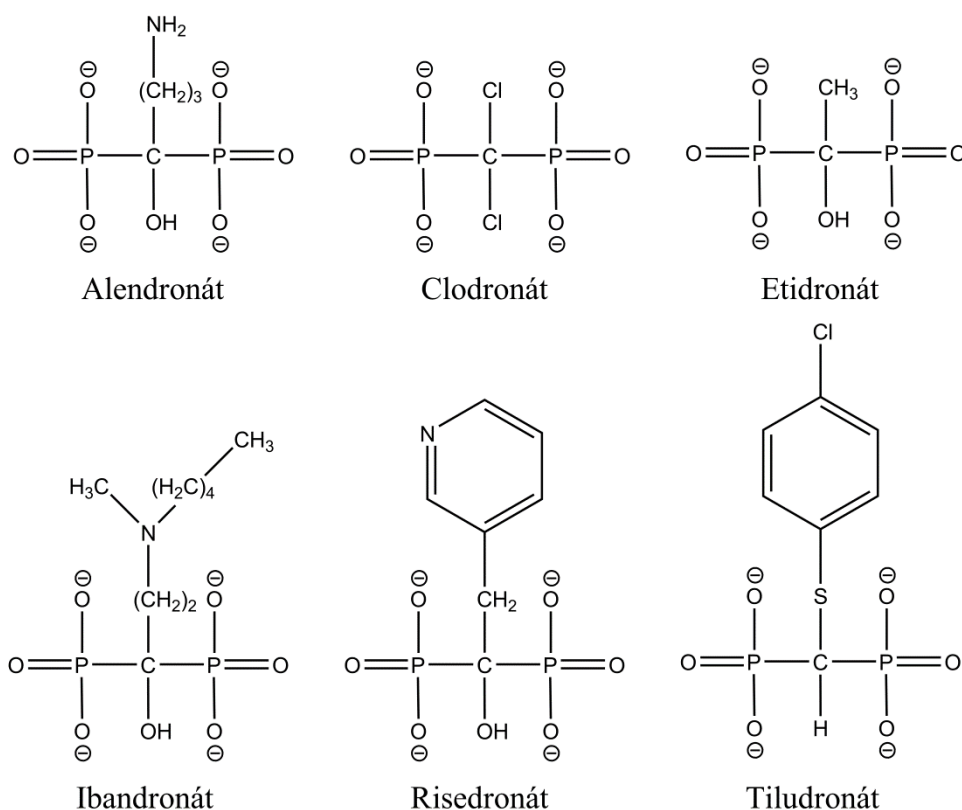
Obrázek 9: Přehled vybraných organofosforových sloučenin

Bis(fosfonáty) jsou skupinou látek obsahující alespoň 2 fosfonátové skupiny. Pokud se tyto dvě skupiny nacházejí na stejném atomu uhlíku a tvoří tak vazbu P–C–P, jedná se o geminální bis(fosfonáty), dále pro zjednodušení jen bisfosfonáty, analoga pyrofosfátu, který obsahuje vazbu P–O–P.



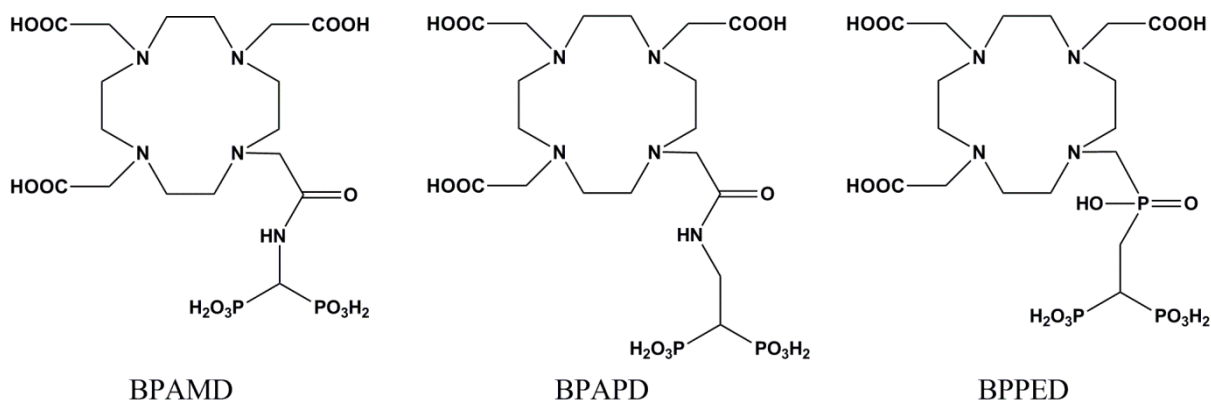
Vazba P–C–P je chemicky i tepelně velmi odolná a kompletně rezistentní vůči enzymatické hydrolýze. Bisfosfonáty mají silnou afinitu ke kovovým iontům, se kterými často tvoří v závislosti na pH nerozpustné komplexy. Dále se ochotně váží na hydroxoapatit a inhibují tak vznik, růst, agregaci i rozpouštění jeho krystalů. Afinita pro tento minerál, který je

hlavní součástí kostní tkáň, je základem použití bisfosfonátů pro léčbu nejrůznějších kostních onemocnění.



Obrázek 10: Komerční názvy vybraných bisfosfonátů^[21]

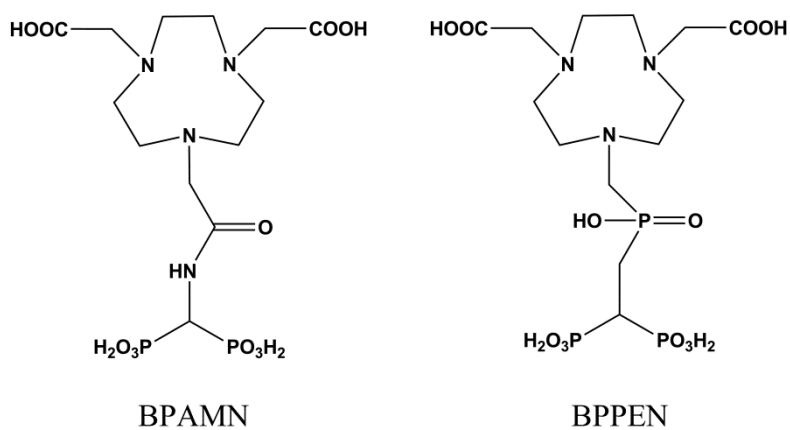
Dvě volné pozice na centrálním atomu uhlíku dovolují široké možnosti derivatizace. Připojením bisfosfonátové skupiny k vhodnému ligandu lze docílit selektivní dopravu radioaktivního izotopu daného kovu na kostní tkáň. Pro radiodiagnostické i terapeutické použití již byly popsány sloučeniny obsahující bisfosfonátové pendantní rameno připojené na skelet DOTA.^[22]



Obrázek 11: Známé ligandy pro cílenou dopravu kovu na kostní tkáň

2.6 Cíl práce

Cílem této práce je optimalizace syntézy a charakterizace nových ligandů pro selektivní komplexaci Ga^{3+} , spojujících výhody *in-vivo* stability a inertnosti komplexů typu Ga-NOTA s bisfosfonátovým pendantním ramenem, které by mělo být zodpovědné za selektivní navázání takového komplexu na kostní tkáň. Distribuce aktivity sledovaná pomocí ^{68}Ga -PET by pak měla sloužit jako spolehlivé vodítko při diagnostice kostních onemocnění.



Obrázek 12: Navrhované ligandy

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Použité chemikálie:

Všechny výchozí chemikálie a rozpouštědla byly použity z běžných komerčních zdrojů.

3.2 Metody charakterizace

Spektroskopie NMR

Spektra ^1H , ^{13}C , ^{31}P a ^{71}Ga byla měřena na přístrojích Varian VNMRS 300 a Varian VNMRS 400 na PřF UK ve standardních 5mm NMR kyvetách. Měřeno bylo při pokojové teplotě, pokud není uvedeno jinak. Hodnoty chemických posunů jsou uváděny v ppm s přesností na dvě desetinná místa pro ^1H a na jedno desetinné místo pro ^{13}C , ^{31}P a ^{71}Ga .

Standardy: $t\text{-BuOH}$, $\delta_H = 1,25$ ppm pro měření v D_2O ; $\delta_{\text{CH}_3} = 30,2$ ppm

TMS, $\delta_H = 0,00$ ppm pro měření v CDCl_3 ; $\delta_{\text{CDCl}_3} = 77,3$ ppm

H_3PO_4 , $\delta_P = 0,0$ ppm

$\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$, $\delta_{Ga} = 0,0$ ppm; $[\text{Ga}(\text{OH})_4]^-$, $\delta_{Ga} = 222,0$ ppm

Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektra byla získána pomocí spektrometru Bruker Esquire 3000 se zdrojem iontů pomocí metody ESI (Elektrospray Ionization) a detektorem IT (Ion Trap). Budou uvedeny intenzivní signály, které se podařilo jednoznačně přiřadit jednotlivým iontům.

Tenkvrstvá chromatografie (TLC)

Chromatografie na tenké vrstvě byly prováděny na hliníkových foliích s vrstvou silikagelu o tloušťce 0,2 mm značky Merck 1.05554.0001 F₂₅₄. Jako mobilní fáze byly použity různé směsi rozpouštědel, uvedené u konkrétních návodů v experimentální části. Nejběžnější směs ethanol + 25% NH_4OH je označena zkratkou EN(číslo), které udává objemový nadbytek ethanolu. Detekováno bylo pomocí 0,5 % roztoku ninhydrinu v EtOH, pomocí I_2 , nebo pod UV při vlnových délkách 254 a 366 nm.

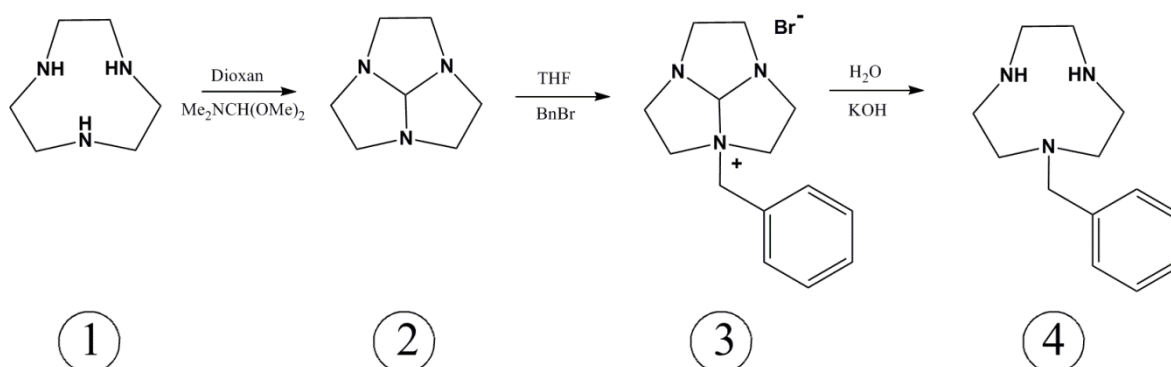
Elementární analýza

Elementární analýza byla prováděna servisním pracovištěm Ústavu makromolekulární chemie Akademie věd ČR. Výsledky jsou uváděny v hmotnostních procentech jako aritmetický průměr všech měření ve formátu nalezeno (vypočteno).

3.3 Vlastní syntéza

3.3.1 1-benzyl-1,4,7-triazacyklononan^[23,24]

Schéma 1:



2,00 g (1) bylo rozmícháno ve směsi 20 ml 1,4-dioxanu a 2,21 g (1,2 ekv.) $\text{Me}_2\text{NCH}(\text{OMe})_2$. Směs byla refluxována pod zpětným chladičem po dobu 3 hodin. Po vychladnutí na laboratorní teplotu byla odpařena do oleje (2) a bylo přidáno 15 ml THF. Velmi pomalu bylo za silného míchání přidáváno 3,44 g (1,2 ekv.) BnBr rozpuštěného v 15 ml THF, přičemž bylo pozorováno srážení světle žlutého prášku (3). Po přidání veškerého BnBr bylo přidáno ještě 10 ml THF a směs byla míchána přes noc. Meziprodukt (3) byl poté odfiltrován, promyt malým množstvím THF, rozpuštěn ve směsi 10 ml H_2O , 20 ml EtOH a 5 g KOH a směs byla přivedena k varu pod zpětným chladičem po dobu 3 dní. Průběh hydrolyzy byl sledován pomocí TLC. Směs byla poté odpařena na RVO, rozpuštěna v H_2O a produkt (4) byl extrahován do CHCl_3 . Spojené frakce obsahující produkt byly odpařeny na RVO, rozpuštěny v $\text{HCl} : \text{H}_2\text{O} 1:1$ a znovu odpařeny. Produkt byl rozpuštěn v malém množství vody a po přidavku EtOH krystalován v lednici. Takto bylo získáno 0,58 g (4). Opakovanou krystalizací s použitím ACN bylo získáno dalších 1,98 g (4). Celkový výtěžek reakce byl 2,48 g produktu (4), což činí 52 % teoretického množství. Reakce byla opakována v množství 3,00 g vstupní látky (1), rekrystalizace byla přitom provedena pomocí Et_2O přidaného do směsi $\text{H}_2\text{O} + \text{EtOH}$. Výsledkem bylo 4,6 g produktu (4), což činí 64 % teoretického množství. Výtěžky přepočteny na složení produkt.2HCl.H₂O, určeném pomocí elementární analýzy.

Charakterizace produktu (4):

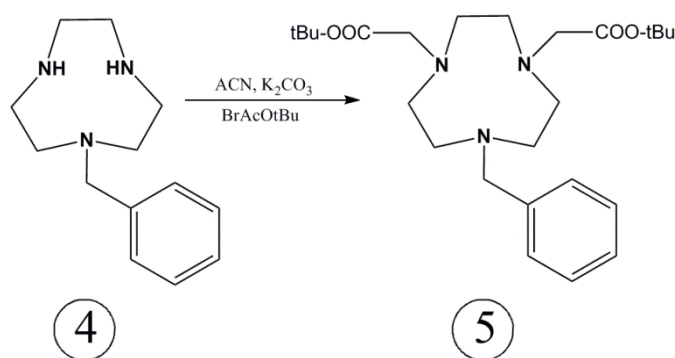
NMR (D_2O): ^1H δ 2,92 ($\text{CH}_2\text{—N}(\text{Bn})$, 4H, t, $^3J_{\text{HH}} = 5,4$ Hz); 3,10 ($\text{CH}_2\text{—CH}_2\text{—N}(\text{Bn})$, 4H, t,

$^3J_{\text{HH}} = 6,0 \text{ Hz}$); 3,50 (NH—CH₂—CH₂—NH, 4H, s); 3,80 (N—CH₂—C, 2H, s); 7,33 (arom, 5H, m); $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ δ 44,8 (CH₂—CH₂—N(Bn), 2C, s); 46,1 (NH—CH₂—CH₂—NH, 2C, s); 50,2 (CH₂—N(Bn), 2C, s); 61,6 (N—CH₂—C, 1C, s); 130,9 (C—CH—CH—CH, 1C, s); 131,4 (C—CH—CH—CH, 2C, s); 132,8 (C—CH—CH—CH, 2C, s); 137,8 (C—CH—CH—CH, 1C, s)
 MS: (+) 219,9 (M+H⁺)

Elementární analýza: C₁₃H₂₁N₃·2HCl·H₂O; C: 51,1 (50,3); H: 8,4 (8,1); N: 13,4 (13,5)

3.3.2 1-benzyl-4,7-bis(*t*Bu-acetyl)-1,4,7-triazacyklononan

Schéma 2:



50 mg (4) bylo rozmícháno ve směsi 5 ml suchého ACN a 122 mg (4,0 ekv.) K₂CO₃. Pomalu bylo přikapáno 79 mg (2,0 ekv.) *t*-butylbromacetátu rozpuštěného v 10 ml suchého ACN. Směs byla míchána za laboratorní teploty po 3 dny, průběh reakce byl sledován pomocí TLC. Poté byl pevný podíl odfiltrován a filtrát odpařen do oleje. Produkt byl vyčištěn chromatografií na sloupci silikagelu, eluce směsí EN20. Výsledkem bylo 84 mg produktu (5) ve formě bezbarvého oleje, což činí 87 % teoretického množství. Reakce byla opakována v množstvích shrnutých v tabulce 6.

Tabulka 6: Pokusy přípravy produktu (5)

| Pokus č. | Vstupní látka [mg] | BrAcOtBu [mg] | K ₂ CO ₃ [mg] | ACN [ml] | Produkt [mg] | Výtěžek [%] |
|----------|--------------------|---------------|-------------------------------------|-----------|--------------|-------------|
| 1 | 50 | 122 | 122 | 5 + 10 | 84 | 87 |
| 2 | 500 | 788 | 1115 | 50 + 100 | 870 | 90 |
| 3 | 2250 | 3550 | 5030 | 100 + 150 | 2620 | 60 |

Charakterizace produktu (5):

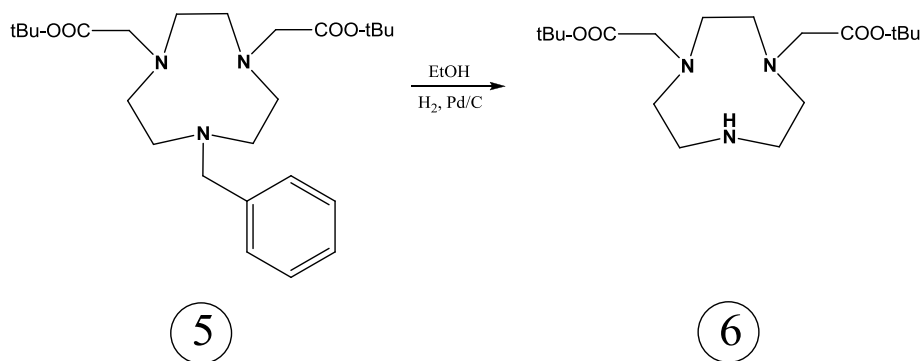
NMR (CDCl₃): ^1H δ 1,40 (C—(CH₃)₃, 18H, s); 2,84 (N(Bn)—CH₂—CH₂—N(ac), 8H, s); 2,92

(N(ac)—CH₂—CH₂—N(ac), 4H, s); 3,30 (N—CH₂—COO, 4H, s); 3,72 (N—CH₂—C, 2H, s); 7,30 (*H* arom, 5H, m); ¹³C{¹H} δ 30,3 (C—(CH₃)₃, 6C, s); 51,9 + 53,7 + 55,1 (C cykl, 2C + 2C + 2C, s); 60,3 (N—CH₂—COO, 2C, s); 61,6 (N—CH₂—C, 1C, s); 83,9 (C—(CH₃)₃, 2C, s); 131,3 - 133,0 (C arom, 5C, m); 172,8 (COO, 2C, s)

MS: (+) 448,1 (M+H⁺); 392,0 (M-tBu+2H⁺); 335,9 (M-2tBu+3H⁺)

3.3.3 1,4-bis(*t*Bu-acetyl)-1,4,7-triazacyklononan (*t*Bu-NO2A)

Schéma 3:

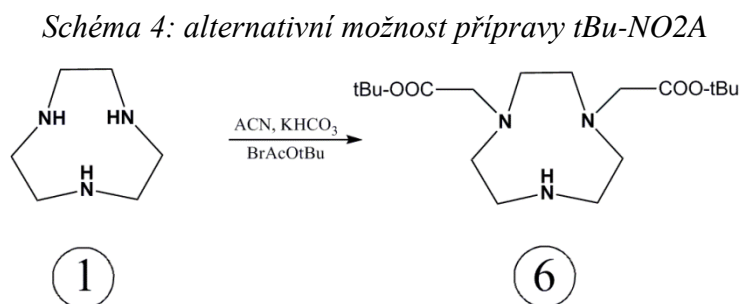


30 mg (5) bylo rozpuštěno ve směsi 3 ml vysušeného EtOH a 3 mg Pd/C katalyzátoru. Směs byla míchána za laboratorní teploty pod vodíkovou atmosférou po dobu 24 hodin. Podle TLC reakce probíhala velmi pomalu, směs byla proto zahřáta na 50 °C a míchána dalších 8 hodin. Pevný podíl byl odfiltrován, filtrát odpařen do oleje. Výsledkem bylo 20 mg, 83 % produktu (6). Reakce byla několikrát opakována při teplotě 50 °C po dobu 8 hodin v množstvích, která shrnuje tabulka 7.

Tabulka 7: Pokusy přípravy *t*Bu-NO2A:

| Pokus č. | Vstupní látka [mg] | EtOH [ml] | Pd/C [mg] | Produkt [mg] | Výtěžek [%] |
|----------|--------------------|-----------|-----------|--------------|-------------|
| 1 | 30 | 3 | 3 | 20 | 83 |
| 2 | 32 | 3 | 15 | 22 | 86 |
| 3 | 570 | 60 | 100 | 380 | 83 |
| 4 | 660 | 60 | 100 | 470 | 89 |
| 5 | 1320 | 120 | 300 | 923 | 87 |
| 6 | 870 | 80 | 150 | 660 | 95 |

Byla prozkoumána též možnost přímé syntézy podle schématu 4.



20 mg (1) bylo rozpuštěno ve směsi 2 ml ACN a 150 mg KHCO_3 . Za stálého míchání bylo přidáno 61 mg (2,1 ekv.) *t*-butylbromacetátu. Směs byla míchána za pokojové teploty přes noc. Výsledkem byla směs 1, 2 a 3x substituovaného derivátu TACN. Separační a čistící postup uvedený v literatuře^[25] se nepodařilo uspokojivě reprodukovat. Bylo vyzkoušeno ještě několik dalších možností přímé syntézy:

- 1) Různé poměry reaktantů, od 1,0 ekv. až po 2,0 ekv. *t*-butylbromacetátu
- 2) Použití K_2CO_3 místo KHCO_3
- 3) Alternativní rozpouštědla:
 - a) $\text{CHCl}_3 + \text{H}_2\text{O}$ za přítomnosti KHCO_3
 - b) NEt_3

Žádný těchto postupů nevedl k cílenému produktu v uspokojivém výtěžku a čistotě.

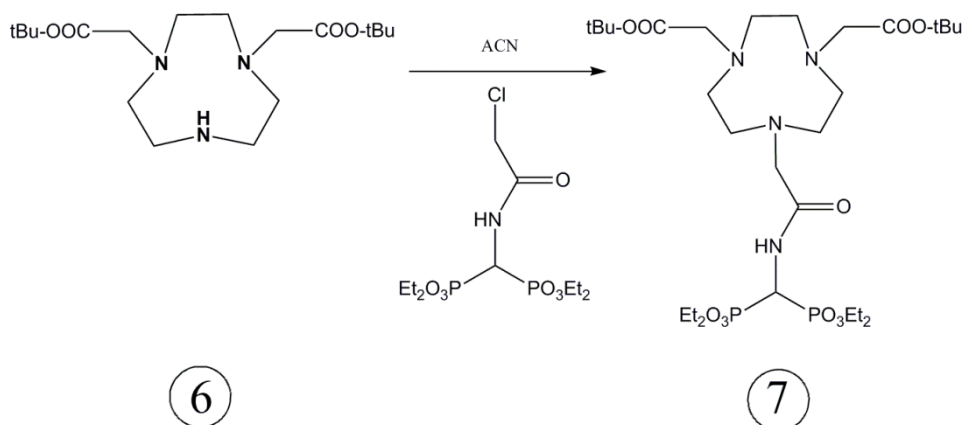
Charakterizace produktu (6):

NMR (CDCl_3): ^1H δ 1,41 ($\text{C}-(\text{CH}_3)_3$, 18H, s); 2,81 ($\text{N}(\text{ac})-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}(\text{ac})$, 4H, s); 3,08 ($\text{N}(\text{ac})-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}$, 4H, s); 3,23 ($\text{N}(\text{ac})-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}$, 4H, s); 3,40 ($\text{N}-\text{CH}_2-\text{COO}$, 4H, s); $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ δ 20,1 ($\text{C}-(\text{CH}_3)_3$, 6C, s); 44,5 ($\text{N}(\text{ac})-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}$, 2C, s); 49,0 ($\text{N}(\text{ac})-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}$, 2C, s); 51,7 ($\text{N}(\text{ac})-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}(\text{ac})$, 2C, s) 56,7 ($\text{N}-\text{CH}_2-\text{COO}$, 2C, s); 81,9 ($\text{C}-(\text{CH}_3)_3$, 2C, s); 170,7 (COO, 2C, s)

MS: (+) 358,0 ($\text{M}+\text{H}^+$); 301,9 ($\text{M}-1\text{tBu}+2\text{H}^+$); 245,8 ($\text{M}-2\text{tBu}+3\text{H}^+$)

3.3.4 *t*Bu-BPAMN

Schéma 5:



50 mg (6) bylo rozpuštěno ve směsi 2,5 ml vysušeného ACN a 100 mg čerstvě vyžíhaného K_2CO_3 . Za stálého míchání byla přikapána směs 93 mg (1,75 ekv.) amidového prekursoru ve 2,5 ml ACN. Reakční směs byla míchána za pokojové teploty, přičemž i po 5 dnech byla podle TLC v reakční směsi přítomna vstupní látka (6). Po zahřátí na 50 °C odreagovala veškerá vstupní látka během 24 hodin. Pevný podíl byl odfiltrován, filtrát odpařen do oleje. Nadbytek nezreagovaného amidu a ostatní nečistoty byly odděleny chromatografií na sloupci silikagelu elucí čistým EtOH. Produkt byl poté eluován směsí EN10. Spojené frakce obsahující produkt byly odpařeny na RVO a produkt (7) byl izolován ve formě nažloutlého oleje v množství 70 mg, což činí 79% teoretického množství. Reakce byla několikrát opakována při teplotě 50 °C a reakčním času 24 hodin v množstvích, která shrnuje tabulka 8.

Tabulka 8: Pokusy přípravy *t*Bu-BPAMN

| Pokus č. | <i>t</i> Bu-NO ₂ A [mg] | Amid [mg] | K_2CO_3 [mg] | ACN [ml] | Produkt [mg] | Výtěžek [%] |
|----------|------------------------------------|-----------|----------------|-----------|--------------|-------------|
| 1 | 50 | 93 | 100 | 2,5 + 2,5 | 70 | 79 |
| 2 | 196 | 365 | 400 | 10 + 10 | 220 | 57 |
| 3 | 470 | 774 | 1000 | 30 + 30 | 550 | 60 |
| 4 | 498 | 705 | 1000 | 30 + 30 | 730 | 75 |

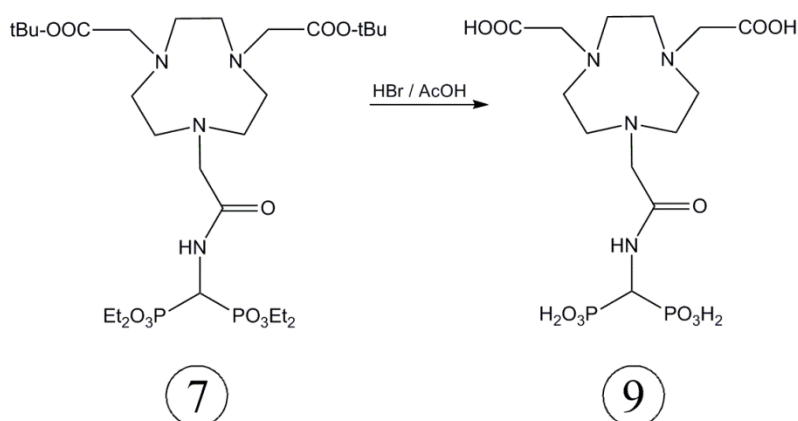
Charakterizace produktu 7:

NMR ($CDCl_3$): 1H δ 1,28 (P—O—CH₂—CH₃, 12H, t, $^3J_{HH} = 7,2$ Hz); 1,39 (C—(CH₃)₃, 18H, s); 2,71 (N(ac)—CH₂—CH₂—N(ac), 4H, s); 3,08 (N(ac)—CH₂—CH₂—N, 8H, s); 3,29

(N—CH₂—CO, 2H, s); 3,35 (N—CH₂—COO, 4H, s); 4,14 (P—O—CH₂—CH₃, 8H, m); 5,06 (NH—CH—P, td, ²J_{PH} = 23,1 Hz ³J_{HH} = 7,5 Hz); ¹³C{¹H} δ 16,3 (P—O—CH₂—CH₃, 4C, s); 28,1 (C—(CH₃)₃, 6C, s); 43,6 (NH—CH—P, 1C, t, ¹J_{PC} = 148 Hz); 55,3 (N(ac)—CH₂—CH₂—N(ac), 2C, s); 56,3 (N(ac)—CH₂—CH₂—N, 4C, s); 59,2 (N—CH₂—COO, 2C, s); 60,9 (N—CH₂—CO, 1C, s); 63,2 (P—O—CH₂—CH₃, 4C, d, ²J_{PC} = 10,0 Hz); 80,7 (C—(CH₃)₃, 2C, s); 171,7 (COO, 2C, s); 172,2 (CO, 1C, s); ³¹P{¹H} δ 17,2 (s)
 MS: (+) 701,4 (M+H⁺); 645,3 (M-1tBu+2H⁺); 589,2 (M-2tBu+3H⁺)

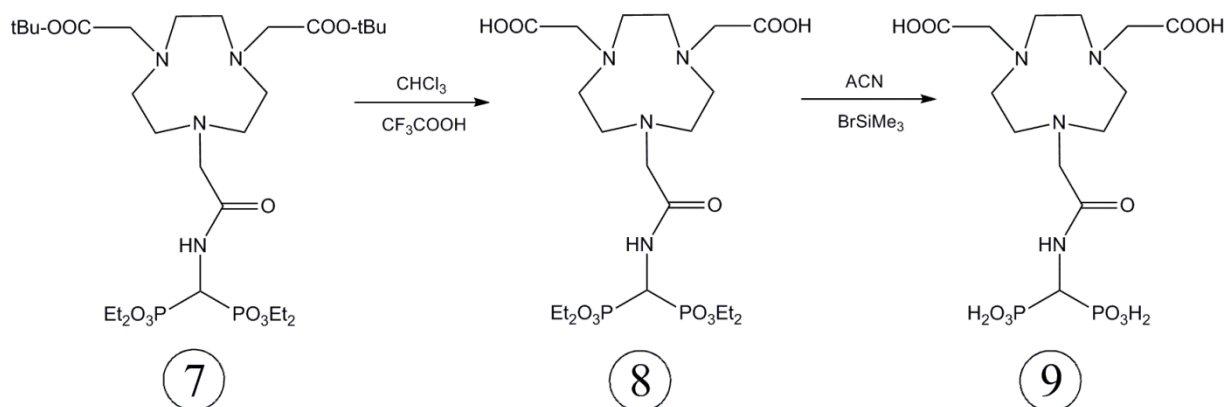
3.3.5 BPAMN

Schéma 6:



70 mg (7) bylo rozpuštěno v 15 ml směsi 33% bezvodého HBr v AcOH a směs byla míchána za pokojové teploty 24 hodin. Poté byla odpařena na RVO až na neodpařitelný zbytek (cca 1 ml), ze kterého bylo po přidavku 5 ml THF pozorováno srážení produktu. Tento zbytek byl dále 3x odpařen na RVO s THF a po posledním přidavku THF byl pevný podíl odfiltrován. Produkt byl čištěn pomocí silného katexu (eluze nečistot H₂O, eluce produktu 5 % NH₃), dále pomocí silného anexu (eluze nečistot H₂O, AcOH : H₂O 1 : 1; eluce produktu HCl : H₂O 1 : 1). Bylo získáno velmi malé množství produktu (9) detekovatelné pomocí hmotnostní a NMR spektroskopie. Postup byl opakován s 220 mg vstupní látky (7). Po průchodu přes iontoměničič byl produkt odpařen dosucha, rozpuštěn v minimu H₂O, převrstven MeOH a ponechán krystalovat v mrazničce. Bylo získáno 32 mg produktu (9), což činí 24 % teoretického množství. Podle ³¹P{¹H} NMR byla čistota vzorku odhadnuta na 85 %. Vzhledem k nízkému výtěžku předchozí reakce a obtížnému čištění produktu byl navržen alternativní postup deesterifikace podle schématu 7.

Schéma 7: Alternativní postup deesterifikace



500 mg (7) bylo rozpuštěno ve směsi 25 ml vysušeného CHCl_3 a 25 ml CF_3COOH a ponecháno míchat za tmy po dobu 8 hodin. Směs byla poté několikrát odpařena do oleje s CHCl_2 . Průběh reakce byl potvrzen absencí charakteristického signálu *t*-butylu v ^1H NMR spektru. Meziprodukt (8) byl jednou odpařen s ACN a rozpuštěn v 25 ml vysušeného ACN. Poté bylo pod proudem argonu přidáno 2,32 ml (20 ekv.) SiBrMe_3 a směs byla ponechána míchat za tmy po dobu dalších 8 hodin. Směs byla odpařena na předem vysušené RVO, poté ještě s ACN a dále se směsí $\text{MeOH} : \text{H}_2\text{O} 1 : 1$. Produkt (9) byl rozpuštěn v minimu vody a krystalován převrstvením MeOH v mrazničce. ^1H NMR spektrum potvrdilo kompletní deesterifikaci, avšak podle ^{31}P NMR bylo stále přítomno cca 10 % dalších nečistot. Produkt byl proto přečištěn pomocí silného anexu (eluce nečistot H_2O a $\text{AcOH} : \text{H}_2\text{O} 1 : 1$, eluce produktu $\text{HCl} : \text{H}_2\text{O} 1 : 1$) Po následné lyofilizaci bylo získáno 182 mg produktu ve formě bílého prášku, což činí 54 % teoretického množství vzhledem ke vstupní látce (7). Postup byl opakován se 770 mg vstupní látky (7), čímž bylo získáno dalších 403 mg (77%) produktu (9).

Charakterizace meziproduktu (8):

NMR (CD_3CN): ^1H δ 1,32 (P–O–CH₂–CH₃, 12H, td, $^3J_{\text{HH}} = 7,2$ Hz, $^4J_{\text{PH}} = 2,4$ Hz); 3,05 (N–CH₂–CH₂–N, 12H, s); 3,75 (N–CH₂–CO, 6H, s); 4,19 (P–O–CH₂–CH₃, 8H, m); 5,02 (NH–CH–P, td, $^2J_{\text{PH}} = 22,5$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 10,2$ Hz), 7,50 (NH–CH–P, d, $^3J_{\text{HH}} = 9,6$ Hz)ⁱ

Charakterizace produktu (9):

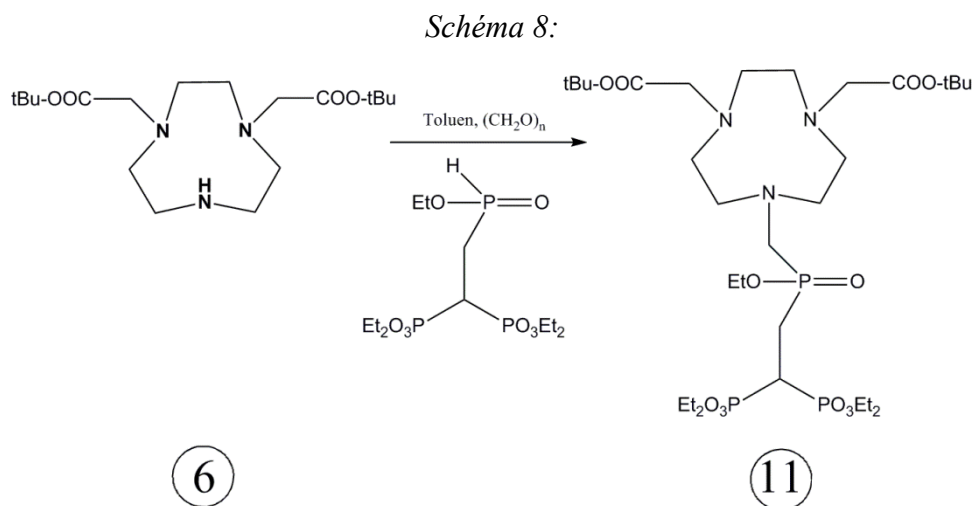
NMR (D_2O): ^1H δ 3,56 (N–CH₂–CH₂–N, 12H, s); 4,09 (N–CH₂–CO, 6H, s); 4,63 (NH–CH–P, t, $^2J_{\text{PH}} = 21,0$ Hz); $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ δ 47,8 (NH–CH–P, 1C, t, $^1J_{\text{PC}} = 125,6$ Hz); 51,6

ⁱ Při měření ^1H NMR meziproduktu (8) v MeOD poskytuje CH pouze triplet s $^2J_{\text{PH}} = 23,1$ Hz a NH není vidět.

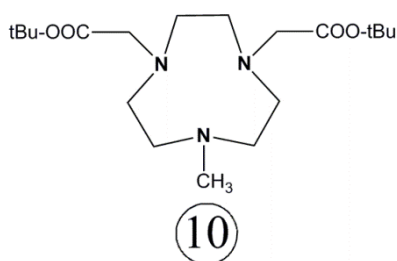
(N—CH₂—CH₂—N, 6C, s); 57,6 (N—CH₂—COO, 2C, s); 58,8 (N—CH₂—CO, 1C, s); 168,6 (CO, 1C, s); 172,0 (COO, 2C, s); ³¹P{¹H} δ 15,4 (s); ³¹P δ 15,4 (CH—P, d, ²J_{HP} = 20,2 Hz)
 MS: (–) 474,8 (M – H⁺)

Elementární analýza: C₁₃H₂₆N₄O₁₁P₂·3HCl·H₂O; C: 25,6 (25,9); H: 4,6 (5,1); N: 9,4 (9,3)

3.3.6 *t*Bu-BPPEN



50 mg (6) bylo rozpuštěno ve 3 ml vysušeného toluenu. Poté bylo přidáno 106 mg (2,0 ekv.) fosfinátového prekurzoru a 8,5 mg (2,0 ekv.) paraformaldehydu. Reakční směs byla míchána 8 hodin při teplotě 100 °C. Produkt (10) se nepodařilo izolovat v měřitelném množství. Podle intenzity skvrn na TLC destičce bylo odhadnuto, že reakce za těchto podmínek poskytla především nechtěný vedlejší produkt Mannichovy reakce, N-methyl derivát *t*BuNO₂A (10), který byl v reakční směsi identifikován a později charakterizován.



Obrázek 13: Vedlejší produkt Mannichovy reakce

Ve snaze optimalizovat průběh reakce ve prospěch cíleného produktu (10) byla teplota snížena na 50 °C a reakce byla opakována ve stejném množství. Pomocí TLC byla potvrzena přítomnost produktu (11) ve výrazně větším množství, než vedlejšího produktu (10). Reakční

směs byla poté odpařena dosucha a rozpuštěna v EtOH. Nečistoty byly odděleny chromatografií na sloupci silikagelu elucí čistým EtOH. Produkt byl poté eluován směsí EN50. Spojené frakce obsahující produkt byly odpařeny na RVO a produkt (10) byl izolován ve formě nažloutlého oleje v množství 40 mg, což činí 37% teoretického množství. Reakce byla několikrát opakována za podmínek shrnutých v tabulce 9.

Tabulka 9: Pokusy přípravy *t*Bu-BPPEN

| Pokus č. | <i>t</i> Bu-NO ₂ A [mg] | Fosfinát [mg] | (CH ₂ O) _n [mg] | Rozpouštědlo | Podmínky | Produkt [mg] | Výtěžek [%] |
|----------|------------------------------------|---------------|---------------------------------------|--------------|-------------|--------------|-------------|
| 1 | 50 | 106 | 8,5 | TOL, 3 ml | 100 °C, 8 h | - | - |
| 2 | 50 | 106 | 8,5 | TOL, 3 ml | 50 °C, 8 h | 40 | 37 |
| 3 | 140 | 309 | 23 | TOL, 10 ml | 50 °C, 8 h | 100 | 33 |
| 4 | 425 | 704 | 53 | ACN, 20 ml | 40°C, 48 h | 535 | 58 |
| 5 | 680 | 900 | 68 | ACN, 30 ml | 30°C, 48 h | 760 | 53 |

U pokusu č. 5 byl během čistění produktu na sloupci silikagelu elucí směsí EN10 izolován i vedlejší produkt (10). Spojené frakce obsahující tento produkt byly odpařeny na RVO a bylo získáno 270 mg (38%) produktu (10) ve formě nažloutlého oleje.

Charakterizace produktu (11):ⁱ

NMR (CDCl₃): ¹H δ díky překryvu různých signálů štěpených fosforem bylo možné jen orientační přiřazení; ¹³C{¹H} δ 20,5 (P–O–CH₂–CH₃, 5C, s); 26,2 (P–CH₂–CH–P, 1C, d, ¹J_{PC} = 82,9 Hz); 32,3 (C–(CH₃)₃, 6C, s); 34,1 (P–CH₂–CH–P, 1C, td, ¹J_{PC} = 132,1 Hz, ²J_{PC} = 26,9 Hz); 58,8 – 60,6 (N–CH₂–CH₂–N + N–CH₂–CO, 8C, m); 64,1 (N–CH₂–P, 1C, d, ¹J_{PC} = 95,1 Hz); 67,0 (P–O–CH₂–CH₃, 5C, s); 85,1 (C–(CH₃)₃, 2C, s); 174,9 (COO, 2C, s) ³¹P{¹H} δ 22,7 (P–CH₂–CH–P, 2P, d, ³J_{PP} = 21,7 Hz); 49,2 (P–CH₂–CH–P, 1P, t, ³J_{PP} = 20,8 Hz)

MS: (+) 764,4 (M+H⁺); 708,4 (M-1*t*Bu+2H⁺)

Charakterizace vedlejšího produktu (10):

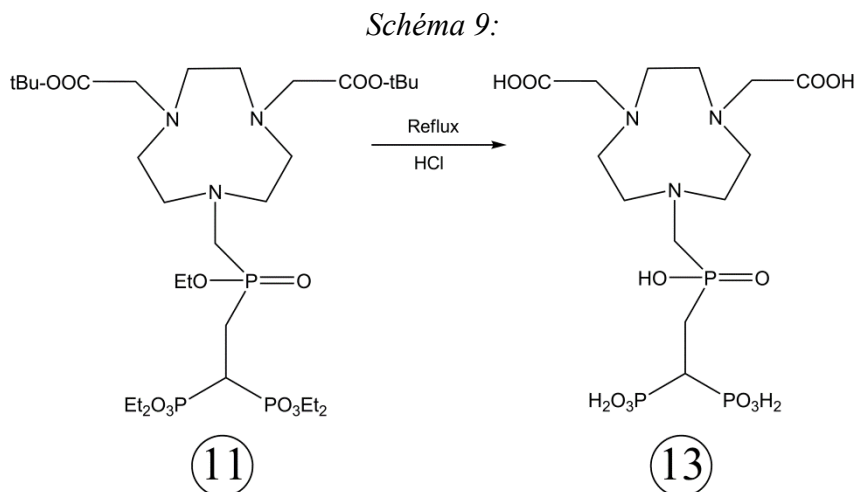
NMR (CDCl₃): ¹H δ 1,42 (C–(CH₃)₃, 18H, s); 2,69 (N(ac)–CH₂–CH₂–N(ac), 4H, s); 2,85

ⁱ Dostatečná čistota produktu (11) byla určena především pomocí TLC, ¹³C{¹H} a ³¹P{¹H} NMR

(N—CH₃, 3H, s); 3,03 (N(ac)—CH₂—CH₂—N—CH₃, 4H, m); 3,33 (N—CH₂—COO, 4H, s); 3,61 (N(ac)—CH₂—CH₂—N—CH₃, 4H, m)

MS: (+) 372,0 (M+H⁺)

3.3.7 BPPEN

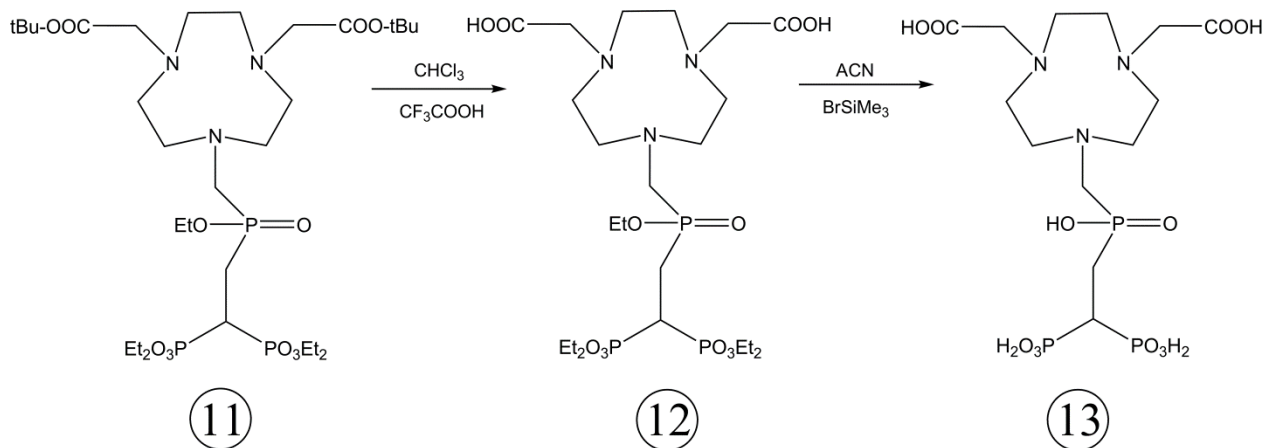


40 mg (11) bylo rozpuštěno ve směsi HCl : H₂O 1 : 1. a refluxováno po dobu 8 hodin. Reakční směs byla poté několikrát odpařena s vodou na RVO. Bylo získáno velmi malé množství produktu (13) detekovatelné pomocí NMR spektroskopie, která ukázala nekompletní průběh deesterifikační reakce. Na ¹H NMR spektru byly stále patrné signály ethylu a *t*-butylu. ³¹P{¹H} NMR potvrdilo, že ve směsi je přítomno více látek.

Obdobně, jako při deesterifikaci *t*Bu-BPAMN, byl i zde vyzkoušen alternativní postup deesterifikace podle schématu 10. 100 mg (11) bylo rozpuštěno ve směsi 5 ml vysušeného CHCl₃ a 5 ml CF₃COOH. Směs byla míchána za tmy po dobu 8 hodin a poté několikrát odpařena do oleje s CHCl₂. Průběh reakce byl potvrzen absencí charakteristického signálu *t*-butylu v ¹H NMR spektru. Meziprodukt (12) byl jednou odpařen s ACN a rozpuštěn v 5 ml vysušeného ACN. Poté bylo pod proudem argonu přidáno 0,506 ml (25 ekv.) SiBrMe₃ a směs byla ponechána míchat za tmy po dobu dalších 8 hodin. Směs byla odpařena na předem vysušené RVO, poté ještě s ACN a dále se směsí MeOH : H₂O 1 : 1. Produkt byl rozpuštěn v minimu vody a krystalizován převrstvením MeOH v mrazničce. ¹H NMR spektrum potvrdilo kompletní deesterifikaci produktu. Podle ³¹P{¹H} byla čistota produktu odhadnuta na 80 %. Produkt byl dále čištěn na sloupci silného katexu. Nečistoty byly eluovány vodou, produkt 5% NH₃. Produkt byl odpařen na RVO a lyofilizován z H₂O. Bylo získáno 31 mg (47%) produktu (13) ve formě bílého prášku. Reakce byla opakována v množstvích, která

shrnuje tabulka 10. Při dalších pokusech probíhalo finální čištění produktu chromatografií na sloupci silného katexu, s použitím čisté H₂O jako mobilní fáze. Spojené frakce obsahující produkt byly poté odpařeny na RVO a lyofilizovány z H₂O.

Schéma 10: Alternativní postup deesterifikace



Tabulka 10: Pokusy deesterifikace tBu-BPPEN

| Pokus č. | tBu-BPPEN [mg] | CF ₃ COOH + CHCl ₃ [ml] | SiBrMe ₃ + ACN [ml] | Produkt [mg] | Výtěžek [%] |
|----------|----------------|---|--------------------------------|--------------|-------------|
| 1 | 100 | 5 + 5 | 0,506 + 5 | 31 | 47 |
| 2 | 500 | 25 + 25 | 2,50 + 25 | 134 | 40 |
| 3 | 810 | 30 + 30 | 4,84 + 25 | 295 | 54 |

Charakterizace produktu (13):

NMR (D₂O): ¹H δ 2,17 (P–CH₂–CH–P, 2H, m); 2,31 (P–CH₂–CH–P, 1H, m); 3,25 (N–CH₂–P, d, ²J_{PH} = 5,7 Hz); 3,30 (CH₂–N(ac)–CH₂, 8H, s); 3,34 (CH₂–N(P)–CH₂, 4H, s); 3,70 (N–CH₂–COO, 4H, s); ¹³C{¹H} δ 28,8 (P–CH₂–CH–P₂, 1C, d, ¹J_{PC} = 91,8 Hz); 34,7 (P–CH₂–CH–P₂, 1C, t, ¹J_{PC} = 118,3 Hz); 51,3 + 52,2 + 52,9 (C cykl, 2C + 2C + 2C, s); 57,0 (N–CH₂–P, 1C, d, ¹J_{PC} = 91,8 Hz); 58,9 (N–CH₂–COO, 2C, s); 174,0 (COO, 2C, s); ³¹P{¹H} δ 18,6 (P–CH₂–CH–P, 2P, d, ³J_{PP} = 24,6 Hz); 33,3 (P–CH₂–CH–P, 1P, t, ³J_{PP} = 24,1 Hz)

MS: (–) 509,8 (M – H⁺)

Elementární analýza: C₁₃H₂₈N₃O₁₂P₃·4NH₄Cl; C: 22,0 (21,5); H: 6,2 (6,1); N: 13,7 (13,5)

3.4 Sorpce Fe komplexů na hydroxoapatit

a) komplex Fe-BPAMN

Příprava 10 mM zásobního roztoku komplexu: 47,6 mg (100 μmol) BPAMN bylo rozpuštěno v 0,9 ml 0,1 M roztoku Fe^{3+} (90 μmol). Hodnota pH byla upravena na 7 pomocí 0,5 M NaOH a roztok byl doplněn vodou do 10 ml a zahříván 1 hodinu na teplotu 80 °C. Bylo připraveno 18 vzorků o konstantním objemu 3 ml obsahujících hydroxoapatit (Fluka, specifický povrch 63 $\text{m}^2\cdot\text{g}^{-1}$), 1M Tris-HCl pufr a zásobní roztok komplexu podle následující tabulky:

Tabulka 11: Složení vzorků komplexu Fe-BPAMN

| Vzorek č. | HA [mg] | Tris-HCl [ml] | komplex [ml] | voda [ml] |
|-----------|---------|---------------|--------------|-----------|
| 1 | 50 | 0,30 | 0,06 | 2,64 |
| 2 | 50 | 0,30 | 0,12 | 2,58 |
| 3 | 50 | 0,30 | 0,18 | 2,52 |
| 4 | 50 | 0,30 | 0,24 | 2,46 |
| 5 | 50 | 0,30 | 0,30 | 2,40 |
| 6 | 50 | 0,30 | 0,36 | 2,34 |
| 7 | 50 | 0,30 | 0,42 | 2,28 |
| 8 | 50 | 0,30 | 0,48 | 2,22 |
| 9 | 50 | 0,30 | 0,60 | 2,10 |
| 10 | 10 | 0,30 | 0,30 | 2,40 |
| 11 | 20 | 0,30 | 0,30 | 2,40 |
| 12 | 30 | 0,30 | 0,30 | 2,40 |
| 13 | 50 | 0,30 | 0,30 | 2,40 |
| 14 | 70 | 0,30 | 0,30 | 2,40 |
| 15 | 100 | 0,30 | 0,30 | 2,40 |
| 16 | 150 | 0,30 | 0,30 | 2,40 |
| 17 | 200 | 0,30 | 0,30 | 2,40 |
| 18 | 250 | 0,30 | 0,30 | 2,40 |
| reference | 0 | 0,30 | 0,60 | 2,10 |

Vzorky byly míchány otáčením celých vialek po dobu 3 dní, pevný podíl byl poté odfiltrován a po desetinásobném zředění bylo proměřeno UV-VIS spektrum a odečtena absorbance při 250, 275 a 300 nm. Fit experimentálních dat a výpočet parametrů křivky byl proveden pomocí software Scientist.

b) komplex Fe-BPPEN

Příprava 10 mM zásobního roztoku komplexu: 25,6 mg (50 μmol) BPPEN bylo rozpuštěno v 0,4 ml 0,1 M roztoku Fe^{3+} (40 μmol). Hodnota pH byla upravena na 7 pomocí 0,5 M NaOH a roztok byl doplněn vodou do 10 ml a zahříván 1 hodinu na teplotu 80 °C. Bylo připraveno 12 vzorků o konstantním objemu 3 ml obsahujících hydroxoapatit (HA), 1M Tris-HCl pufr a zásobní roztok komplexu podle následující tabulky:

Tabulka 12: Složení vzorků komplexu Fe-BPPEN

| Vzorek č. | HA [mg] | Tris-HCl [ml] | komplex [ml] | voda [ml] |
|-----------|---------|---------------|--------------|-----------|
| 1 | 50 | 0,30 | 0,05 | 2,65 |
| 2 | 50 | 0,30 | 0,10 | 2,60 |
| 3 | 50 | 0,30 | 0,15 | 2,55 |
| 4 | 50 | 0,30 | 0,20 | 2,50 |
| 5 | 50 | 0,30 | 0,25 | 2,45 |
| 6 | 50 | 0,30 | 0,30 | 2,40 |
| 7 | 50 | 0,30 | 0,35 | 2,35 |
| 8 | 50 | 0,30 | 0,40 | 2,30 |
| 9 | 50 | 0,30 | 0,45 | 2,25 |
| 10 | 50 | 0,30 | 0,50 | 2,20 |
| 11 | 50 | 0,30 | 0,55 | 2,15 |
| 12 | 50 | 0,30 | 0,60 | 2,10 |
| reference | 0 | 0,30 | 0,60 | 2,10 |

Vyhodnocení výsledků proběhlo shodně jako v případě komplexu Fe-BPAMN

c) komplexy Fe-BPAMD a Fe-BPPED

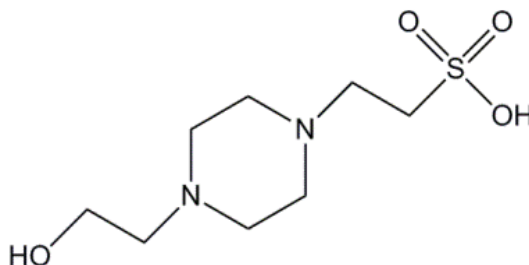
Složení vzorků a vyhodnocení výsledků bylo shodné jako v případě komplexu Fe-BPPEN. Zásobní roztoky komplexů (10 mM, 5 ml) byly připraveny rovněž stejným způsobem.

3.5 Komplexace ^{68}Ga

Komplexace ^{68}Ga byla prováděna na Johannes-Guttenberg Universität Mainz v Německu. Pro získání ^{68}Ga byl použit generátor výrobce Eckert & Ziegler. Čištění eluátu bylo prováděno pomocí kationtového iontoměniče. Finální objem jedné eluce obsahující ^{68}Ga byl 1,0 ml a aktivita eluátu se pohybovala v rozmezí cca. 100 – 300 MBq, podle času uplynulého od předchozí eluce (viz. str.13, graf č.1). Zásobní roztoky obou ligandů byly připraveny rozpuštěním 1,0 mg ligandu v 1,0 ml vody. Byla zkoumána závislost radiochemického výtěžku na pH.

Tabulka 13: Složení vzorků pro studium radiochemického výtěžku

| pH | Složení vzorku |
|--|---|
| 1,3 | 400 μl 0,05 M NH_4Ac pufru + 400 μl eluátu ^{68}Ga + 40 μl 4M HCl |
| 3,1 | 400 μl HEPES pufru + 400 μl eluátu ^{68}Ga + 5 μl 4M HCl |
| 4,2 | 400 μl HEPES pufru + 400 μl eluátu ^{68}Ga |
| 6,9 | 400 μl HEPES pufru + 400 μl eluátu ^{68}Ga + 20 μl NH_4OH |
| Složení HEPES pufru: 277 mg HEPES + 8,0 ml 0,1 M HCl | |



Obrázek 14: 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonová kyselina (HEPES)

Ke každému vzorku bylo přidáno 14,3 μl zásobního roztoku BPAMN, nebo 15,3 μl zásobního roztoku BPPEN (30 nmol ligandu). Molární nadbytek ligandu vůči kovu se za těchto podmínek pohyboval v řádech 10^4 . Vzorky byly poté umístěny do lázně termostatované na 95 °C a během reakce byly v daných časových intervalech odebírány standardy pro vyhodnocení pomocí TLC. Mobilní fáze pro TLC byla složena ze 2 roztoků, smíchaných těsně před použitím v poměru 2:1

roztok 1: 9 ml H_2O + 0,6 ml 37 % HCl + 88 ml acetonu

roztok 2: acetylaceton

Byly použity silikové TLC destičky značky Merck. Rozložení aktivity na TLC destičce bylo následně vyhodnoceno pomocí přístroje Packard Bell Imager.

Dále byla studována závislost radiochemického výtěžku na teplotě. Byly připraveny vzorky o složení odpovídajícímu pH 4,2 a sledována kinetika reakce při teplotách 40, 60 a 95°C.

Biodistribuční studie byly prováděny s laboratorními potkany. 1 hodinu po injekci aktivity byla zvířata usmrcena a po extrakci orgánů byla změřena jejich aktivita. Výsledná hodnota je aritmetickým průměrem ze 3 experimentů.

3.6 Komplexace Ga^{3+} sledovaná pomocí ^{71}Ga a ^{31}P NMR

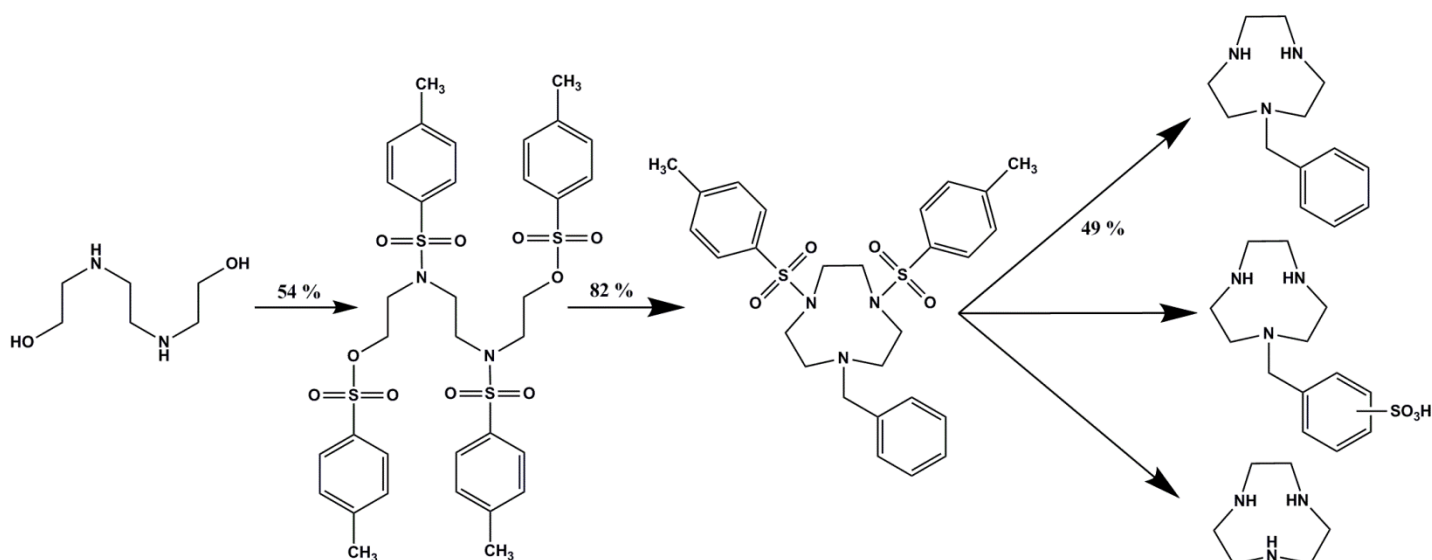
30 mg každého ligandu bylo rozpuštěno v 0,4 ml 0,5 M roztoku octanu sodného. Bylo přidáno 0,5 ekv. Ga^{3+} ve formě 1M roztoku $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$ a pH bylo upraveno na 4,5 pomocí 2M NaOH . Vzorky byly přemístěny do NMR kyvety a umístěny do lázně termostatované na 80 °C. V daných časových intervalech byla komplexační reakce zpomalena krátkým umístěním NMR kyvety do lázně s ledem a poté byla změřena spektra ^{71}Ga , ^{31}P a $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ NMR. Měření ^{71}Ga bylo referencováno a kvantifikováno vůči insertu $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$ ($\delta_{\text{Ga}} = 0$ ppm), případně $[\text{Ga}(\text{OH})_4]^-$ ($\delta_{\text{Ga}} = 222$ ppm).

4. VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 Chemická syntéza

Pokusy o přípravu monosubstituovaného derivátu TACN již byly dříve provedeny mimo rámec této diplomové práce podle schématu 11.^[26] Ukázalo se, že tento postup je neefektivní, zejména díky obtížím při posledním kroku syntézy, detosylaci 1-benzyl-4,7-ditosyl-1,4,7-triazacyklononanu (TACNBnTs₂). Detosylace byla prováděna pomocí koncentrované H₂SO₄ a reakci se podařilo optimalizovat na výtěžek 49 % cílené látky TACNBn. Bylo zjištěno, že dochází k sulfonaci aromatického cyklu v různých polohách a separace cílového produktu a sulfonovaných vedlejších produktů byla velmi obtížná. Ostatní obecně používané způsoby detosylace, např. pomocí směsi 30% HBr v AcOH^[27], nebo směsi HBr a červeného fosforu^[28], se nepodařilo reprodukovat.

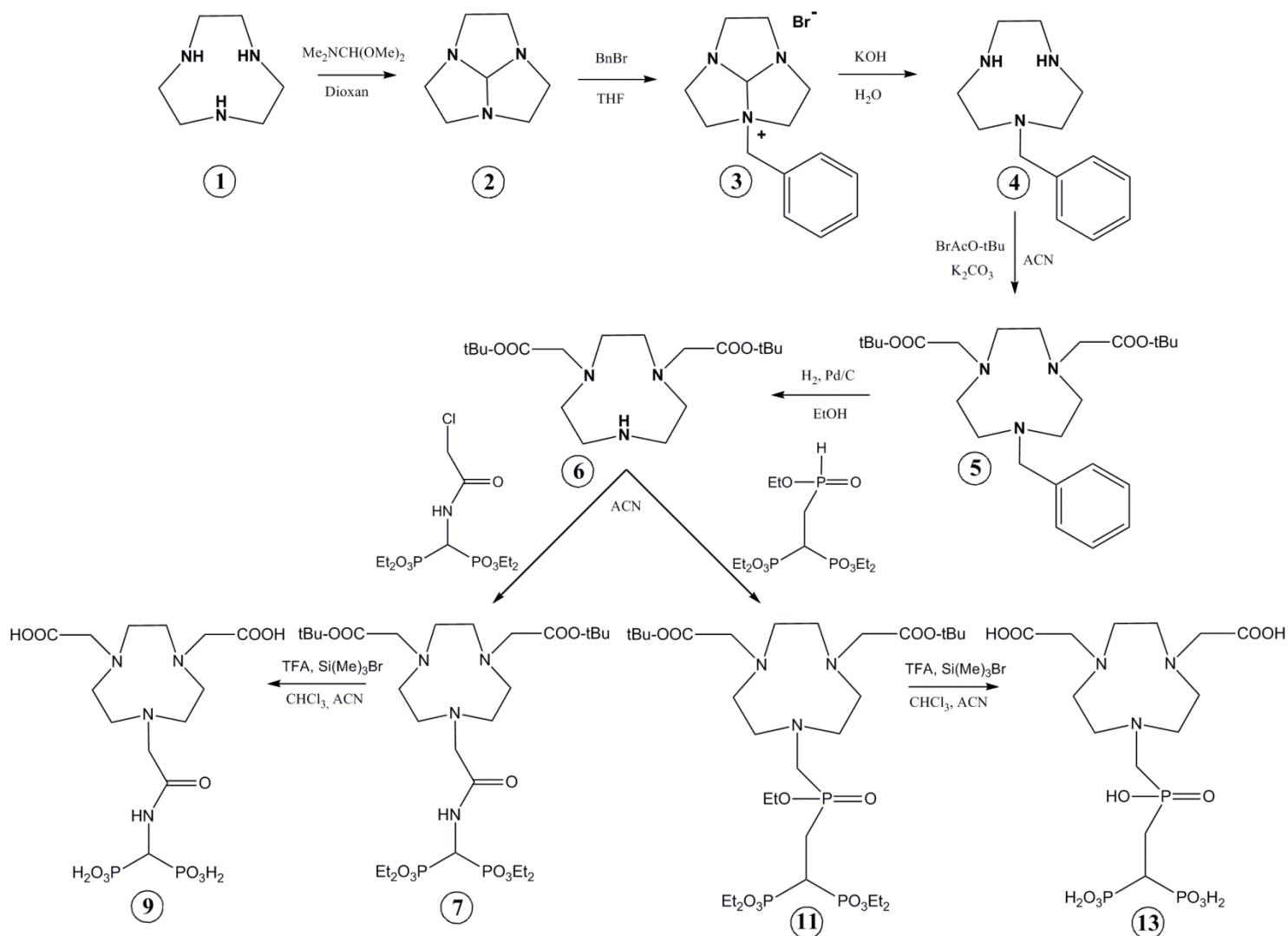
Schéma 11: Dřívější postup přípravy TACNBn



Pro tuto diplomovou práci byl proto zvolen časově úspornější postup podle schématu 12, který poskytuje výtěžek produktu (4) až 64 %. Nevýhodou tohoto postupu je pouze vysoká cena vstupní látky, čistého TACN.

U následné reakce TACNBn s *t*-butylbromoacetátem byl dodržován poměr reaktantů nejvýše 2,0 : 1 kvůli obavám o možnou kvarternizaci dusíkových atomů, pokud by byl *t*-butylbromoacetát ve větším nadbytku. Škálování reakce z množství 50 mg na 500 mg vstupní látky neovlivnilo vysoký výtěžek produktu (5), který činil 87, resp. 90 %. Po dalším rozšíření reakce na 2250 mg vstupní látky výtěžek poklesl na 60 %.

Schéma 12: Kompletní postup syntézy

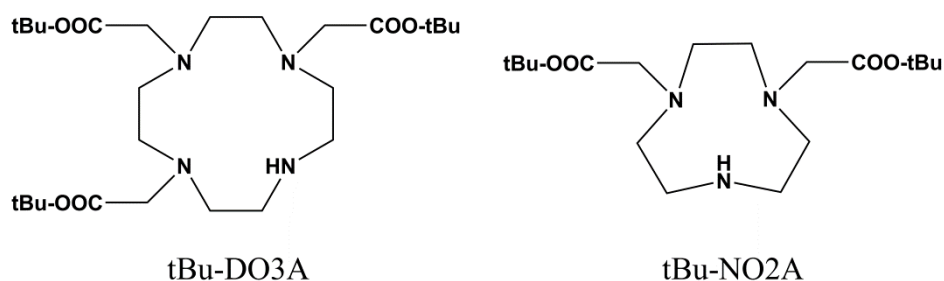


Při následné debenzylaci pomocí hydrogenační reakce s Pd/C katalyzátorem se ukázalo, že za obvyklých podmínek (RT, hmotnostní poměr katalyzátor : vstupní látka = 1 : 10) probíhá reakce velmi pomalu a vstupní látka byla v reakční směsi detekovatelná i po několika dnech. Při zvýšení teploty na $50\text{ }^\circ\text{C}$ a hmotnostního poměru katalyzátoru na hodnoty okolo 1 : 5 odreagovala veškerá vstupní látka do 8 hodin. Tato reakce byla úspěšně škálována z množství 30 mg až po 1320 mg vstupní látky s výtěžky produktu (6) v rozmezí 83 – 95 %.

Byly též vyzkoušeny možnosti přímé syntézy disubstituovaného produktu (6) z čistého TACN. Žádný z těchto pokusů ale nevedl k cílenému produktu v uspokojivém výtěžku a čistotě a vzhledem k již optimalizovanému postupu přípravy produktu (6) přes chráněné meziproducty (4) a (5) popsanému výše bylo od přímé syntézy dále ustoupeno.

Navázání bisfosfonátového pendantního ramene s amidovým linkerem na volný atom

dusíku již bylo popsáno v literatuře^[29] pro tBu-DO3A, 3x substituovaný derivát DOTA. Reakce však za uvedených podmínek (24 hodin, RT) nebyla dokončena, a i po 5 dnech obsahovala reakční směs ve větším množství vstupní látku. Po zahřátí na 50 °C veškerá vstupní látka odreagovala během 24 hodin. Molární poměr acetamid : makrocyklus bylo při dalších pokusech možno snížit z původních 1,75 : 1 na 1,50 : 1 při současném zvýšení výtěžku produktu (7) až na 75 %. Deesterifikační reakce za podmínek uvedených v literatuře pro analogický derivát tBu-DO3A (33% bezvodý HBr v AcOH) vedle k cílovému produktu s výtěžkem pouze 24 %. Byla proto navržena dvoukroková deprotektace pomocí trifluoroctové kyseliny a trimethylsilylbromidu. V prvním kroku je reakcí s TFA eliminován *t*-butyl. Reakce byla potvrzena kompletní absencí charakteristického signálu *t*-butylu v ¹H NMR spektru. V druhém kroku dojde reakcí se SiBr(Me)₃ k substituci ethyl esteru za silyl ester a následná hydrolyza po odpaření reakční směsi a přidání vody poskytla cílový produkt (9) s výtěžkem až 77 %.



Obrázek 15: Deriváty makrocyklů s jednou volnou pozicí na atomu dusíku

Pokus o navázání bisfosfonátového pendantního ramene s fosfinátovým linkerem byl rovněž nejprve proveden podle analogické reakce tBu-DO3A uvedené v literatuře.^[30] Za daných podmínek (toluen, 8 hodin, 100 °C) se cílový produkt nepodařilo izolovat a reakce poskytla pouze vedlejší produkt Mannichovy reakce, N-methyl derivát tBu-NO2A. Snížení teploty na 50 °C již vedlo k cílenému produktu (11) s výtěžkem 37 %. Další snížení teploty na 40°C, použití acetonitrilu místo toluenu a snížení molárních nadbytků paraformaldehydu a fosfinátového prekursoru vůči makrocyklu z 2,0 : 1 na 1,5 : 1 vedlo k výtěžku až 58 %. Deesterifikace produktu (11) byla rovněž nejprve vyzkoušena podle publikovaného postupu pro analogický derivát tBu-DO3A, který nebyl úspěšný, neboť i po 8 hodinách refluxu ve směsi HCl : H₂O 1 : 1 byly na ¹H NMR spektru stále patrné výrazné signály ethylu a *t*-butylu. Byla proto rovněž vyzkoušena dvoukroková deprotektace pomocí TFA a SiBr(Me)₃, poskytující výtěžek cílové látky (13) až 54 %.

4.2 Výsledky sorpčních studií

Termodynamické parametry sorpcí jsou nejčastěji popsány pomocí Langmuirovy, případně Langmuirovy-Freundlichovy adsorpční isotermy (rovnice 1), kde X je specifické adsorbované množství ($\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}$), X_m je maximální sorpční kapacita ($\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}$), K je afinitní konstanta ($\text{dm}^3\cdot\text{mol}^{-1}$), c je koncentrace volného komplexu v roztoku ($\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$) a n je koeficient popisující vzájemné interakce mezi adsorbovanými molekulami.

$$\frac{X}{X_m} = \frac{(Kc)^n}{1+(Kc)^n} \quad (1)$$

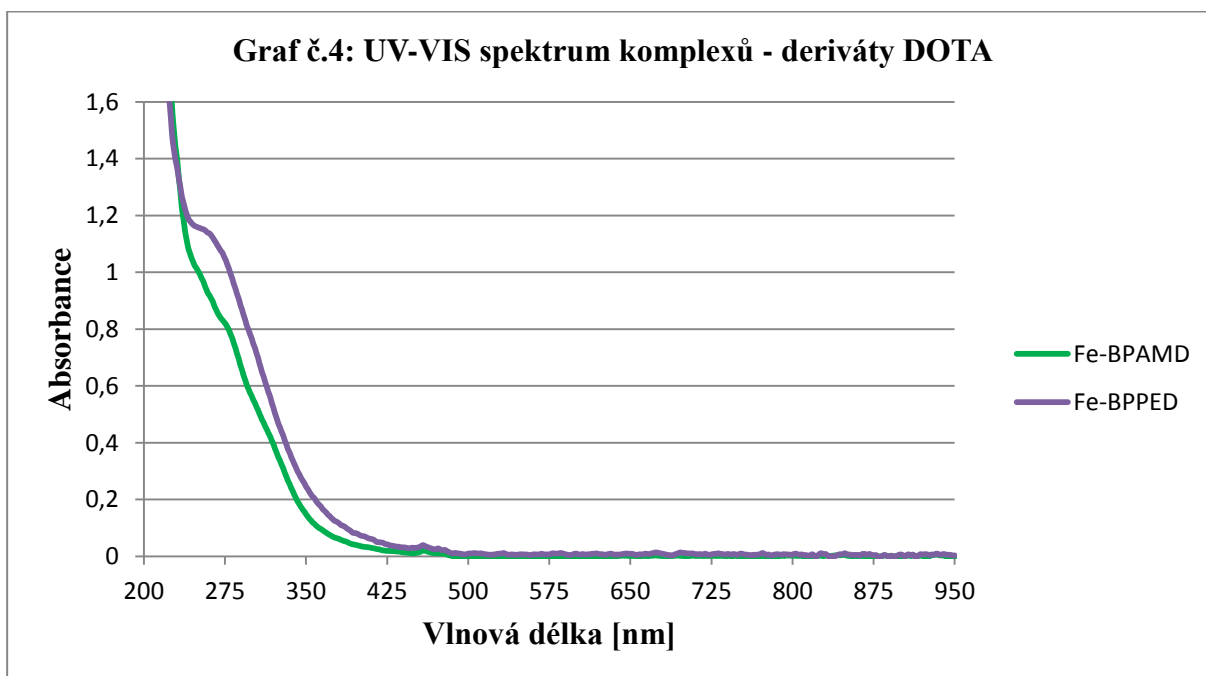
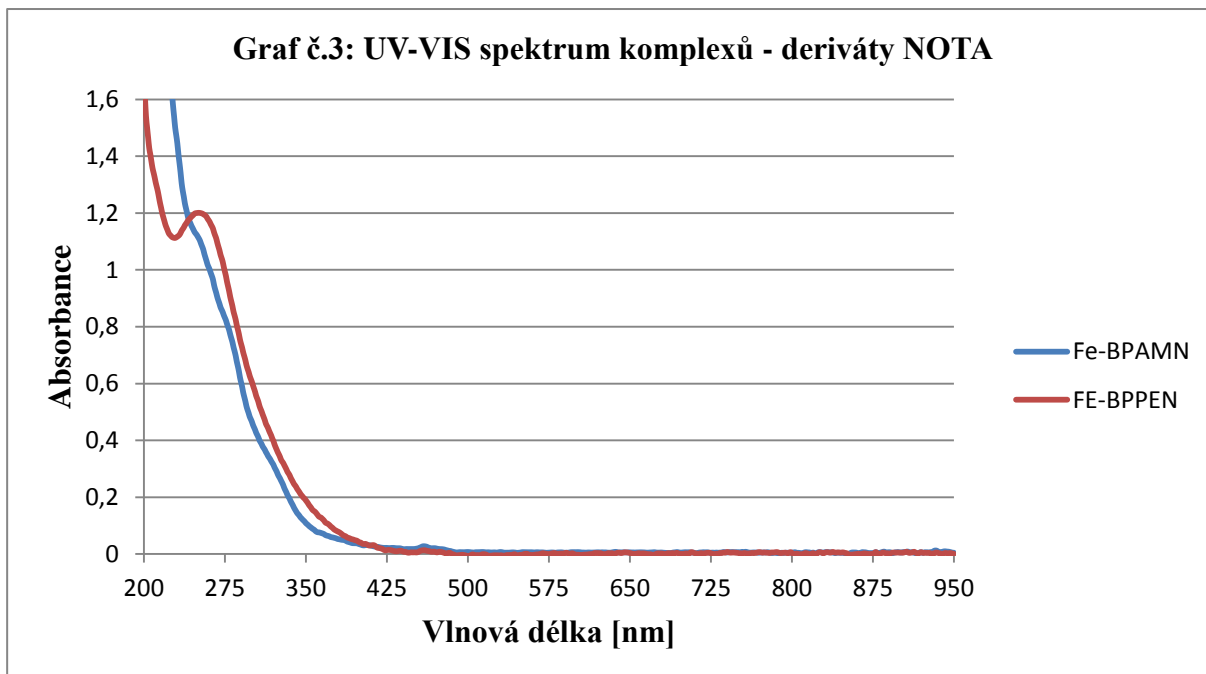
Langmuirův model ($n = 1$) považuje povrch sorbentu jako homogenní a zanedbává vzájemné interakce mezi molekulami. Langmuirův-Freundlichův model ($0 < n < 1$) uvažuje, že adsorpční energie mají díky nehomogenitě povrchu nebo vzájemné interakci mezi sorbovanými částicemi (například coulombické odpuzování) exponenciální distribuci. Veličiny K a X_m jsou pro daný systém konstantní a jejich vzájemnou závislost lze upravit do podoby rovnice 2.

$$K^n = \frac{X}{c^n(X_m - X)} \quad (2)$$

Vynesením závislosti specifického adsorbovaného množství komplexu X na koncentraci volného komplexu c lze získat křivku, jejíž hodnoty X se pro velké hodnoty koncentrace blíží X_m a sklon křivky pro nízké koncentrace, spolu s X_m určují afinitní konstantu K . Koncentrace volného komplexu c se určí porovnáním absorbance standardu o známé koncentraci proti absorbanci vzorku a hodnota X se určí podle vztahu (3), kde n_{tot} je celkové látkové množství komplexu v systému (mol), n_{vol} je látkové množství volného komplexu v roztoku (mol) a m_{HA} je hmotnost hydroxoapatitu ve vzorku (g).

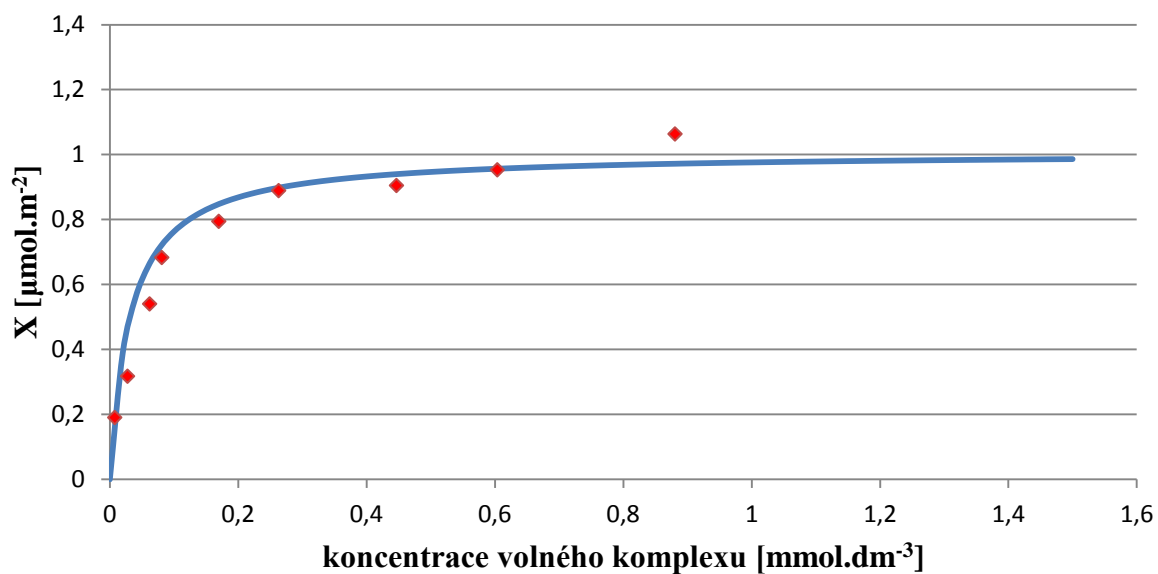
$$X = \frac{n_{tot} - n_{vol}}{m_{HA}} \quad (3)$$

Ke studiu sorpce na hydroxoapatit byly zvoleny komplexy železa, díky možnosti sledovat reakci pomocí UV-VIS spektroskopie. Z chemického hlediska lze očekávat velmi podobné chování jako u komplexů gallia, u kterých však sorpce touto metodou díky absenci CT pásu v UV-VIS oblasti sledovat nelze.

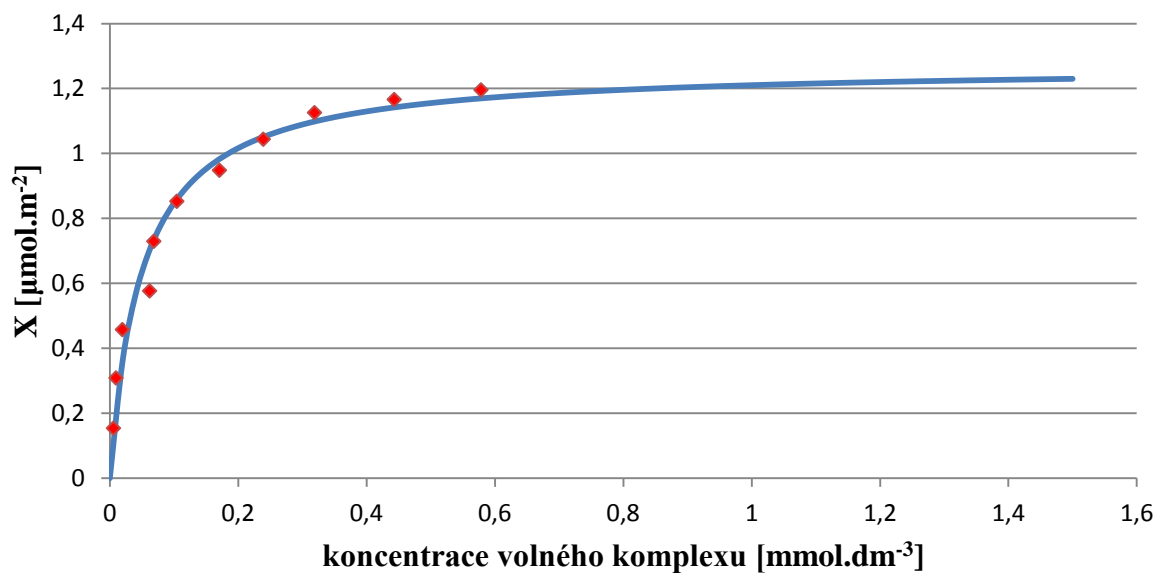


Ze spekter je patrný CT pás Fe←L se středem okolo 275 nm. U komplexů s analogickým fosfinátovým linkerem lze pozorovat mírný posun pásu směrem k delším vlnovým délkám oproti komplexům s amidovým linkerem.

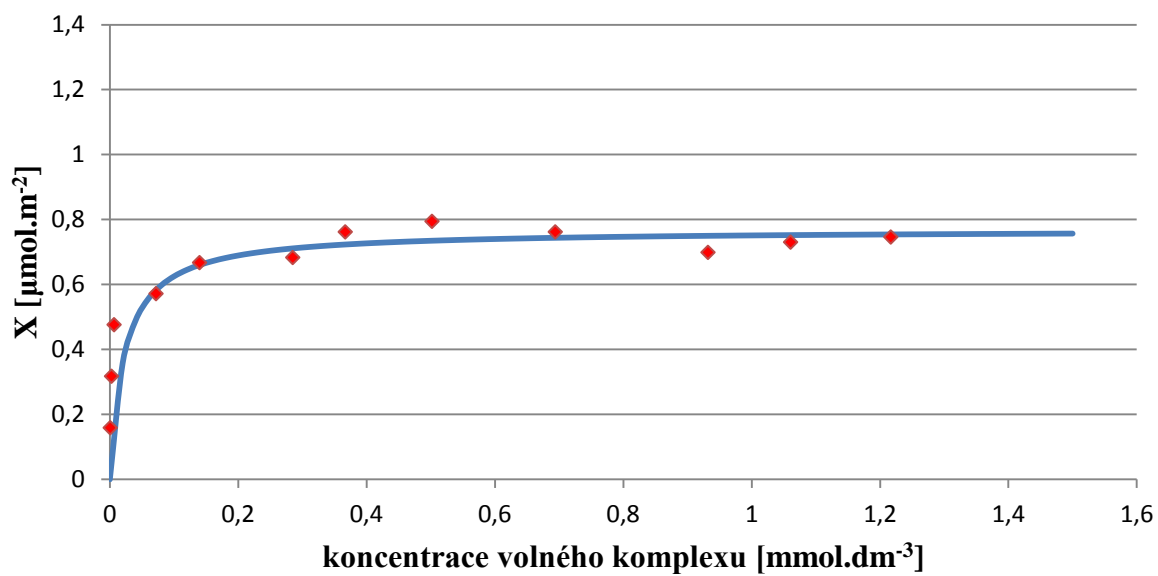
Graf č.5: Langmuirova adsorpční isoterma, komplex Fe- BPAMN



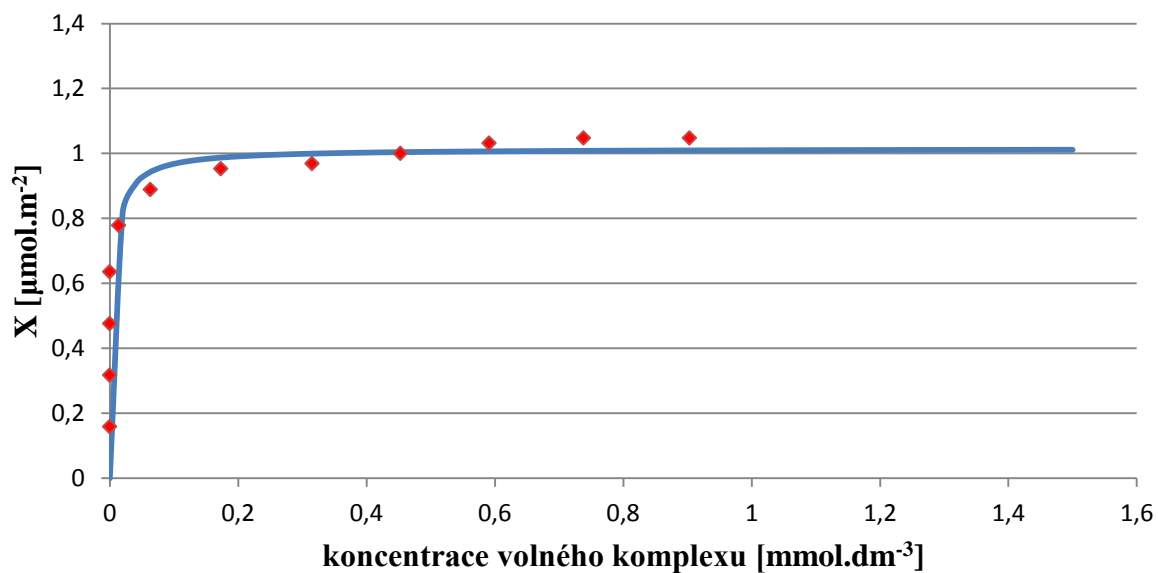
Graf č.6: Langmuirova adsorpční isoterma, komplex Fe- BPPEN



Graf č.7: Langmuirova adsorpční isoterma, komplex Fe- BPAMD



Graf č.8: Langmuirova adsorpční isoterma, komplex Fe- BPPED



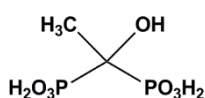
Tabulka 14: Afinitní konstanty a maximální sorpční kapacity

| Komplex | Fe-BPAMN | Fe-BPPEN | Fe-BPAMD | Fe-BPPED |
|--|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| $K / 10^3 \text{ (dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1}\text{)}$ | $31,3 \pm 6,1$ | $20,0 \pm 3,2$ | $43,7 \pm 12,2$ | $207,6 \pm 45,3$ |
| $X_m / 10^{-6} \text{ (mol} \cdot \text{m}^{-2}\text{)}$ | $1,007 \pm 0,035$ | $1,271 \pm 0,052$ | $0,768 \pm 0,019$ | $1,015 \pm 0,017$ |

Data získaná ze sorpčních experimentů shrnuje tabulka 14. Je patrné, že komplexy derivátů NOTA vykazují vyšší hodnoty maximální sorpční kapacity, než analogické deriváty DOTA. Toto je v souladu s očekáváním, neboť hodnota X_m závisí především na rozměru molekuly. Lze též pozorovat, že ligandy s fosfinátovým linkerem poskytují vyšší hodnoty X_m než analogické ligandy s amidovým linkerem. Hodnoty afinitní konstanty jsou u derivátů NOTA nižší, což ukazuje, že pro vysycení povrchu HA je třeba vyšší koncentrace komplexu. Získaná data odpovídají publikovaným hodnotám pro analogické látky.^[24] Pro porovnání jsou uvedeny i hodnoty pro jednoduchý volný bisfosfonát HEDP (základ Etidronátu).

Tabulka 15: Publikovaná data pro analogické komplexy

| Komplex | Tb-BPAMD | Tb-BPAPD | Tb-BPPED | HEDP |
|--|-------------------|-------------------|-------------------|-----------------|
| $K / 10^3 \text{ (dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1}\text{)}$ | 196 ± 11 | $14,1 \pm 0,2$ | 249 ± 44 | 53 ± 9 |
| $X_m / 10^{-6} \text{ (mol} \cdot \text{m}^{-2}\text{)}$ | $0,621 \pm 0,006$ | $0,722 \pm 0,010$ | $0,652 \pm 0,018$ | $1,58 \pm 0,05$ |



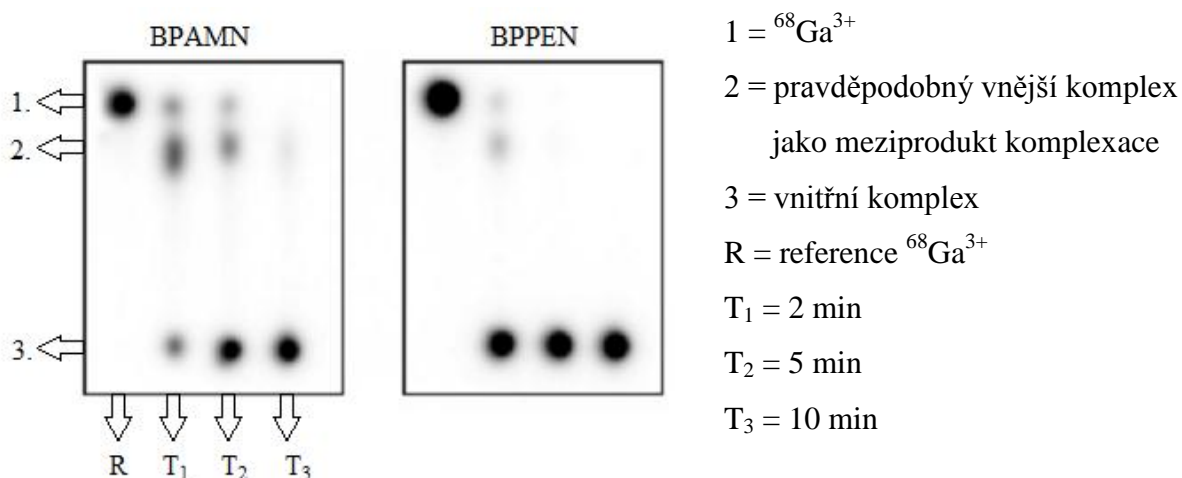
Obrázek 16: HEDP

4.3 Výsledky radiochemického značení

Jeden z důležitých kinetických parametrů komplexační reakce je poměr zakomplexovaného kovu vůči volnému kovovému iontu (a případným meziproductům komplexace) při daných podmínkách. Metodou radiochemického značení lze hodnotu radiochemického výtěžku zjistit jako poměr aktivit těchto forem po jejich separaci, například pomocí TLC.

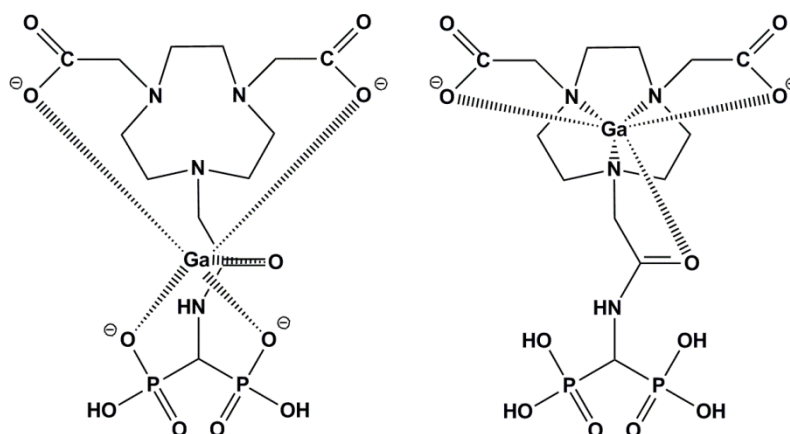
Kinetika radiochemického výtěžku komplexace ^{68}Ga byla sledována v závislosti na teplotě a na pH (grafy 10 – 13). Bylo odhadnuto, že tvorba vnitřního (in-cage) komplexu, ve

kterém je gallium umístěno uvnitř kavity makrocyklu probíhá pravděpodobně přes intermediát, ve kterém je gallium mimo centrální kavitu komplexováno atomy kyslíku z bisfosfonátových pendantních ramen (vnější komplex, out-of-cage).



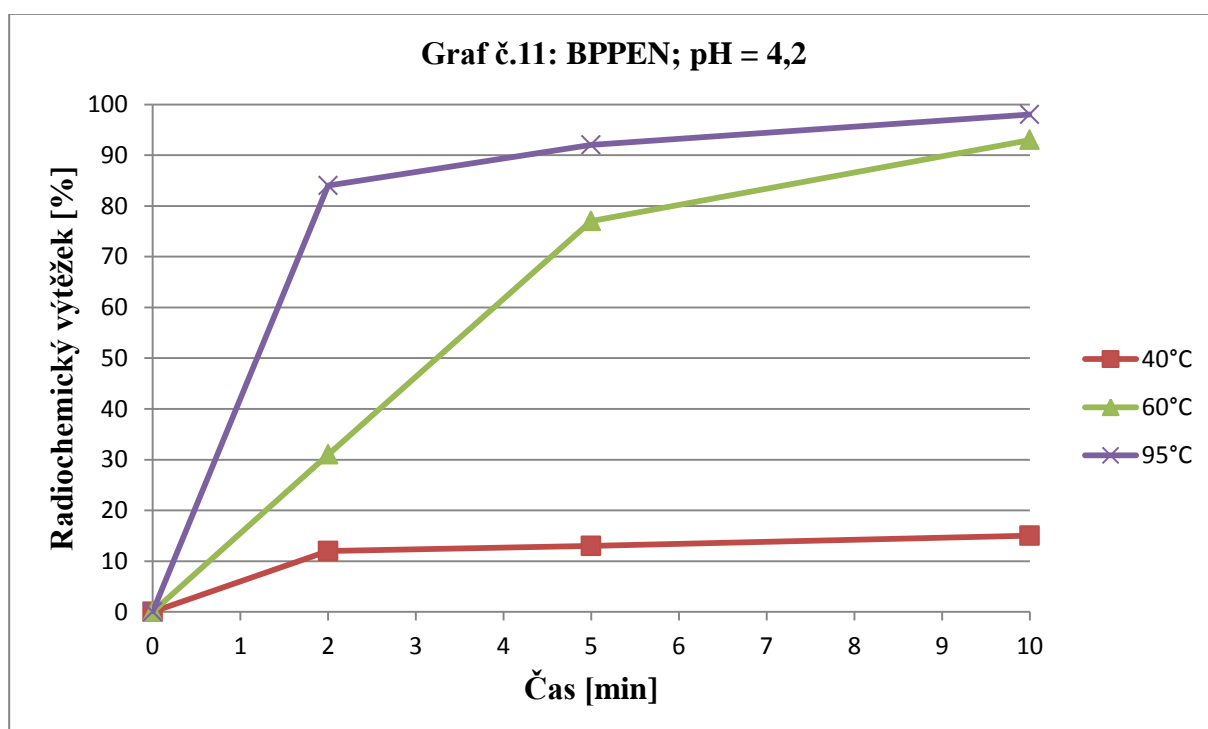
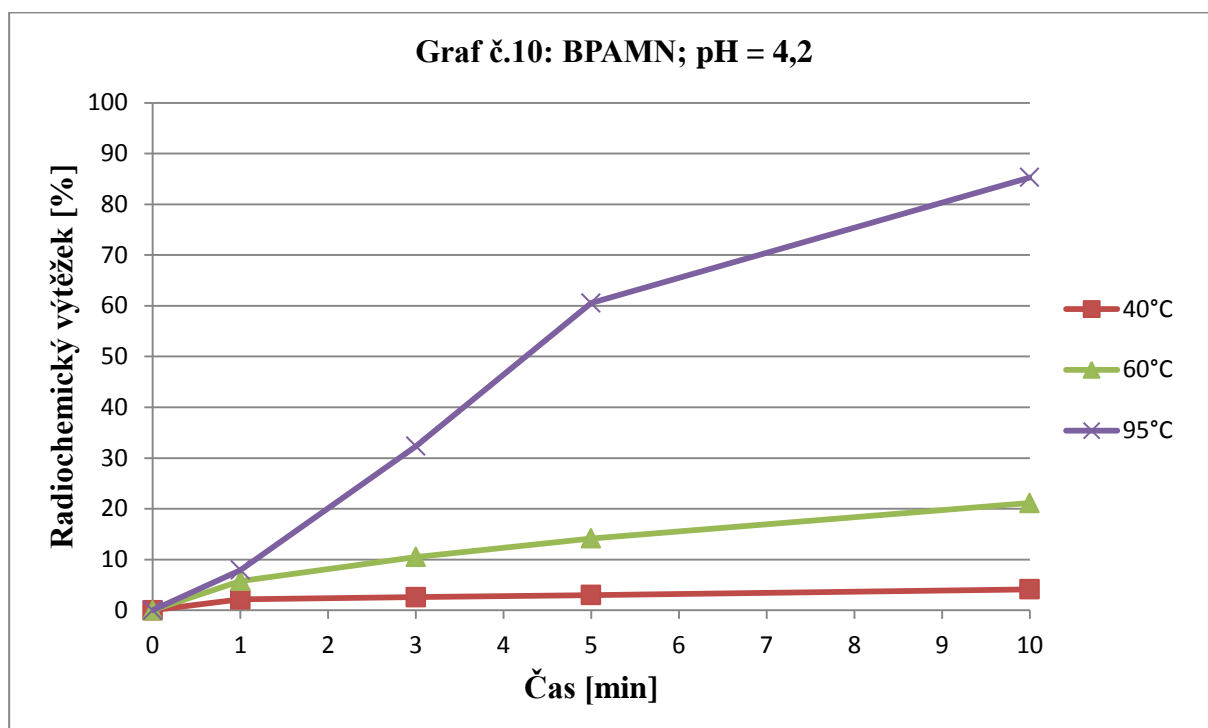
Obrázek 17: Příklad rozložení aktivity na TLC destičkách; 95° C, pH = 3,2

Vznikající intermediát byl detekován i pomocí NMR (viz sekce 4.4). Zjištění přesné struktury intermediátů a cílových komplexů pomocí rentgenové difrakce bohužel nebylo úspěšné, neboť se nepodařilo vypěstovat monokrystaly potřebné kvality.

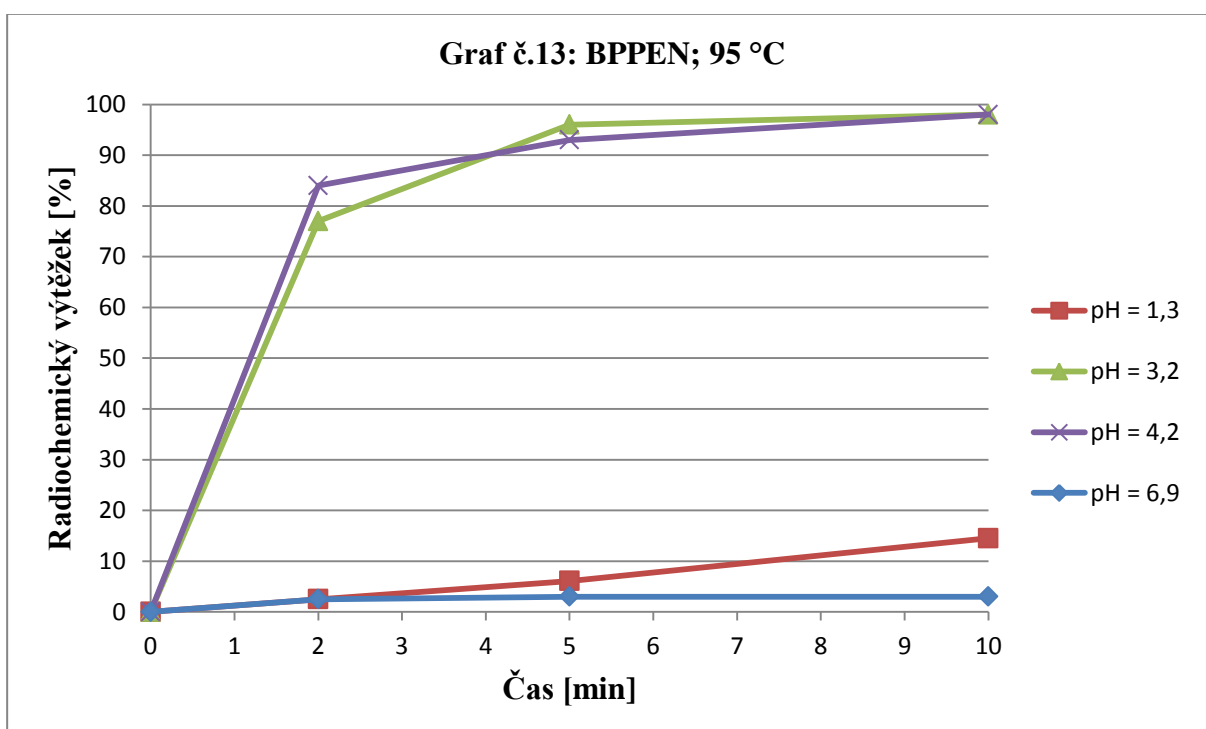
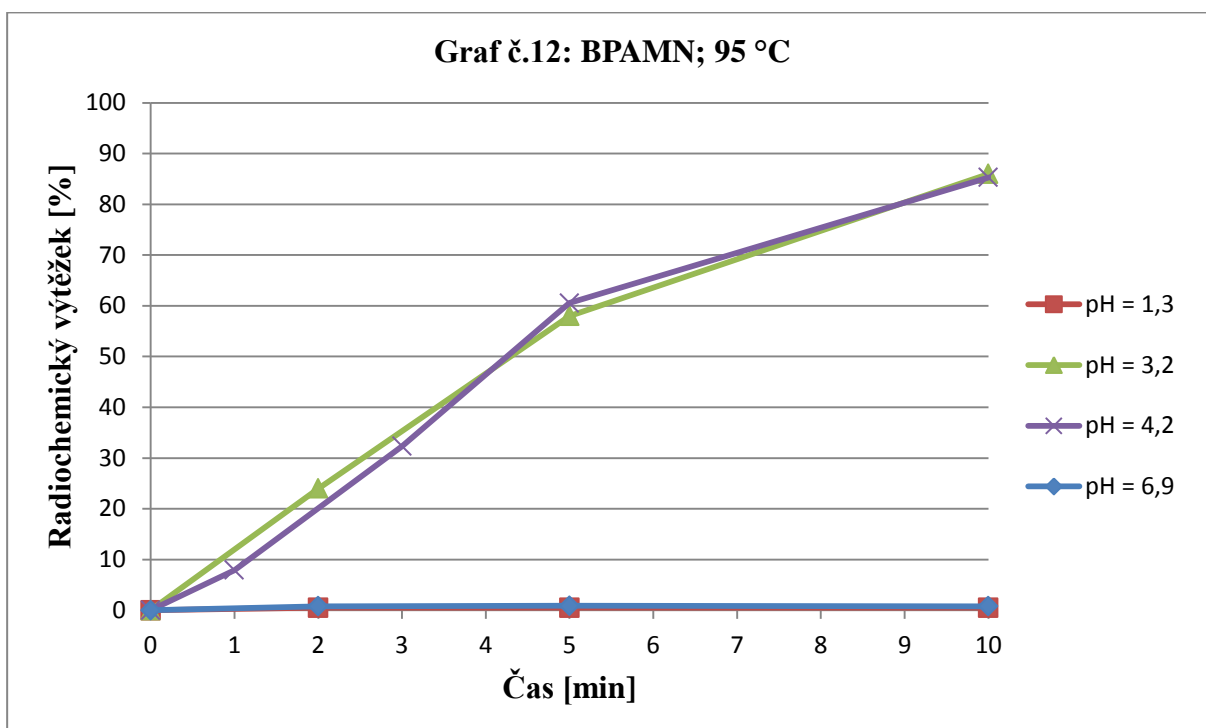


Obrázek 18: Návrh struktury vnějšího a vnitřního komplexu Ga-BPAMN

a) Grafy závislosti radiochemického výtěžku na teplotě

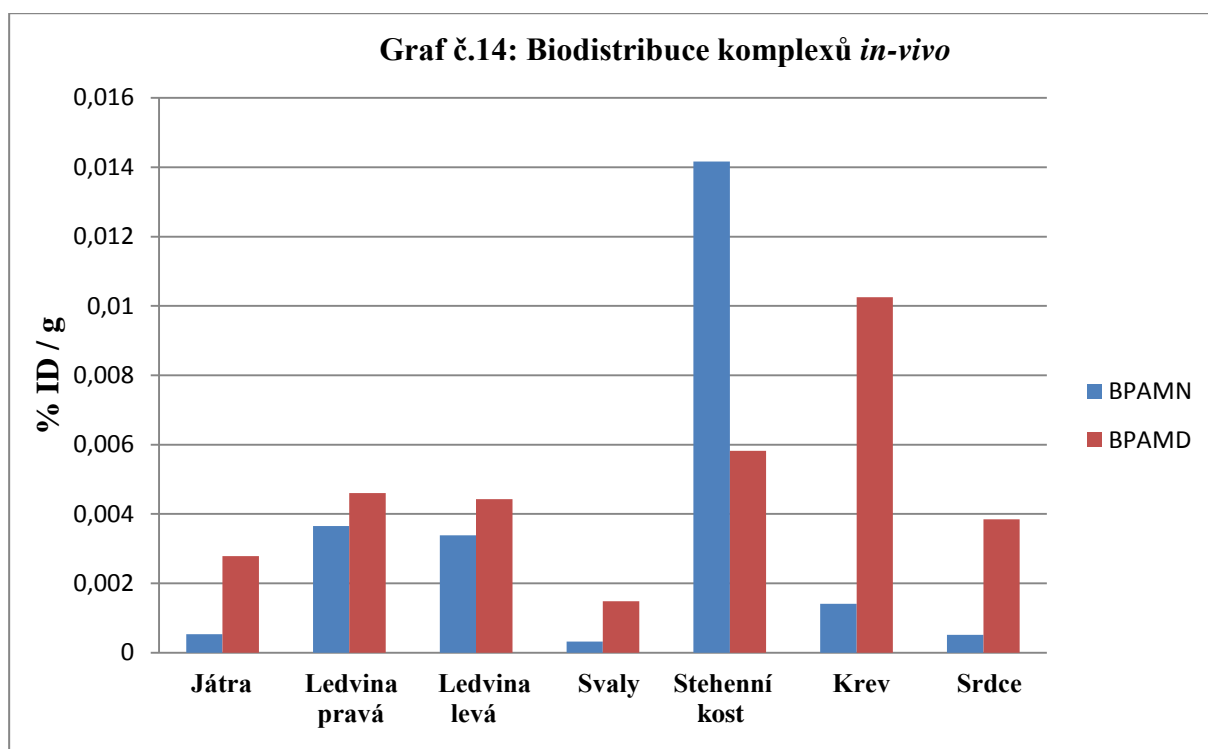


b) Grafy závislosti radiochemického výtěžku na pH



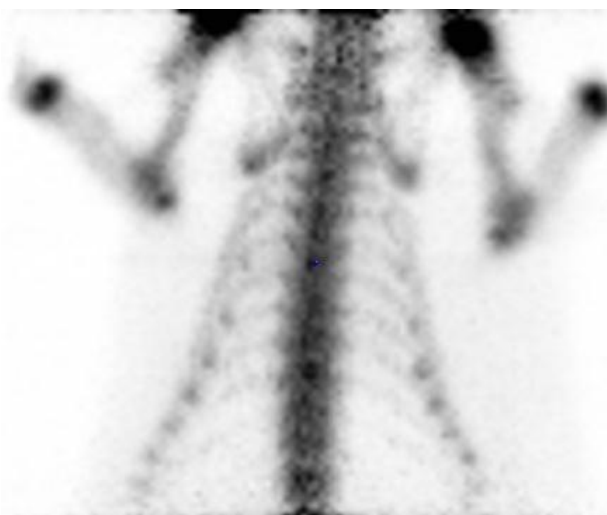
Ze získaných dat je patrné, že zatímco pro dosažení radiochemického výtěžku alespoň 80 % při vzniku vnitřního komplexu Ga-BPAMN je třeba směs zahřívát na 95 °C po dobu 10 minut, v případě BPPEN je stejný výtěžek dosažen již po 2 minutách. Při snížení teploty na 60°C bylo v případě BPAMN po 10 minutách dosaženo výtěžku pouhých 21 %, zatímco u BPPEN byl výtěžek 93 %. I po změně pH lze pozorovat, že ligand BPPEN komplexuje Ga³⁺ výrazně rychleji než BPAMN.

Dále byla studována biodistribuce komplexu *in-vivo*. Pro případné použití komplexu jako ⁶⁸Ga-PET radiofarmaka pro diagnostiku kostí je žádoucí, aby se co nejvíce injektované aktivity hromadilo právě na kostech na úkor ostatních orgánů. Obsah aktivity v jednotlivých orgánech se uvádí v % injektované aktivity (Injected Dose, ID) na gram dané tkáně.



Z výsledků lze pozorovat, že komplex ⁶⁸Ga-BPAMN se hromadí v kostech výrazně více než komplex ⁶⁸Ga-BPAMD. Komplex s derivátem DOTA je pravděpodobně díky nižší stabilitě v *in-vitro* podmínkách náchylnější k transchelataci Ga do transferinu, což by vysvětlovalo jeho vysokou aktivitu v krvi. Biodistribuční data pro komplexy ⁶⁸Ga-BPPEN a ⁶⁸Ga-BPPED, stejně tak jako výsledky studia transchelatační reakce komplexů s transferinem nebyly do doby uzavěrky této diplomové práce k dispozici.

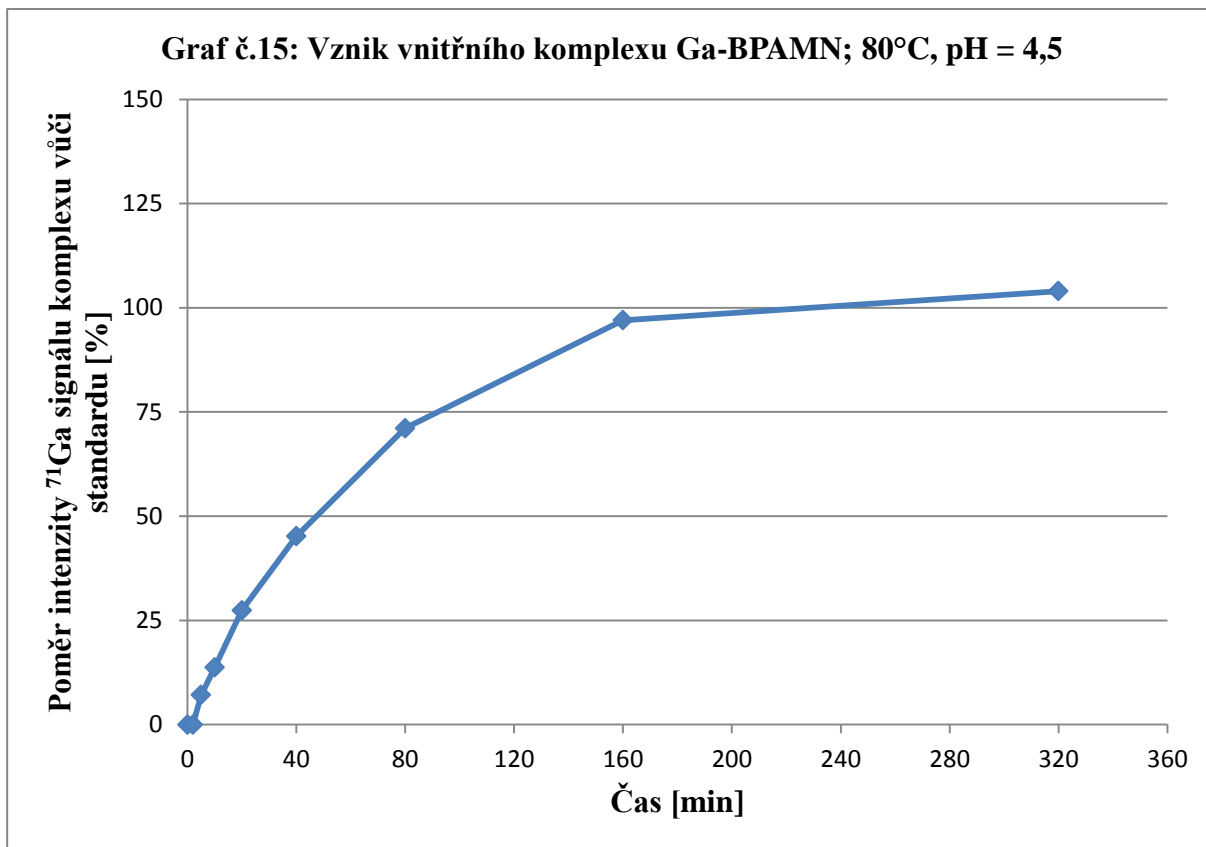
S komplexem ^{68}Ga -BPPEN bylo provedeno PET vyšetření. Ze získaných snímků lze zřetelně rozeznat kosterní strukturu zvířete.



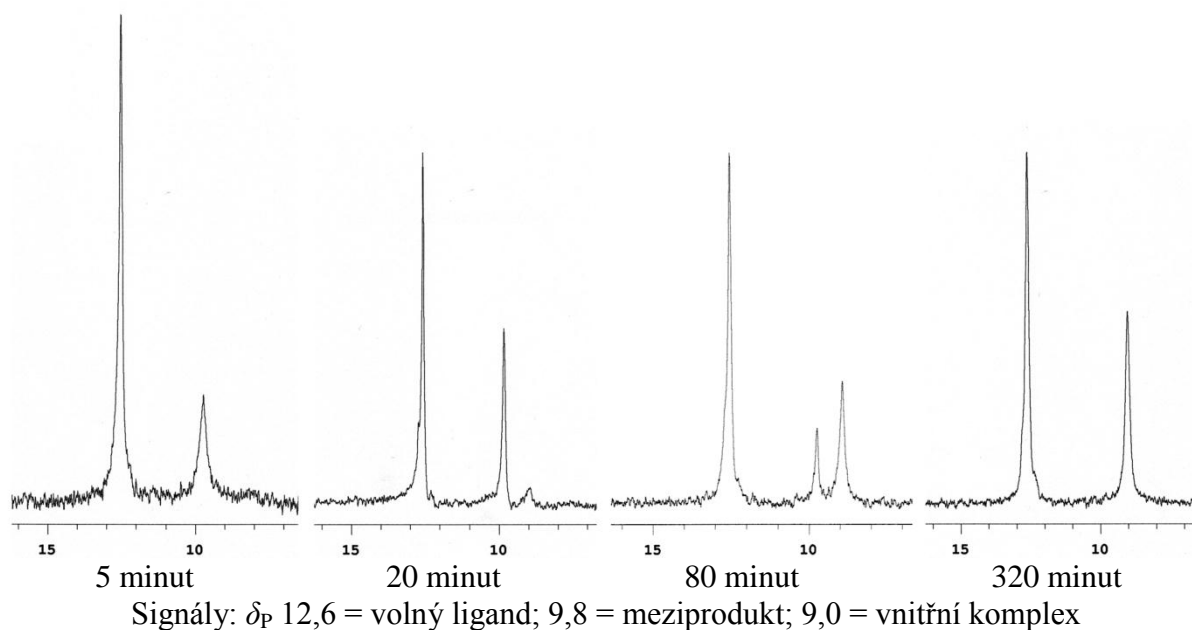
Obrázek 19: PET snímek potkana; 60 minut po injekci, komplex ^{68}Ga -BPPEN

4.4 Kinetika komplexace Ga^{3+} sledovaná pomocí NMR

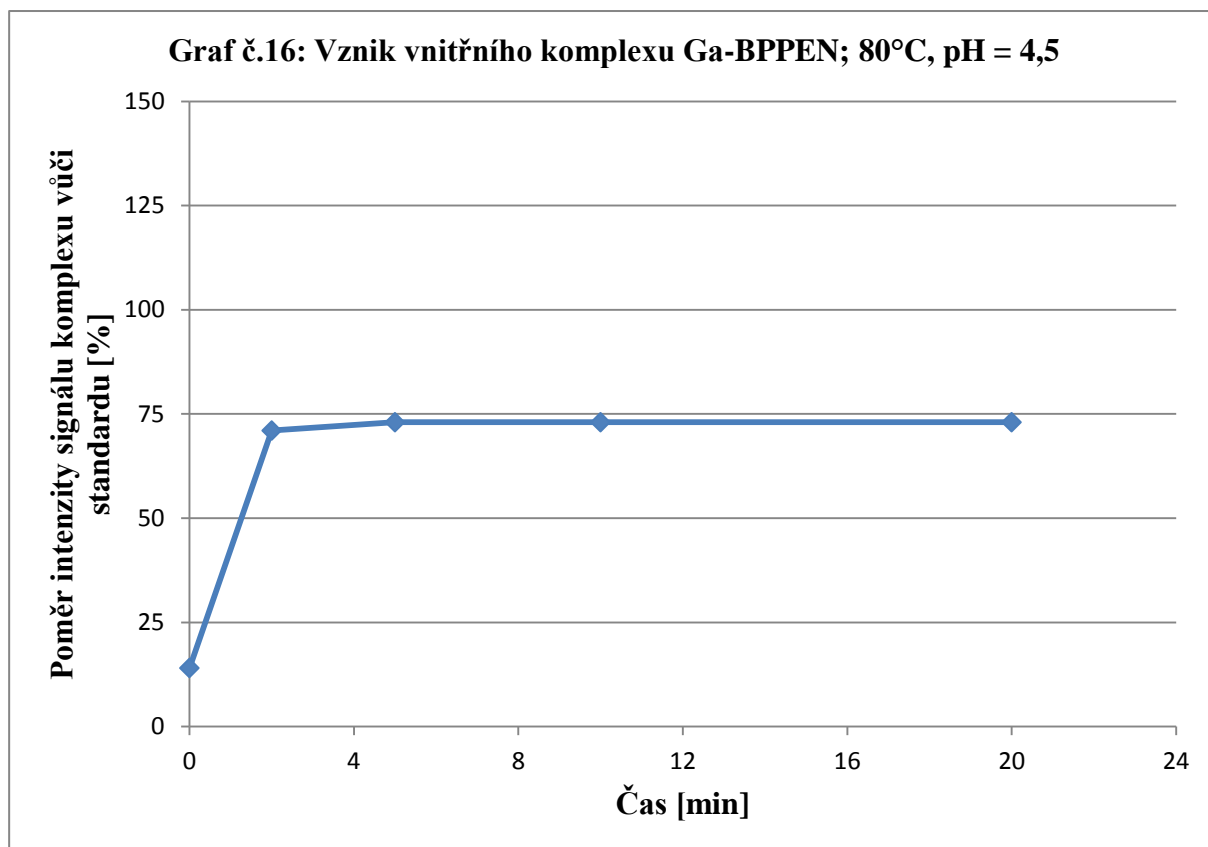
Byla provedena orientační studie kinetiky komplexace Ga^{3+} oběma ligandy sledovaná pomocí ^{71}Ga , ^{31}P a $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ NMR. Bylo využito skutečnosti, že signál ^{71}Ga lze v NMR spektru pozorovat pouze pokud má Ga zcela symetrické koordinační okolí, tedy pokud tvoří symetrický vnitřní komplex. Korelací se spektry ^{31}P lze určit, které signály fosforu náleží volnému ligandu, vnitřnímu komplexu a případným meziproductům. V grafech 15 a 16 je uveden časový vývoj poměrné intenzity signálu ^{71}Ga vůči vloženému standardu. Tato orientační stupnice byla zvolena, protože přesný poměr různých forem Ga ve vzorku nebylo možno zejména díky možným nepřesnostem při práci s velmi malými množstvími velmi koncentrovaných roztoků spolehlivě určit. Z grafů je však patrné, že rychlost vzniku vnitřního komplexu gallia s ligandem s fosfinátovým linkerem je ve shodě s radiochemickými experimenty výrazně rychlejší než v případě ligandu s amidovým linkerem. Pro radiochemické experimenty byl molární nadbytek ligandu vůči kovu řádově 10^4 . Pro NMR experimenty byly obě složky v řádově ekvivalentních množstvích a poločas vzniku vnitřního komplexu se v případě Ga-BPAMN prodloužil z řádu minut na řád hodin.



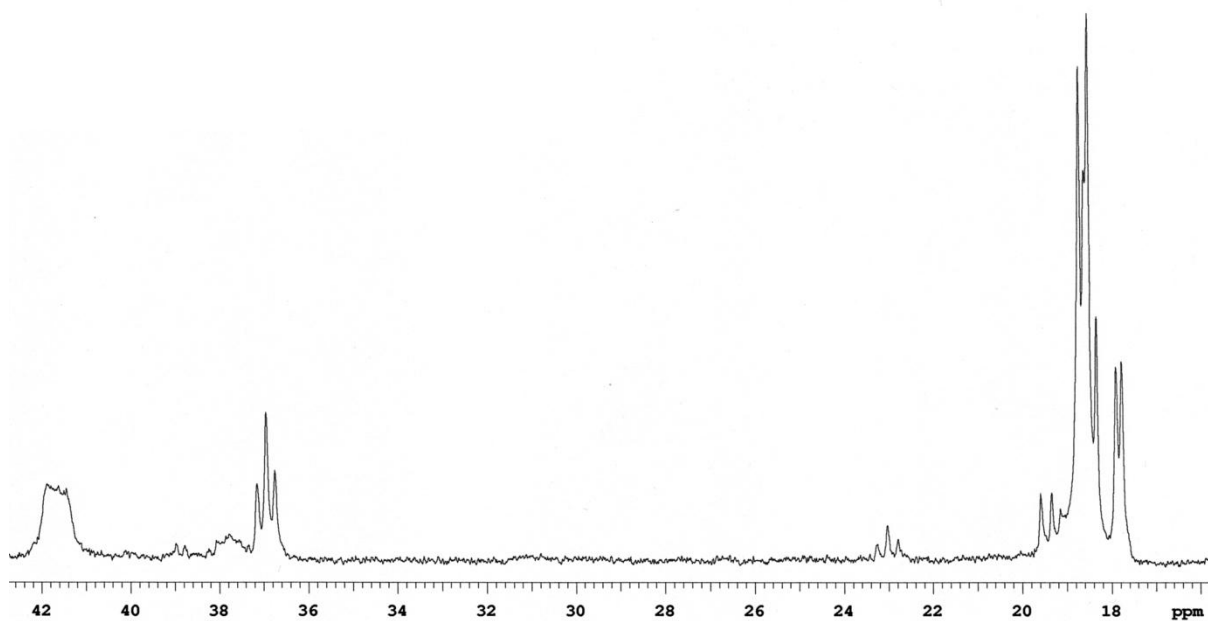
Korelační spektrum ^{71}Ga se spektry $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ byla při vzniku vnitřního komplexu Ga-BPAMN potvrzena přítomnost meziprojektu, pravděpodobného vnějšího komplexu. Ze spektru je patrné, že meziprojekt vzniká rychle, neboť od 20. minuty je intenzita píku volného ligandu konstantní. Přechod na vnitřní komplex je dokončen až po 320 minutách.



Obrázek 20: Vývoj $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ NMR spektra směsi Ga-BPAMN v čase

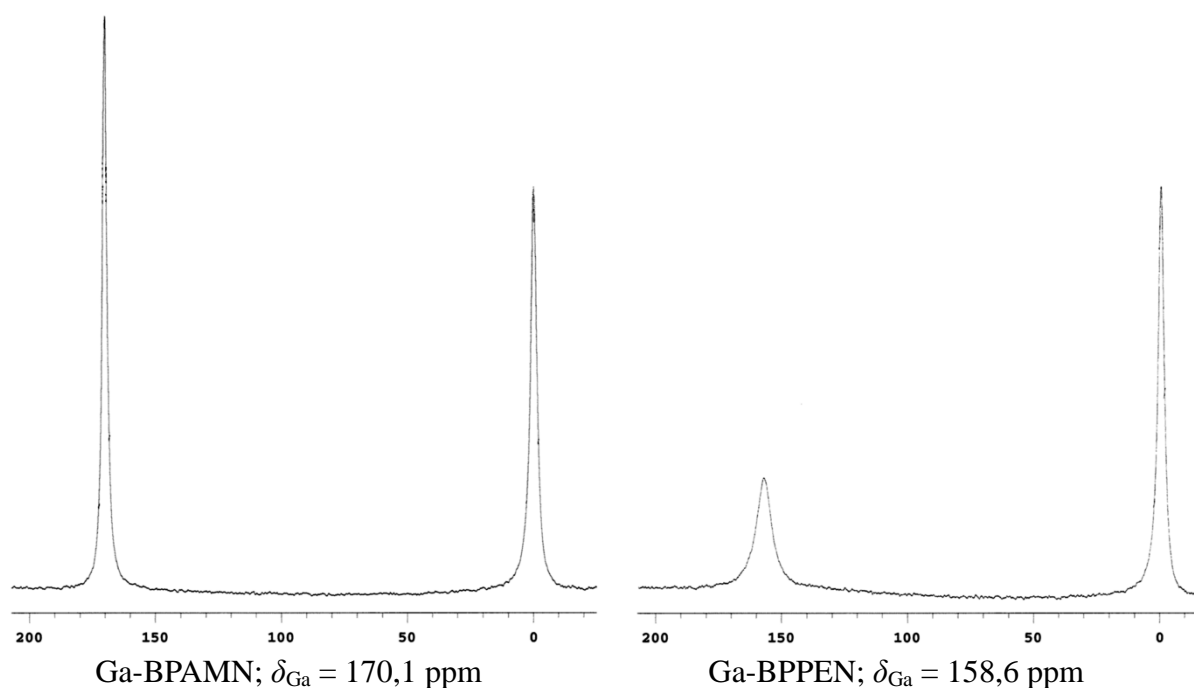


Kinetika reakce Ga-BPPEN byla za daných podmínek velmi rychlá a ihned po smíchání již bylo možno v ^{71}Ga NMR spektru pozorovat vznik vnitřního komplexu. Od druhého měření v čase 2 minuty se složení směsi téměř neměnilo. Případný meziprodukt nebylo možno pomocí ^{31}P NMR spolehlivě identifikovat.



Obrázek 21: $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ NMR spektrum směsi Ga-BPPEN po 20 minutách

Kromě signálů volného ligandu (dublet 18,7 ppm + triplet 37,0 ppm) však bylo možno identifikovat další dva dublety (18,5 ppm a 17,9 ppm) a intenzivně odpovídající multiplet tvořený pravděpodobně dvěma překrytými triplety s posunem 41,9 ppm. Pravděpodobné vysvětlení spočívá ve vzniku chirálního centra na atomu fosforu ve fosfinátové skupině při vzniku vnitřního komplexu. Dva různé sety signálů by pak odpovídaly dvěma různým stereoizomerům. Méně symetrickému okolí by odpovídala i větší šířka signálu ve spektru ^{71}Ga v porovnání s vnitřním komplexem Ga-BPAMN. Obdobná izomerie již byla popsána u fosfinátových derivátů DOTA.^[31]



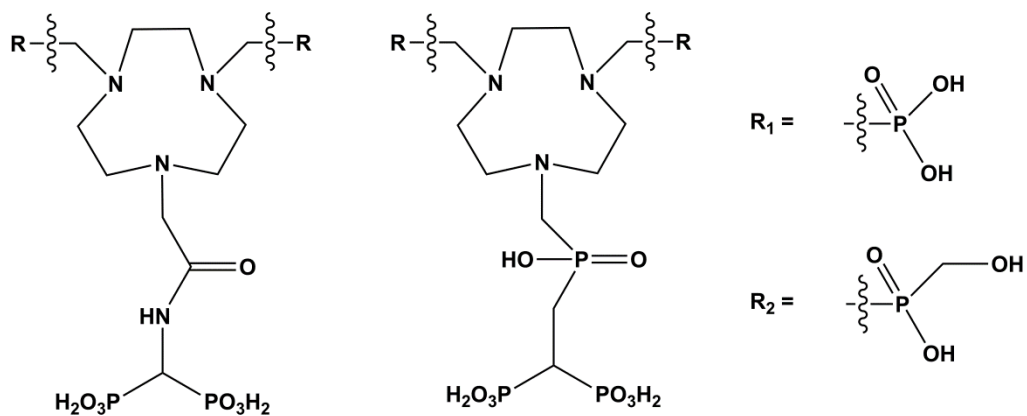
Obrázek 22: Spektra ^{71}Ga na konci reakce

4.5 Úvahy pro budoucí pokračování práce

Předmětem budoucího studia zůstává určení struktury vnitřních i vnějších komplexů pomocí rentgenové difrakce, pokud se podaří vypěstovat monokrystaly potřebné kvality. Dále bude třeba dokončit PET a biodistribuční studie a provést transchelatační kompetiční studie komplexů Ga vůči transferinu. Poté bude možno lépe posoudit vhodnost obou ligandů pro případné medicínské nasazení.

Další pokračování práce by mohlo spočívat v přípravě analogických ligandů BPAMN a BPPEN, kde by karboxylové skupiny byly nahrazeny tak, jak je uvedeno na obrázku 23. V literatuře již byly popsány symetricky substituované deriváty TACN se třemi identickými

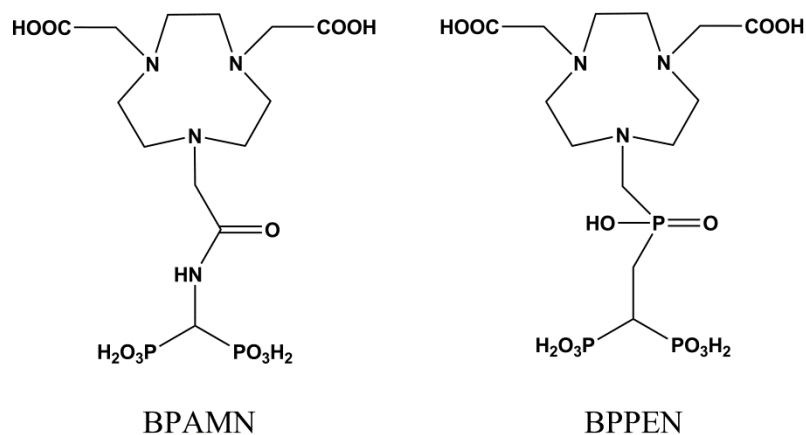
pendantními rameny R_1 a R_2 , které při komplexaci Ga^{3+} vykazovaly velmi dobré kinetické i termodynamické parametry.^[32]



Obrázek 23: Navrhované ligandy

5. ZÁVĚR

Byly připraveny dva ligandy kombinující skelet NOTA s bisfosfonátovou pendantní skupinou. S těmito ligandy byly provedeny základní experimenty posuzující vhodnost pro použití jako ^{68}Ga -PET radiofarmaka pro diagnostické zobrazení kostí. Byla studována kinetika komplexační reakce obou ligandů s Ga^{3+} pomocí ^{71}Ga a ^{31}P NMR spektroskopie. Dále byly provedeny studie simulující pomocí hydroxoapatitu sorpci komplexů na kosti. Ve spolupráci s Johannes-Gutenberg Universität Mainz v Německu byla studována radiochemická kinetika komplexace ^{68}Ga a byly provedeny první *in-vivo* zvířecí testy biodistribuce jednoho z komplexů. Získaná data zatím naznačují, že oba ligandy jsou velmi slibnými kandidáty pro případné využití v ^{68}Ga -PET.



Obrázek 24: Studované ligandy

Ligand BPPEN prokázal lepší vlastnosti v průběhu komplexační reakce s Ga^{3+} . Plné srovnání však bude možné po provedení zbývajících *in-vivo* experimentů.

6. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- 1: *Report of the United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation to the General Assembly: 2000*, Vol.1
- 2: Mettler F.A, Huda W, Yoshizumi T.T, Manesh M: *Effective Doses in Radiology and Diagnostic Nuclear Medicine: A Catalog*, Radiology: Volume 248; Number 1 - July **2008**
- 3: Shrimpton P.C. Miller H.C, Lewis M.A, Dunn M: *Doses from Computed Tomography (CT) examinations in the UK - 2003 Review*
- 4: Hunold P, Vogt F.M, Schmermund A, Debatin J.F, Kerkhof G, Budde T, Erbel R, Ewen K, Barkhausen J: *Radiation Exposure during Cardiac CT: Effective Doses at Multi-Detector Row CT and Electron-Beam CT*, Radiology: Volume 226: Number 1 - January **2003**
- 5: Hennings J, Lindhe Ö, Bergström M, Långström B, Sundin A, Hellman P: [^{11}C] *Metomidate Positron Emission Tomography of Adrenocortical Tumors in Correlation with Histopathological Findings*, The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism 91(4):1410–1414
- 6: Le Loirec C, Champion C: *Track Structure simulation for Positron Emitters of Medical Interest. Part I: The Case of the Allowed Decay Isotopes*, Nuclear Instruments and Methods in Physics Research A 582 (**2007**) 644–653
- 7: Rösch F, Qaim S.M, Novgorodov A.F, Tsai Y: *Production of Positron-emitting $^{110\text{m}}\text{In}$ via the $^{110}\text{Cd}(\text{}^3\text{He}, 3\text{n})^{110}\text{Sn} \rightarrow ^{110\text{m}}\text{In}$ Process*, Appl. Radiat. Isot. Vol.48, No.1, pp. 19–26, **1997**
- 8: Alkhazov G. D, Mezilev K. A, Novikov Y.N, Ganbaatar N, Gromov K.Y, Kalinnikov V, Potempa A, Sieniawski E, Tarkanyi F: *The study of short-lived nuclei in the region $Z=59\text{--}68$* , Zeitschrift für Physik A - Atoms and Nuclei Volume 310, Number 3, 247 (**1983**)
- 9: Lubberink M, Lundqvist H, Tolmachev V: *Production, PET Performance and Dosimetric Considerations of $^{134}\text{Ce}/^{134}\text{La}$, an Auger Electron and Positron-emitting Generator for Radionuclide Therapy*, Phys. Med.Biol.47 (**2002**) 615–629
- 10: de Blois E, Chan H.S, Naidoo C, Prince D, Krenning E.P, Breeman W.A.P: *Characteristics of SnO_2 -based $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ generator and aspects of radiolabelling DOTA-peptides*, Applied Radiation and Isotopes 69 (**2011**) 308–315
- 11: Egamediev S.K. Khuzhaev S: *^{68}Ga generator based on alumina*, Radiochemistry, **2000**; vol. 42, issue 2: 175–177
- 12: Malyeshev K.V, Smirnov V.V: *Gallium-68 yield from hydrated Zirconium oxide-based*

-
- generators*, Radiochemistry, **1975**; vol. 17, issue 1: 137–140
- 13: Neirinckx R.D, Davis M.A: *Generator for ionic gallium-68*, Jour. of Labelled Comp. and Radiopharmaceuticals, **1979**; vol. 16, issue 1: 109–110
- 14: Loktionova N.S, Belozub A.N, Filosofov D.V, Zhernosekov K.P, Wagner T, Türler A, Rösch F: *Improved column-based radiochemical processing of the generator produced ^{68}Ga* , Appl. Radiation and Isotopes vol.69 (**2011**): 942–946
- 15: Greenwood & Earnshaw: *Chemistry of Elements, 2nd edition*, Reed Educational and Professional Publishing Ltd, **1998**
- 16: Harris W.R, Pecoraro V: *Thermodynamic binding constants for gallium transferrin*, Biochemistry, **1983**; 22: 292–299
- 17: Velikyan I: *Synthesis, Characterization and Application of ^{68}Ga -labelled Macromolecules*, Acta Universitatis Upsaliensis, **2005**
- 18: Heppeler A, Froidevaux S, Mäcke H R, Hermann E, Bébé M, Powell P, Hennig M: *Radiometall-labeled macrocyclic chelator-derivatised somatostatin analogue with super tumour-targeting prosperities and potential for receptor-mediated internal radiotherapy*, Chem. Eur. J., **1999**; 5: 1016–1023
- 19: Reichert D E, Lewis J S, Anderson C J: *Metal complexes as diagnostic tools*, Coord. Chem. Rev., **1999**; 184: 3–66
- 20: Borgias B, Hugli A.D, Raymond K.N: *Isomerization and Solution Structures of Desferrioxamine B Complexes of Al^{3+} and Ga^{3+}* , Inorg. Chem. **1989**; 28: 3538–3545
- 21: Fleisch H: *Bisphosphonates in Bone Disease*, Academic Press **2000**
- 22: Vitha T, Kubíček V, Kotek J, Hermann P, Kalor Z.I, Wolterbeek H.T, Peters J.A, Lukeš I: *Complexes of DOTA-Bisphosphonate Conjugates: Probes for Determination of Adsorption Capacity and Affinity Constants of Hydroxyapatite*, Langmuir **2008**; 24: 1952–1958
- 23: Blake A.J, Fallis I.A, Persons S, Ross S.A, Schröder M: *Asymmetric functionalisation of aza macrocycles. Syntheses, crystal structures and electrochemistry of $[\text{Ni}(\text{Bz}[9]\text{aneN}_3)_2][\text{PF}_6]_2$ and $[\text{Pd}(\text{Bz}[9]\text{aneN}_3)_2][\text{PF}_6]_2 \cdot 2 \text{MeCN}$ ($\text{Bz}[9]\text{aneN}_3 = 1\text{-benzyl-1,4,7-triazacyclononane}$)*, J. Chem. Soc., Dalton Trans., **1996**: 525–532
- 24: Blake A.J, Fallis I.A, Gould R.O, Persons S, Ross S.A, Schröder M: *Selective derivatisation of aza macrocycles*, J. Chem. Soc., Dalton Trans., **1996**: 4379–4387
- 25: Huskens J, Sherry A.D: *Synthesis and Characterization of 1,4,7-Triazacyclononane*

-
- Derivatives with Methylphosphinate and Acetate Side Chains for Monitoring Free Mg^{II} by ³¹P and ¹H NMR Spectroscopy*, J. Am. Chem. Soc. **1996**; 118: 4396–4404
- 26: J. Holub – *Bakalářská práce*, Univerzita Karlova 2009
- 27: Chong H, Brechbiel M W: *A short and Efficient Synthesis of Mono-substituted 1,4,7-Triazacyclononanes*, Synth. Commun., **2003**; 33: 1147–1154
- 28: Jordis U, Sauter F, Siddiqi S M, Küenburg B, Bhattacharya K: *Synthesis of (1R,4R)- and (1S,4S)-Diazabicyclo[2.2.1]heptanes and their N-substituted Derivatives*, Synthesis, **1990**; 10: 925–930
- 29: Kubíček V, Rudovský J, Kotek J, Hermann P, Elst L.V, Muller R.N, Kolar Z.I, Wolterbeek H.T, Peters J.A, Lukeš I: *A Bisphosphonate Monoamide Analogue of DOTA: A Potential Agent for Bone Targeting*, J.Am.Chem.Soc. **2005**; 127: 16477–16485
- 30: Vitha T, Kubíček V, Kotek J, Hermann P, Elst L.V, Muller N, Lukeš I, Peters J.A: *Gd(III) complex of a monophosphinate-bis(phosphinate) DOTA analogue with high relaxivity; Lanthanide (III) complexes for imaging and radiotherapy of calcified tissue*, Dalton Trans. **2009**: 3204–3214
- 31: Kotková Z, Pereira G.A, Djanashvili K, Kotek J, Rudovský J, Hermann P, Elst L.V, Muller R.N, Geraldes C.F.G.C, Lukeš I, Peters J.A: *Lanthanide(III) Complexes of Phosphorus Acid Analogues of H₄DOTA as Model Compounds for the Evaluation of the Second-Sphere Hydration*, Eur. J. Inorg. Chem. **2009**; 119–136
- 32: Šimeček J, Schulz M, Notni J, Plutnar J, Kubíček V, Havlíčková J, Hermann P: *Complexation of metal ions with TRAP (1,4,7-triazacyclononane phosphinic acid) ligands and NOTA: phosphinate-containing ligands as unique chelators for trivalent gallium*, **2011**, v tisku

Poděkování

Na závěr práce bych chtěl poděkovat především svému školiteli, Dr. Kubíčkoví za vynikající vedení, trpělivost a čas, který pro tuto práci obětoval. Dále děkuji celému osazenstvu laboratoře „19“ za vytvoření příjemného pracovního prostředí a dobrou podporu při řešení jakýchkoliv nesnází. Speciální poděkování patří kolegům z univerzity v Mainzu za umožnění radiochemických experimentů. Děkuji též Grantové agentuře UK za poskytnutí finančního zajištění, bez kterého by tato práce nemohla být v daném rozsahu provedena.