

Contact / Email:

Jiri Pinkas

jpinkas@chemi.muni.cz

Place / Date

Brno, Czech Republic

30 August 2020

## OPONETSKÝ POSUDEK

na disertační práci pana Mgr. Petera Urbanovského

### Komplexy makrocyclických ligandů odvozených od cyklenu mající fosfinátovou pendentní skupinu

Předložená disertační práce se zabývá studiem přípravy nových makrocyclických ligandů na bázi cyklenu a jejich komplexů s lanthanoidy. Cílem je ověřit možný vliv protonace pendentních aminoalkylfosfinátových skupin na spektroskopické vlastnosti komplexů, které by mohly sloužit jako kontrastní látky pro MRI schopné mapovat pH *in vivo*. Příprava takovýchto látek je celosvětově intenzivně studovanou oblastí. Velký význam kontrolované syntézy Gd(III) komplexů s vysokou termodynamickou stabilitou, kinetickou inertností a relaxivitou vyplývá ze zájmu o zvyšování kvality medicínálních zobrazovacích systémů. Téma předložené disertace tedy velmi dobře zapadá do všeobecné snahy vyvinout vysoce funkční, spolehlivé a bezpečné kontrastní látky pro molekulární zobrazování v lékařské diagnostice.

Disertační práce je napsána v angličtině na 106 stranách hlavního textu a dalších 100 stranách příloh obsahujících autorovy publikace a souhrny nepublikovaných výsledků. Práce je netradičně rozčleněna pouze na dvě hlavní části. Úvod podává přehled metod syntézy aminoalkylfosfonových a fosfinových kyselin, stručnou teorii molekulových zobrazovacích technik (MRI, MRA, MRS) a shrnuje strukturu a vlastnosti kontrastních látek s důrazem na látky ze skupiny DOTA a příbuzných derivátů. Z teoretické části vyplývají cíle práce shrnuté na dvou stranách. Dále následuje obsáhlá výsledková část s diskuzí a závěry. Experimentální část v oblasti syntézy je částečně pokryta v diskuzi, nejsou ale zdokumentovány charakterizační metody, přístroje a použité parametry měření a vysvětleny postupy analýzy dat. Pro detailní návody a popis použitých instrumentálních metod a charakterizační data produktů je třeba jít do publikací a jejich příloh. Stručný popis principů speciálnějších relaxometrických a spektroskopických metod a simulačních programů by určitě nebyl na škodu.

**Teoretický úvod** dává přehled o chemických a fyzikálních vlastnostech přírodních a syntetických aminoalkylfosfonových a fosfinových kyselinách, jejich aplikacích a o principech chemických metod přípravy P-C a C-P-C vazeb ve fosfonových a fosfinových kyselinách. Zvláštní kapitola popisuje detailně principy a techniky molekulárního zobrazování (MRI, MRA, MRS), kontrastní látky založené na komplexech Gd(III) s ligandy typu DOTA, responsivní MRI kontrastní látky a kontrastní látky citlivé na pH. Značný počet citací (143) v seznamu použité literatury a jejich struktura z hlediska časového ukazuje na dobrý přehled a orientaci autora ve studované problematice.

Kapitola Cíle práce vytyčuje tři oblasti výzkumu: syntézu nových ligandů s fosfinátovými rameny, studium vlastností aminomethylfosfinátových skupin v závislosti na pH a vliv protonace na nekovalentní interakce s HSA.

Poznámky k teoretické části:

Drobné překlepy a chyby byly označeny přímo v pdf kopii disertační práce (množné číslo, členy, špatná volba nebo pořadí slov the best (most) known, chybějící nebo nevhodné předložky, závorky navíc, indexy, interpunkce (systematicky chybějící čárka za i.e., e.g.). Zkratku et al. nepoužívat v seznamu literatury, vypisovat všechny autory. Jednotky objemu jsou  $\text{cm}^3$ , ne ml, jednotka mM =  $\text{mmol l}^{-1}$ . Rovnovážné reakce musí být značeny dvojitou šipkou  $\rightleftharpoons$ .

Str. 24 a dále: Název tabulky musí být nahoře, ne dole. Table 1 –  $T_{1e}$  má jednotky  $\text{s}^{-1}$ , to by měla být relaxační rychlost.

Str. 25: Jaká je LD50 pro Gd-komplexy, 10 mmol/kg?

Str. 49: Odkaz na Fig. 48, který neexistuje, poslední je Fig. 47.

Table 4: Relaxivita je označena  $^{20}\text{r1p}$ , není vysvětleno, že je to pro 20 MHz? Až v Tab. 6 je použito jiné značení relaxivity ( $^{298}\text{r1p}^{20}$ ) s vysvětlením pro 298 K a 20 MHz.

Kapitola **Výsledky a diskuze** podává optimalizovaný návod na přípravu amino-H-fosfinových kyselin z  $\text{H}_3\text{PO}_2$ , aldehydů a nukleofilních sekundárních aminů ( $\text{pK}_A > 8$ ) v kyselině octové a jejich připojení na cyklenový kruh Kabachnik-Fieldsovou reakcí v suchém pyridinu s katalýzou HBr za tvorby nových ligandů  $\text{DO3AP}^{\text{DBAM}}$  a  $\text{DO3AP}^{\text{IBPAM}}$  s vysokými výtěžky. Byly připraveny jejich komplexy s Ln(III) a stanoveny  $\text{pK}_A$  jejich pendantních ramen. Gd(III) komplexy koordinují jednu molekulu vody s nejkratším residenčním časem (pod 15 ns) pro cyklenové komplexy. Komplexy se vážou k HSA, preferenčně k vazebnému místu II, lépe, když je pendantní amin deprotonovaný. Dle očekávání se relaxivita zvýšila zpomalením rotace celého systému.

Str. 68: Jak byly získány údaje pro zastoupení TSA isomerů v protonovaných a deprotonovaných komplexech Gd– $\text{DO3AP}^{\text{DBAM}}$  a Gd– $\text{DO3AP}^{\text{IBPAM}}$ ? Proč nejsou tyto údaje v grafu na str. 69 Fig. 63?

Str. 70 Tab. 6: Proč je zkratka ligandu psána doha malými písmeny a v textu velkými?

Str. 71, Fig. 64: Proč je nárůst vázaného Gd– $\text{DO3AP}^{\text{DBAM}}$  komplexu k HSA nemonotónní vzhledem k pH?

Dále byly studovány komplexy Ln(III) pomocí rtg strukturní analýzy (17 struktur) a sledovány závislosti strukturních parametrů (QO4-Ln, QN4-Ln, twist, opening angle, vazebná délka Ln-OH<sub>2</sub>) na velikosti Ln(III).

Nový ligand  $\text{DO3AP}^{\text{AM}}$  byl připraven jako nejjednodušší ligand typu  $\text{DO3AP}^{\text{R}}$  s protonovatelnou pendantní aminovou skupinou. Acetylovaný ligand  $\text{DO3AP}^{\text{AcAM}}$  byl připraven jako neprotonovatelný analog pro srovnání vlastností. Ukázalo se ale, že efektivní hydratační číslo  $q$  je nižší než 1 a relaxometrické parametry nezávisí na pH. Residenční časy molekul vody jsou ale delší (40 a 34 ns), patrně z důvodu nižšího obsahu TSA isomeru.  $\text{DO3AP}^{\text{AM}}$  komplexy Pr a Yb se ukázaly jako vhodné pro  $^{31}\text{P}$  MRS přes ne úplně vhodné  $\text{pK}_A$  pro *in vivo* experimenty.

Str. 81, Fig. 71: Jaká je chyba měření, doplnit esd úsečky do grafu. Proč nejsou v grafu údaje pro Gd?

V posledním projektu byl studován nový ditopický ligand  $\text{DO3A-P-DO3A}$  s můstkovou fosfinátovou skupinou a jeho homo- a heteronukleární mono- a bimetallické komplexy Ln(III), které mohou vykazovat až 32 isomerů. Rtg. strukturní analýzou byly stanoveny struktury 6 komplexů, které vykazují dvě ze tří možných orientací makrocyclických kavit. Residenční čas vody v GdGd komplexu je velmi krátký (7 ns) a relaxivita se zdvojnásobila oproti monometalickému Gd(III) komplexu. Naproti tomu elektronické relaxační parametry nebyly významně pozměněny blízkostí druhého Gd(III) iontu (6.6 Å). Pro sérii

bimetalických komplexů GdSc, GdY, GdLa, GdEu a GdBi se ukázalo, že pro jejich relaxivitu neexistuje jednoduchá závislost na molekulové hmotnosti.

Str. 88: Proč nebylo stanoveno  $pK_a$  skupiny P-OH?

Str. 89: Jakou metodou bylo zjištěno, že monometalické komplexy nevyměňují v roztoku kationty kovů mezi kavitami?

Str. 90: Existuje meso forma homonukleárních dimetalických komplexů?

## Přílohy

V článku Inorg. Chem. 2019, 58, 5196–5210 na straně 5204, levý sloupec dole, je chybný odkaz na Figure S5, má být S6.

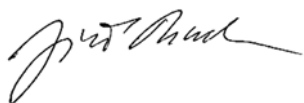
K výsledkům této disertační práce mám následující **dotazy**:

- Jak byly prováděny simulace relaxivity z  $^1\text{H}$  NMRD profilů a z VT  $^{17}\text{O}$  NMR spekter podle SBM teorie?
- Proč byla vzdálenost Gd-OH<sub>2</sub> zafixována na 3.1 Å v komplexu Gd-DO3AP<sup>AM</sup>, když se ukázalo, že je asi delší?
- Str. 60 a Fig. 55: Počítání oxidačního stavu P III a V, tautomerie – změna ox. stavu?
- Proč se v práci někde používá  $\log K_a$  protonační reakce a jinde  $pK_a$ ?
- Vysvětlete stručně princip metodik pro zjištění počtu koordinovaných molekul vody  $q$ 
  - z Dy(III)-induced shift (DIS) v  $^{17}\text{O}$  NMR spektrech
  - z luminescence Eu(III) komplexů
  - ze spekter HR UV-Vis Eu(III) komplexů
  - z  $^1\text{H}$  NMRD (nuclear magnetic relaxation dispersion) měření
- Vysvětlete způsob přiřazení signálů SA/TSA isomerů pomocí lanthanide-induced shift axiálních protonů cyklenového kruhu v  $^1\text{H}$  a přiřazení signálů SA/TSA isomerů v  $^{31}\text{P}$  NMR spektrech. Jak byl stanoven poměr SA/TSA v komplexech Gd(III)?

## Shrnutí a celkové hodnocení

Předložená disertační práce se zabývá velice aktuální a důležitou oblastí designu, syntézy a charakterizace nových kontrastních látek pro MRI. Práce přináší velké množství nových a užitečných poznatků. Uvádí optimalizované přípravy asi 40 aminofosfinových kyselin a jejich derivátů. Byly nalezeny nové syntetické cesty k polyazamakrocyklům s pendantními rameny s amino skupinami. Byl připraven a strukturně charakterizován největší soubor komplexů Ln(III) s ligandy typu DOTA (18). Komplexy Gd(III) se nekovalentně vážou k HSA (II) v závislosti na protonační stavu a se zvýšením relaxivity. Komplexy P-aminomethylové skupiny vykazují je malé změny relaxometrických parametrů v závislosti na protonaci, ale chemické posuny a relaxační časy v  $^{31}\text{P}$  NMR jsou významně ovlivněny, což může být využito v  $^{31}\text{P}$  MRS. Komplexy nového ditopického ligandu vykazují komplikovanou isomerii (32 isomerů) a relaxivita GdGd komplexu se dvojnásobila. Složitost studovaných systémů vyžadovala použití celé řady dostupných fyzikálně-chemických technik. Autor tyto metody použil účelně a správně interpretoval výsledky svých měření. Některá měření prováděl v rámci dvou kratších stáží v Itálii a UK. Prokázal, že je schopen zpracovat dané téma do uceleného souboru originálních výsledků. Předložená práce vyústila do 3 zveřejněných prvoautorských publikací v impaktovaných časopisech. Dále je doktorand spoluautorem publikace na jiné téma a 14 konferenčních příspěvků formou posterů a přednášek na domácích i zahraničních konferencích. Práce je psána srozumitelným jazykem a po formální stránce obsahuje jen malý počet drobných chyb a překlepů, které jsem označil přímo v textu. Z hlediska grafického zpracování je práce vypracována pěkně. Barevné obrázky, grafy, spektra, tabulky a schémata účinně předávají informaci čtenáři.

Na závěr konstatuji, že doktorand vykonal velké množství experimentální práce a předvedl své vědecké a tvůrčí schopnosti na požadované úrovni. Předložená práce splňuje všechny požadavky kladené na kvalitu a rozsah disertační práce, a proto ji **doporučuji k obhajobě**.



.....  
**prof. RNDr. Jiří Pinkas, Ph.D.**  
**Masarykova univerzita**  
**Přírodovědecká fakulta**  
**Ústav chemie**  
**e-mail: [jpinkas@chemi.muni.cz](mailto:jpinkas@chemi.muni.cz)**