

UNIVERZITA KARLOVA
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

DISERTAČNÍ PRÁCE

MAKROCYKLIČKÉ KOMPLEXY LANTHANOIDŮ S FOSFONÁTOVÝMI A FOSFINÁTVÝMI
PENDANTNÍMI RAMENY

Praha 2022

Soňa Procházková

Prohlášení:

Tímto prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci vypracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité literární zdroje. Tato práce a ani její část nebyla použita k získání žádného jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, dne 4. ledna 2022

Soňa Procházková

OBSAH

Abstrakt.....	3
Abstract	4
Úvod.....	5
Zobrazovací metody v medicíně.....	5
Kontrastní látky	5
Polyazamakrocycly	6
Radiofarmaka.....	9
Metalodiagnostika pro MRI.....	13
Termodynamická stabilita komplexů.....	18
Kinetika formace a disociace komplexů	20
Cíl práce.....	22
Výsledky a diskuze	24
Kinetika formace komplexů	24
Stabilita <i>out-of-cage</i> komplexů	32
Tvorba <i>in-cage</i> komplexů.....	33
Komplexace za radiochemických podmínek	36
Vlastnosti ligandů s dvěma koordinačními centry	37
Termodynamická stabilita	38
Disociační kinetiky	40
Závěr.....	43
Literatura.....	45
Prohlášení o podílu autorky na práci	57
Přílohy.....	58

ABSTRAKT

Zobrazovací metody se v dnešní medicíně staly nedílnou součástí diagnostických i terapeutických postupů. Pro zlepšení finálního obrazu se často využívají kontrastní látky založené na komplexech kovů – v nukleární medicíně s radioizotopy, při MRI hlavně s ionty gadolinitými. Tyto komplexy musí vykazovat vysokou kinetickou i termodynamickou stabilitu a zároveň jejich příprava nesmí být časově náročná.

Jedním z vhodných typů ligandů pro tvorbu stabilních komplexů je ligand H₄DOTA a od něj odvozené sloučeniny. Tato práce se zaměřuje na fosfonátové a fosfinátové deriváty ligandu H₄DOTA. Studované látky lze rozdělit na ligandy obsahující pouze methylfosfinát/fosfonát (H₄DO3AP^H, H₅DO3AP^{OH}) a ligandy s druhým koordinačním centrem (H₆DO3AP^{IDA}, H₅DO3AP^{PIN}, H₄DO3AP^{AM}, H₈DO3AP^{BP} a H₇DOTAM^{BP}).

Práce zkoumá možnosti ovlivnění způsobu a rychlosti komplexace za různých podmínek. Abychom se přiblížili podmínkám přípravy radiokomplexů, byla provedena kinetická měření nejen v nadbytku iontů kovu, ale i v nadbytku ligandu. Cílem bylo porovnat výsledky obou typů měření, které se ukázaly často velmi rozdílné. Byl navržen mechanismus vzniku různého typu meziproductů vznikajících v průběhu komplexace.

Rychlost komplexace dále ovlivňoval typ pendantního ramene na makrocycly. Přidání kyselé skupiny jako dalšího slabě koordinujícího místa v molekule (např. fosfináty na H₅DO3AP^{PIN}) vedlo ke zrychlení tvorby komplexu, naopak přítomnost další amino skupiny (H₄DO3AP^{AM}) komplexaci ztlačně zpomalovala. Jako další důležitá vlastnost se ukázala stabilita *out-of-cage* komplexu (tj. přechodný komplex vznikající koordinací iontu kovu na koordinující skupiny pendantního ramene). Přítomnost slabě koordinující skupiny komplexaci urychlovala, ale silněji koordinující skupina (např. iminodictová skupina v ligandu H₆DO3AP^{IDA}) rychlost přechodu iontu kovu do makrocycly (vznik *in-cage* komplexu) výrazně zpomalovala.

ABSTRACT

Imaging methods have become an integral part of diagnostic and therapeutic procedures in current medicine. Contrast agents based on metal complexes are often used to improve the final image. Complexes contain radioisotopes in nuclear medicine and gadolinium(III) ion in MRI. These complexes have to show high kinetic and thermodynamic stability and their preparation must not be time consuming.

H₄DOTA and its derivatives are convenient type of ligand for the formation of stable complexes. This work has focused on phosphonate and phosphinate derivatives of the ligand H₄DOTA. The studied compounds can be divided into ligands containing only methylphosphinate/phosphonate (H₄DO3AP^H, H₅DO3AP^{OH}) and ligands with a second coordination center (H₆DO3AP^{IDA}, H₅DO3AP^{PIN}, H₄DO3AP^{AM}, H₈DO3AP^{BP} a H₇DOTAM^{BP}).

The work has examined the possibilities of influencing the way and rate of complexation under different conditions. In order to approach the preparation conditions of radio complexes, kinetics measurements were performed not only under the metal ions excess, but also under the ligand excess. The aim was to compare the results of both types of measurements, which often showed to be different. A mechanism for the formation of various types of intermediates formed during complexation has been proposed.

The complexation rate was further affected by the type of pendant arm on the macrocycle. The introduction of an acidic group as another weakly coordinating site in the molecule (e.g. phosphinates on H₅DO3AP^{PIN}) led to complex formation acceleration, on the contrary, the presence of another amino group (H₄DO3AP^{AM}) significantly slowed down the complexation. Another important feature was the stability of the *out-of-cage* complex (i.e., the transition complex formed by the coordination of the metal ion to the coordinating groups of the pendant arm). The presence of a weakly coordinating group accelerated the complexation, but a more strongly coordinating group (e.g. the iminodiacetic group in the ligand H₆DO3AP^{IDA}) significantly slowed down the rate of transition of the metal ion into the macrocycle (formation of the *in-cage* complex).

ÚVOD

ZOBRAZOVACÍ METODY V MEDICÍNĚ

Možnosti zobrazovacích metod používaných v medicíně dosáhly v posledních desetiletích značného rozmachu. Svůj podíl na tom má i vliv rozvoje počítačových technik zpracovávajících získaná data na výsledný dvoj i trojrozměrný obraz. Ještě v první polovině dvacátého století byl jedinou možností zobrazení vnitřku lidského těla rentgen. První CT v tehdejší ČSSR získalo pracoviště v Hradci Králové v roce 1978. Počítače tehdy zabíraly celou místnost a jejich klimatizace byla nejporuchovější součástí přístroje.¹ Dnes je již k dispozici celá řada zobrazujících technik, které dávají informace nejen anatomické, ale i fyziologické (o probíhajících chemických a fyzikálních procesech) a funkční (o metabolismu, mozkové aktivitě, krevním zásobením a dalších).

Mezi nejpoužívanější metody patří: CT (*Computer Tomography*), MRI (*Magnetic Resonance Imaging*), SPECT (*Single-Photon Emission Computed Tomography*) a PET (*Positron Emission Tomography*). Metody můžeme dělit také podle umístění zdroje záření na externí, kdy je zdroj záření umístěn mimo sledovaný objekt (rentgen, CT), nebo interní, kdy zdroj je uvnitř zobrazovaného objektu. Interní metody mohou být pasivní (optické či tepelné zobrazování), nebo aktivní (zdroj energie je vpraven do pacienta, např. radioaktivní zářič). Metody lze také kombinovat (např. PET/CT).

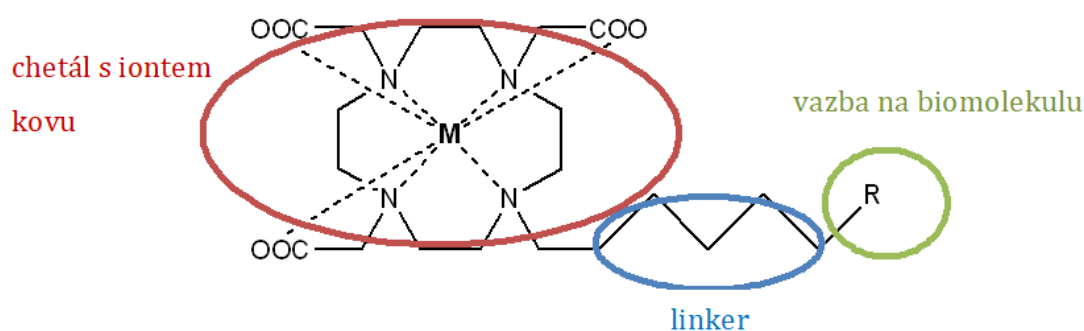
Pro zlepšení finálního obrazu během vyšetření některou výše zmíněnou metodou se pacientovi často aplikuje kontrastní látka.

KONTRASTNÍ LÁTKY

Využití komplexů kovů jako kontrastních látek v diagnostice a léčbě se zakládá na jejich schopnosti koncentrovat se v určitých orgánech, tkáních nebo typech buněk. Tato jejich afinita je podmíněná specifickými interakcemi s biomolekulami a zapojením se do různých biochemických dějů v organismu, což umožňuje získávat informace o fyziologických i patofyziologických procesech.

Konkrétní iont kovu se vybírá především podle požadovaného typu fyzikální interakce a způsobu její indikace. Jedná se nejčastěji o měření radioaktivity (SPECT, PET), nebo absorpce radiofrekvenčního záření jádru atomů (MRI). Výsledný signál po zpracování poskytne trojrozměrný obraz distribuce daného komplexu v živém organismu. Iont kovu tedy funguje jako indikátor, zlepšuje prostorové rozlišení

(kontrast) a podané látce se pak říká látka kontrastní.² Afinita kontrastní látky kurčitému druhu tkáně (buněk, receptorů, biochemickému procesu) souvisí nejen s iontem kovu, ale především s typem ligandu, a i s celkovou strukturou komplexu. V začátku používání kontrastních látek na bázi komplexů kovů byly tyto dvě funkce – bioafinita a koordinační vazba iontu kovu jako indikátoru – vzájemně úzce spojené, zatímco při moderním cíleném designu jsou často prostorově oddělené: část komplexu, jejíž funkcí je zabezpečovat co nejpevnější vazbu s centrálním atomem kovu (tvorba chelátu) je navázána spojovacím článkem (linker) s částí ligandu vykazující bioafinitu (**Obr. 1**).



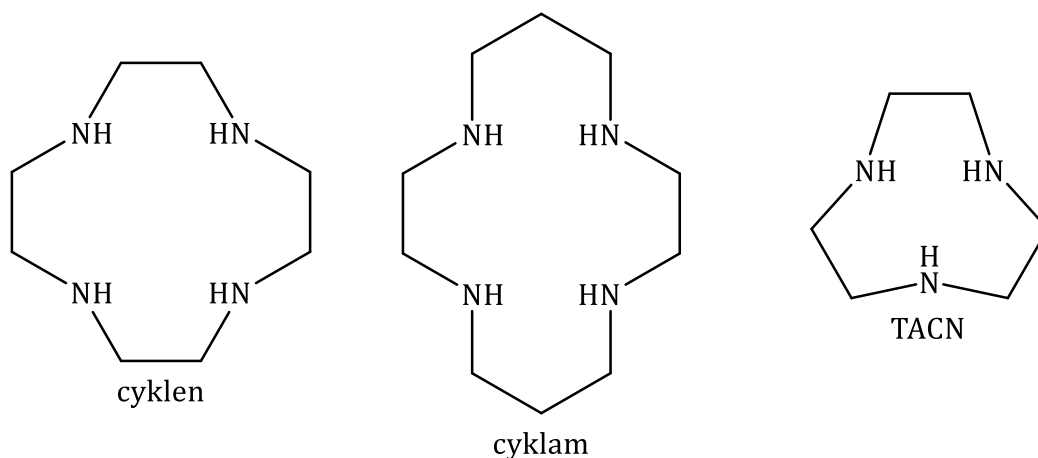
Obr. 1 Schématické znázornění cíleného designu kontrastní látky

Vysoká stabilita komplexu (kinetická, termodynamická) je při metalodiagnostických metodách klíčová z důvodu časté toxicity volných (hydratovaných) iontů kovů.³ Radionuklidy, ani gadolinium se nemohou podat pacientovi ve volné formě kvůli možným a pravděpodobným nespecifickým interakcím v lidském těle. Proto se musí nejprve připravit termodynamicky stálé a kineticky inertní komplexy, které brání uvolnění nuklidu. V případě radionuklidů musí být příprava takovýchto komplexů co nejrychlejší, protože většina používaných radionuklidů má krátký poločas rozpadu (v řádu minut či hodin).

POLYAZAMAKROCYKLY

Jako vhodné ligandy pro kontrastní látky se osvědčily polyazamakrocykly. Byly syntetizovány různé cykly lišící se počtem atomů uhlíku i dusíku a případně obsahující i další heteroatomy. Cykly byly také modifikovány pendantními rameny přinášejícími další funkce sloučeniny.

Jako první byl již koncem 50. let 20. století připraven cyklen (1,4,7,10-tetraazacyklododekan), následovaný cyklamem (1,4,8,11-tetraazacyklotetradekan) a TACN (1,4,7-triazacyklononan) (**Obr. 2**).



Obr. 2 Základní polyazamakrocykly

Všechny tyto azacykly vykazují vysokou bazicitu aminových skupin, a tudíž i schopnost vytvářet komplexy s vysokou stabilitou. Zkoumání jejich schopnosti komplexace iontů přechodných kovů vedlo k formulaci makrocyklického efektu.⁴ Později v 80. letech začaly být syntetizovány *N*-substituované azacykly. Nejběžnější jsou acetátové deriváty H₄DOTA, H₄TETA a H₃NOTA, které tvoří velmi stabilní komplexy s celou řadou iontů kovů v širokém rozmezí pH.⁵

Uvedená stabilita komplexů, zejména lanthanoidových komplexů s H₄DOTA, umožnila jejich využití v medicíně. Nejznámějším a také nejužívanějším jsou Gd(III) komplexy ligandu H₄DOTA a jeho derivátů, které se široce používají jako kontrastní látky pro zobrazování magnetickou rezonancí. H₄DOTA a její deriváty jsou také ligandy první volby pro komplexaci radionuklidů. Mnoho lanthanoidových komplexů je také studováno jako luminiscenční senzory.

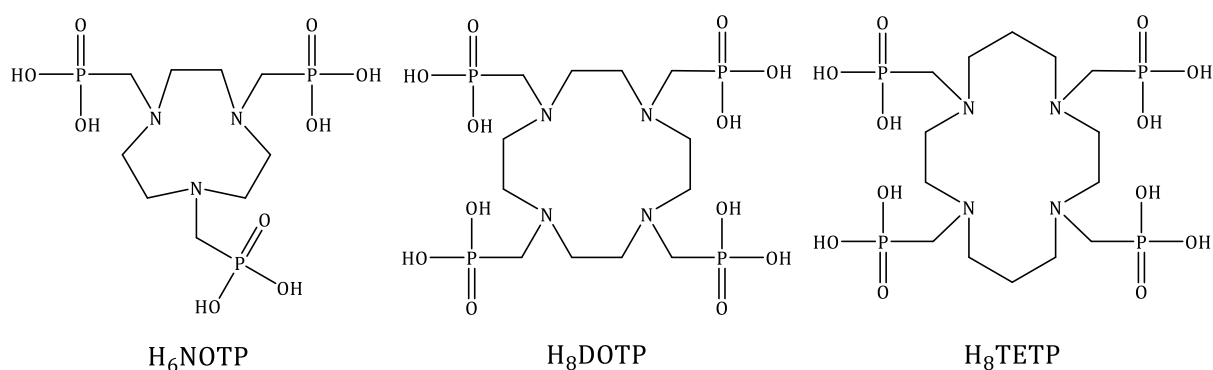
V současnosti používané sloučeniny však mají k ideálním vlastnostem stále daleko. Polyazamakrocykly vykazují vysokou termodynamickou stabilitu komplexů, avšak rychlost komplexace bývá nízká. MRI účinnost komplexů [Gd(III)DOTA] a jejich derivátů není vysoká. Také příprava komplexů s radioizotopy není ideální. Komplexace radioizotopu je často pomalá a dochází k zbytečné ztrátě radioaktivity. H₄DOTA také není ideální ligand pro všechny ionty kovů kvůli jejich rozdílné velikosti a chemickým vlastnostem. To vše dohromady otvírá možnosti přípravy nových látek s vylepšenými vlastnostmi. Během let byly syntetizovány polyazamakrocykly s řadou různých

pendantních ramen, které dodávají další unikátní chemické vlastnostmi a rozšiřují možnosti jejich využití. Důležitou skupinou jsou pendantní ramena obsahující fosfonátové nebo fosfinátové skupiny.

Fosfonátové/fosfinátové skupiny na ligandu mají tři hlavní role:

- 1) Zvyšují rychlost komplexace – fosfonátová/fosfinátová pendantní ramena disociují při nižším pH než karboxyláty a také mění basicitu atomů dusíků aminoskupin na makrocyklu, čímž mění celkové komplexační vlastnosti ligandu.
- 2) Bifunkčnost – fosfináty dovolují připojení dalších funkčních skupin, které se mohou vázat k cílové biomolekule.
- 3) Úprava biodistribuce a farmakokinetiky – fosfonáty i fosfináty zvyšují hydrofilitu komplexu a mění farmakokinetiku a biodistribuci. Bis(fosfonáty) jsou známé svou vysokou afinitou k hydroxoapatitu, což vede k zvýšené akumulaci komplexu v kostech.⁶

Jako první zkoumal fosfonátové deriváty TACN, cyklohexanu a cyklamenu Kabachnik (Obr 3).



Obr. 3 Fosfonátové analogy polyazamacrocyklů

Konstanty stability kyseliny 1,4,7-triazacyklononan-1,4,7-tris (methylfosfonové) (H₆NOTP)⁷ a kyseliny 1,4,7,10-tetraazacyklododekan-1,4,7,10-tetrakis (methylfosfonové) (H₈DOTP)⁸ s řadou iontů kovových byly publikovány již v roce 1984. Později byla připravena kyselina 1,4,7,11-tetraazacyklotetradekan-1,4,7,11-tetrakis (methylfosfonová) (H₈TETP), u které byla pozorována vysoká komplexační schopnost, zejména vůči Cu(II).⁹

Kromě zmíněných H₆NOTP, H₈DOTP a H₈TETP bylo syntetizováno a zkoumáno také množství dalších azacyklů nesoucích methylfosfonátovou nebo methylfosfinátovou skupinu. Práce se zaměřovaly hlavně na jejich využití v biomedicíně jako kontrastní látky nebo luminiscenční sondy.¹⁰

Nejběžnějším připojením fosfonátu/fosfinátu ke kruhu je přes methylenový můstek mezi aminovou skupinou makrocyklu a atomem fosforu. Tyto ligandy se nazývají methylofosfonátové/fosfinátové nebo také α -fosfonátové/fosfinátové a fosfonátová/fosfinátová skupina se stává důležitou součástí koordinační sféry. Fosfonátová/fosfinátová skupina, která je vázána na amin makrocyklu přes delší řetězec než methylenový, tvoří distální fosfonát/fosfinát. Takové seskupení již nemůže tvořit pětičlenné chelátové kruhy a fosfonátová/fosfinátová skupina zůstává nekoordinovaná nebo pouze slabě koordinovaná.

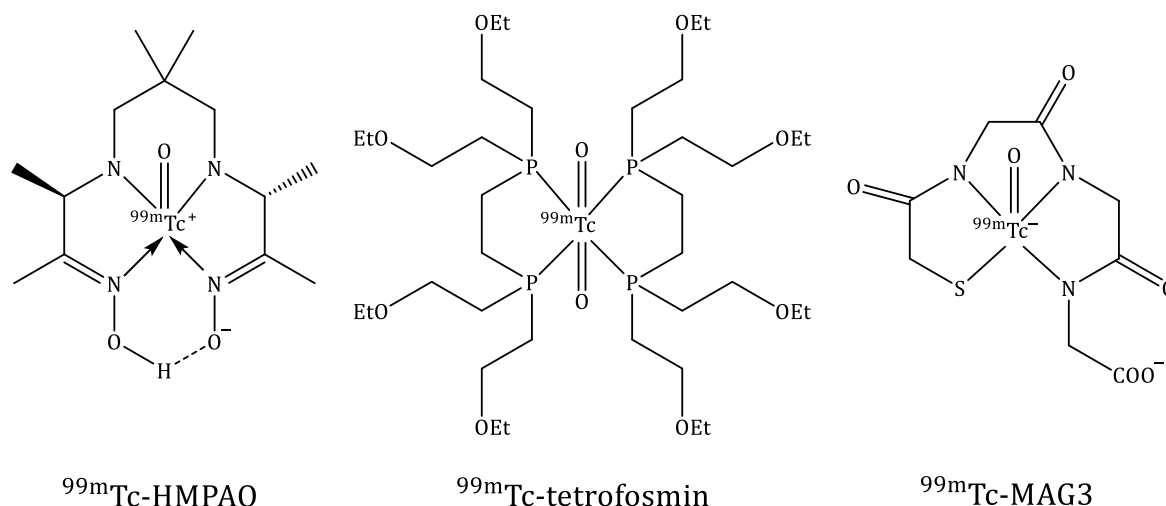
Tato práce se zaměřuje na studium acidobazických a koordinačních vlastností derivátů H₄DOTA modifikovaných α -fosfonátovými/fosfinátovými skupinami. H₄DOTA a její analogy jsou oktadentátní ligandy, které jsou první volbou pro komplexaci iontů lanthanoidů. Kromě toho jsou ligandy odvozené od H₄DOTA používány i pro komplexaci mnoha dalších iontů přechodných kovů i radioizotopů.

RADIOFARMAKA

Radionuklidy našly své využití v medicíně jak v terapii, tak i v diagnostice. První a nejjednodušší využití kontrastní látky v radiomedicíně byla aplikace málo rozpustného síranu barnatého v rentgenografii pro zobrazování gastrointestinálního traktu. Pokročilejší techniky nukleární medicíny jsou založené na detekci radioaktivního záření (γ -záření) emitovaného centrálním atomem kovu (radiofarmaka).¹¹ Zpočátku umožňovaly jen vytvoření dvojrozměrného obrazu (scintigrafie), až zavedení výkonných počítačových systémů umožnilo rekonstruovat ze série měření trojrozměrný obraz.¹²

Klasická a stále nejrozšířenější varianta je technika SPECT (*Single-Photon Emission Computed Tomography*, jednofotonová emisní počítačová tomografie).¹³ Technika detekce v tomografickém přístroji je určena energií emitovaného záření. Jako radionuklidy se používají emitory γ -záření o určité energii. Poločas přeměny by měl být dostatečně dlouhý, aby mohlo docházet k účinnému ustavení rovnováhy (akumulace radiofarmaka v cílovém orgánu nebo tkáni), ale ne příliš dlouhý, aby se zabránilo nadměrné radiační zátěži pacienta. Nejrozšířeněji používaný radionuklid pro SPECT je izotop ^{99m}Tc, další vhodné radionuklidy jsou např. ¹¹¹In, ⁶⁷Ga. Izotop ^{99m}Tc kombinuje více příznivých vlastností – poměrně krátký poločas přeměny (6 h), vhodnou energii emitovaného γ -záření (141 keV), vysokou specifickou aktivitu a vhodné koordinačně-chemické vlastnosti.¹⁴ Při radioaktivní přeměně vzniká málo aktivní β -zářič ⁹⁹Tc. Jedním

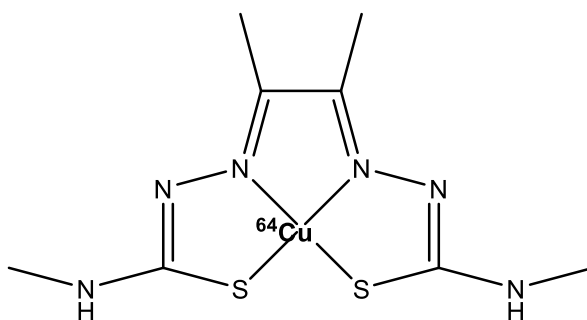
z rozhodujících faktorů všeobecného rozšíření tohoto radionuklidu v nukleární medicíně je jeho dostupnost. ^{99m}Tc se získává pomocí generátorového systému $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$, který umožňuje kontinuální odběr ^{99m}Tc vznikajícího radioaktivní přeměnou ^{99}Mo . Samotný nuklid ^{99}Mo je dostupný ozařováním ^{235}U neutrony v jaderném reaktoru. Molybden je v generátorovém systému absorbovaný na chromatografické koloně naplněné oxidem hlinitým jako MoO_4^{2-} . Během odběru je ^{99m}Tc vymýváno fyziologickým roztokem jako $^{99m}\text{TcO}_4^-$. Takto získaný roztok technecianu je pro některé aplikace možné použít přímo (např. zobrazení štítné žlázy a mozku), ale ve většině případů je potřeba připravit jeho komplex s vhodným ligandem. Za tímto účelem je technecium nejprve redukováno redukčním činidlem (např. SnCl_2) za vzniku některého z nižších oxidačních stupňů a následně zakomplexované. Výběr ligandu souvisí s konkrétním typem aplikace a požadovanou bioafinitou. V současnosti jsou možnosti aplikace komplexů ^{99m}Tc v klinické diagnostice i ve výzkumu početné a využívají se při zobrazování množství různých orgánů a jejich funkcí, např. ^{99m}Tc -HMPAO pro zobrazení lokální perfuze mozku, ^{99m}Tc -tetrofosmin pro diagnostiku perfuze myokardu, ^{99m}Tc -MAG3 pro zobrazení ledvin i celých červených krvinek pro zobrazování krevního oběhu (**Obr 4**). Novější bifunkční komplexy technecia umožňují cílenou vazbu na různé receptory, např. ^{99m}Tc -TRODAT pro zobrazení dopaminového transportéru.¹⁵



Obr. 4 Komplexy používané v radiomedicíně

Novější používanou metodou je pozitronová emisní tomografie (PET, *Positron Emission Tomography*).¹⁶ Tato diagnostická metoda využívá radionuklidy, které podléhají β^+ -přeměně. Vznikající pozitrony anihilují s elektrony z okolní tkáně, přičemž dochází ke vzniku dvou fotonů (kvant γ -záření) o energii 511 keV pohybujících se

opačným směrem (v úhlu 180° vůči sobě). Na základě této prostorové orientace vznikajícího záření je poté možné pomocí systému detektorů a počítačového zpracování údajů získat trojrozměrný obraz distribuce daného radionuklidu v těle. Vyhodnocují se pak jen ty signály, které dopadnou ve stejný čas na opačnou stranu detektoru, čímž se oproti jednopaprskové metodě získává lepší poměr signál:šum. Podobně jako při technice SPECT je i zde stěžejní hodnota poločasu přeměny radionuklidu – dostatečně dlouhá pro izolaci radionuklidu, přípravu radioaktivně značené sloučeniny a její aplikaci *in vivo*, ale zároveň dostatečně krátká, aby se snížila radiační zátěž organismu. Nejpoužívanější pozitronový zářič pro PET je ^{18}F , mezi další vhodné zářiče patří např. ^{64}Cu , ^{68}Ga , ^{82}Rb a ^{89}Zr . Příkladem novějšího radiofarmaka je ^{64}Cu -ATSM (**Obr. 5**), které je selektivně akumulované v hypoxických tkáních (stav častý v tumorech).¹⁷ Také cyklámové deriváty mají vysokou selektivitu pro Cu(II), a proto jsou studovány hlavně jako ligandy vhodné pro komplexaci radionuklidů mědi.



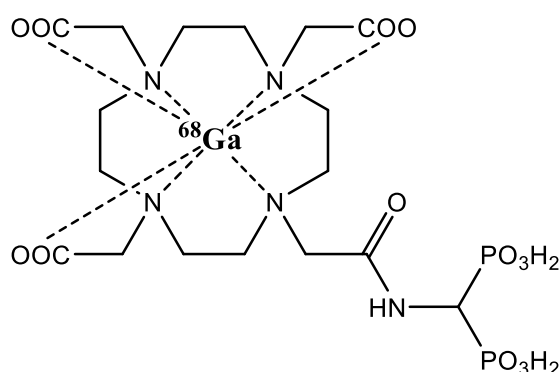
Obr. 5 Struktura komplexu ^{64}Cu -ATSM

K terapii nádorových onemocnění se používají β^- zářiče. Střet emitovaných částic s okolní tkání vede k jejímu závažnému poškození a následně k buněčné smrti. Mezi nejpoužívanější izotopy patří ^{153}Sm a ^{166}Ho , dále jsou studovány i izotopy ^{90}Y , ^{177}Lu a ^{188}Re . Právě radiokomplexy s fosfonátovými ligandy se používají především k léčbě kostních onemocnění, zejména kostních metastáz a k potlačování bolesti kostí. Jako látka selektivně se vážící na kosti byl studován systém $^{99\text{m}}\text{Tc}$ - H_8DOTP .¹⁸ Bylo zjištěno, že účinnost radioaktivního značení je vyšší než 97 % a stabilita v séru ukazuje, že $^{99\text{m}}\text{Tc}$ zůstalo navázáno na DOTP po dobu až 24 hodin. ^{166}Ho komplex s H_8DOTP byl nejprve použit pro radio-ablaci před transplantací kostní dřeně u psů¹⁹ a posléze i u pacientů s mnohočetným myelomem.²⁰ ^{166}Ho umožňuje jak zobrazovací, tak i dozimetrické studie. Komplex $[\text{}^{166}\text{Ho}(\text{III})\text{DOTP}]$ byl testován pro kosterní dozimetrii²¹ a také byl zkoumán jako model radionuklidového kalibrátoru.²² Komplex byl také použit v klinické studii, která hodnotila cílenou kostní radioterapii metastatického karcinomu prsu.²³

Protože vysoce energetické β^- částice ^{166}Ho způsobují nadměrné potlačení kostní dřeně, byla jako alternativa k ^{166}Ho navržen β^- emitor ^{186}Re , který vyzařuje nižší energii. Ale ukázalo se, že DOTP není vhodný ligand pro ^{186}Re kvůli nevyhovující velikosti iontu kovu. Jako mnohem stabilnější se ukázal komplex s H_8TETP .²⁴

H_8DOTP a H_8TETP byly značeny i jinými radionuklidy z řady lanthanoidů – ^{111}In ,²⁵ ^{153}Sm ,²⁶ ^{169}Er ,²⁷ ^{170}Tm ²⁸ a ^{175}Yb .²⁹ Všechny tyto komplexy vykazovaly výraznou akumulaci do skeletu. Také komplex $^{177}\text{Lu(III)DOTP}$ je slibným prostředkem pro paliativní terapii bolesti způsobené kostními metastázami.³⁰

Další možností vytvoření vhodné látky s afinitou ke kostní tkáni je navázání geminální bis(fosfonátové) skupiny přes spojovací můstek na makrocyklus, zejména DOTA. Komplex $^{68}\text{Ga(III)BPAMD}$ (Obr. 6) byl nejen úspěšně použit ve studii jako kontrastní látka pro PET porovnatelná s používanými ^{18}F -fluorovanými kontrastními látkami,³¹ ale samotný ligand BPAMD je dnes už i komerčně dostupný a je široce zkoumáno jeho použití i s jinými radioizotopy.³² Komplex $^{68}\text{Ga(III)BPAMD}$ je vhodný pro diagnostiku kostních metastáz prostřednictvím PET/CT,³³ kdežto komplex $^{177}\text{Lu(III)BPAMD}$ byl studován pro léčebnou kostní endoradioterapii.³⁴ Protože však DOTA není úplně vhodný ligand pro iont Ga(III) , byly připraveny i bis(fosfonátové) deriváty NOTA vhodné pro PET diagnostiku.³⁵ ^{68}Ga NOTA-bis(fosfonát) byl využit pro vizualizaci mozkových metastáz při karcinomu prsu³⁶ a na zvířecím modelu pro sledování podaných apatitových nanočástic.³⁷



Obr. 6 Struktura komplexu $^{68}\text{Ga(III)BPAMD}$

Menší pozornost byla věnována derivátům H_4DOTA s fosfinátovými pendantními rameny. Například tris(methylfosfinát) byl značen ^{90}Y a konjugován s nádorovou protilátkou.³⁸ Bifunkční deriváty s 4-aminobenzylfosfinátovým ($\text{DO3AP}^{\text{ABn}}$) nebo 2-karboxyethylfosfinátovým ($\text{DO3AP}^{\text{PrA}}$) pendantním ramenem byly testovány na komplexaci ^{90}Y ,³⁹ ^{111}In ,⁴⁰ ^{153}Sm a ^{166}Ho .⁴¹ Tvorba všech uvedených komplexů byla velmi

rychlá i při laboratorní teplotě a bylo dosaženo i vysokých výtěžků radioaktivního značení. Komplexy vykazují vysokou stabilitu, nízkou vazbu na plazmatické bílkoviny a rychlou orgánovou clearance. Fosfinátové komplexy se, na rozdíl od fosfonátových, selektivně neváží a nehromadí v kalcifikovaných tkáních. Monofosfinátové deriváty byly také studovány jako nosiče pro ^{44}Sc . Značení je pomalejší než u H_4DOTA , nicméně komplexy vykazují dostatečnou stabilitu.⁴²

METALODIAGNOSTIKA PRO MRI

Další velmi používanou zobrazovací metodou je magnetická rezonanční tomografie (*Magnetic Resonance Imaging*, MRI). Tato metoda spočívá v měření rozdílné intenzity ^1H NMR signálu vody obsažené v různých tkáních, a proto i kontrastní látky jsou založeny na jiném principu než kontrastní látky pro radiomedicínu.⁴³ Na rozdíl od metod používajících radiofrekvenční záření má vyšetření pomocí MRI podstatně nižší nežádoucí účinky. Vyšetření probíhá tak, že pacient je umístěn v silném magnetickém poli (nejčastěji 1,5–3 T, výjimečně až 7 T) způsobujícím orientaci jaderných magnetických momentů (spinů) atomů vodíků ve směru tohoto vnějšího pole, které absorbuje radiofrekvenční záření. Lokální intenzita signálu závisí nejen na počtu molekul vody v dané tkáni, ale i na jejich relaxačním čase. Spinové relaxační časy (longitudinální a transverzální relaxace) jsou výrazně ovlivněny přítomností magneticky aktivních částic v detekované oblasti, na čemž jsou založeny MRI kontrastní látky. Různá délka relaxačních časů v různých tkáních napomáhá zvýšení kontrastu mezi těmito tkáněmi ve výsledném obrazu. Pokroky v přístrojové technice tomografie spolu s novými kontrastními látkami umožňují dosahovat stále vyššího kontrastu.

Kontrastní látky mohou být paramagnetické i feromagnetické. V současné době v praxi dominují paramagnetické kontrastní látky obsahující iont gadolinitý. Ale vyvíjejí se i kontrastní látky založené na iontech jiných kovů (např. Mn(II)), nebo feromagnetické nanočástice (oxidy železa a manganu).⁴⁴ Gadolinium má obzvlášť vhodné vlastnosti pro použití v MRI – vysoký počet nepárových elektronů a z toho vyplývající vysoký magnetický moment.⁴⁵

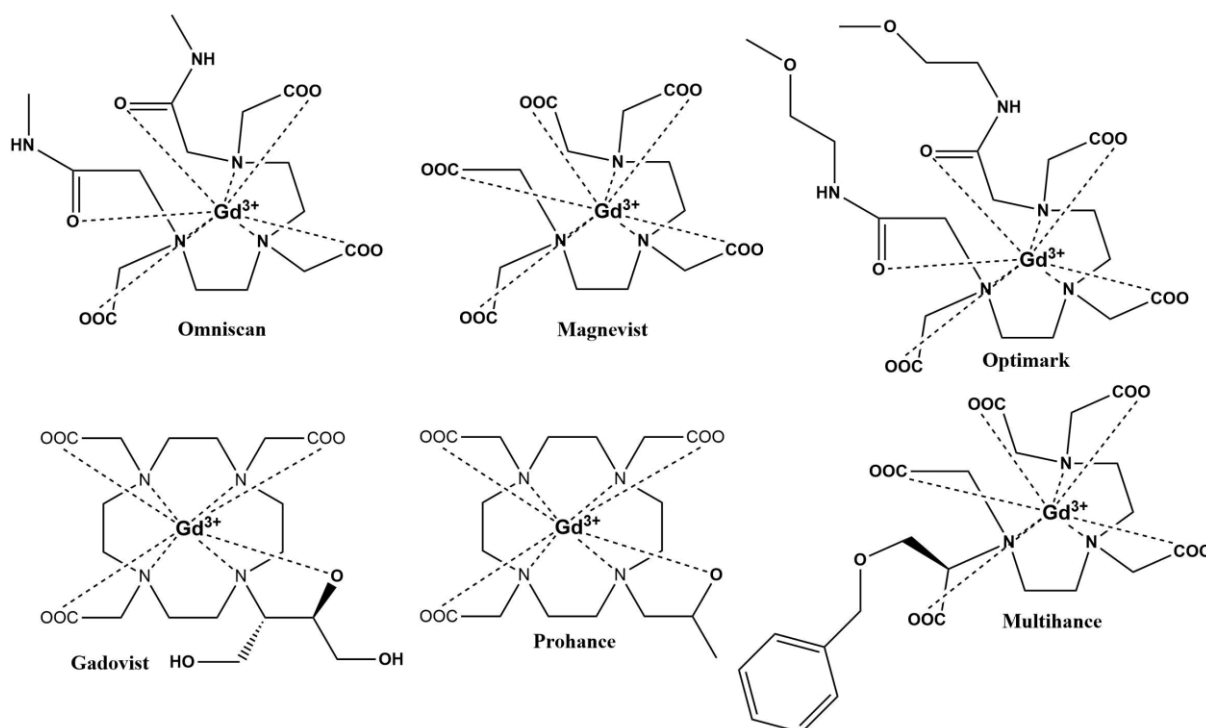
Kontrastní látka musí také vykazovat vysokou míru akumulace v dané tkáni, dostatečně dlouhý biologický poločas v organismu a vysokou stabilitu komplexu, aby se zabránilo uvolňování toxického iontu Gd(III) do organismu. Komplex gadolinia musí

také obsahovat alespoň jednu molekulu vody koordinovanou přímo na centrální atom, která usnadňuje spinovou interakci mezi iontem gadolinia a okolními molekulami vody.

Oblast vývoje nových kontrastních látek pro MRI je předmětem intenzivního výzkumu.⁴⁶ Jako ligandy se nejčastěji používají deriváty cyklenu. Dříve se používaly i acyklické ligandy jako DTPA (kyselina diethylenetriaminpentaoctová), ale kvůli nízké stabilitě jejich komplexů je nahradily makrocyclické ligandy. Tyto ligandy jsou oktadentátní. Koordinační číslo iontu gadolinia je zpravidla 9, což umožňuje potřebnou koordinaci jedné molekuly vody. Podobně jako v případě radiofarmak je možné navázat na ligand i další skupinu se specifickou bioafinitou a dosáhnout tak zobrazení konkrétních fyziologických či patologických procesů v organismu.⁴⁷ V rámci vývoje nových kontrastních látek převládá snaha o přípravu látek co nejvíce zkracujících relaxační časy. Toho je možno dosáhnout vícero způsoby – modifikací ligandu, zvýšením počtu molekul vody přímo koordinovaných na centrální atom (aqua ligandy),⁴⁸ zvětšením rozměrů komplexu za použití objemných ligandů nebo makromolekul. Jiným způsobem může být použití feromagnetických nebo superparamagnetických nanočástic (např. nanočástice na bázi oxidů železa s povrchově vázanými makromolekulárními látkami, jako jsou polyethylenglykol, dextran či albumin).

Kontrastní látky na bázi lanthanoidů jsou všeobecně považovány za bezpečné. Přesto v určitých podmínkách dochází ke vzniku nežádoucích účinků. Ty jsou zpravidla spojené s disociací komplexu *in vivo*, kdy se uvolněný iont kovu může při delším biologickém poločase akumulovat v různých orgánech a způsobit jejich poškození (např. akumulace iontů gadolinia v ledvinách a mozku). Tyto komplikace jsou pravděpodobnější u pacientů se sníženou funkcí ledvin, ale byly pozorovány i u zdravých pacientů.⁴⁹ Nejznámější onemocnění dávané do spojitosti s použitím vysokých dávek kontrastních látek s obsahem iontů gadolinových je nefrogenní systémová fibróza (NSF; dříve známá jako nefrogenní fibrotizující dermopatie). Toto závažné onemocnění připomínající sklerodermii se projevuje systémovým zánětem následovaným formováním pojivové tkáně v kůži a podkoží. Účinná terapie zatím není známá. Přestože se kontrastní látky používají již od 80. let minulého století, první zmínka o NSF se ve světové literatuře objevila až v roce 2000⁵⁰ a až v roce 2006⁵¹ byla dána do souvislosti s podáním kontrastní látky. Převážně šlo o látky Omniscan, Magnevist a Optimark, dále byly zaznamenány i případy po aplikaci Gadovistu a Prohance (**Obr. 7**). Na rozvoj NSF má vliv nejen termodynamická stabilita kontrastní látky, ale i její kinetická stabilita. To je patrné u

lineárních látek jako Magnevist a Multihance, které, ač mají hodnoty termodynamických konstant stability srovnatelné s cyklickými cheláty, jsou řazeny mezi rizikovější. Nicméně překvapivě má z výše zmíněných látek nejvyšší hodnotu LD₅₀ (tj. je nejméně toxický) lineární Omniscan.⁵² Nověji byla zjištěna retence gadolinia v mozku.⁵³ Tento fenomén poprvé popsal Kanda v roce 2014⁵⁴. V následujících letech byla publikována řada prací, které u pacientů po aplikacích gadolinitých kontrastních látek, obzvláště při opakovaném podávání, popisují zvýšenou intenzitu signálu. Gadolinium se akumuluje především v oblastech *nucleus dentatus* a *globus pallidus*, kde je vázáno na metaloprotein feritin, který je zde vysoce koncentrovaný. Tento předpoklad potvrzují i *in vitro* studie afinity gadolinia k feritinu.⁵⁵ Zatím však nebyl prokázán žádný neurologický symptom spojený s akumulací gadolinia v mozku. Ani zvířecí modely neukázaly histopatologické změny mozkové tkáně, a to i při řádově vyšších dávkách kontrastních látek.⁵⁶



Obr. 7 Struktura diskutovaných kontrastních látek

V současnosti se stále více kombinují diagnostické techniky, což umožňuje spojovat přednosti jednotlivých metod. PET/MRI kombinuje vysokou citlivost PET s dobrým prostorovým rozlišením MRI. Moderní směr výzkumu kontrastních látek je také vývoj kontrastních látek umožňujících propojení diagnostiky s terapií. Bylo by pak jednoduše možné prostorově lokalizovat patologickou změnu v organismu, léčit ji a sledovat i průběh léčby, čímž by se dala individualizovat léčba u jednotlivých pacientů (teranostika).⁵⁷

První práci o využití fosfonátových/fosfinátových makrocyclických ligandů s Gd(III) publikoval Geraldes.⁵⁸ Přestože tetrafosfonátové/fosfinátové komplexy přímo nekoordinují molekulu vody v komplexu, zvyšují relaxivitu (veličina relaxivity odráží, jak se mění rychlost relaxace protonů vody v závislosti na koncentraci) jiným mechanismem.⁵⁹ Fosfonátové/fosfinátové skupiny váží pomocí vodíkových vazeb molekulu vody, čímž ji přivádějí do těsné blízkosti („druhá hydratační sféra“), kde dochází k zrychlení relaxace molekul vody.⁶⁰ Přítomností druhé hydratační sféry má komplex [Gd(III)DOTP] hodnotu relaxivity srovnatelnou s klinicky využívanými kontrastními látkami obsahujícími jednu přímo koordinovanou molekulu vodu. Relaxivita [Gd(III)DOTP] může být ovlivněna interakcí fosfonátových skupin s atomy dusíku makrocyccku.⁶¹ Komplex [Gd(III)DOTP] byl testován pro zobrazování kostní tkáně. Nicméně *in-vitro* experimenty ukázaly po navázání komplexu na hydroxyapatit výrazné snížení MRI kontrastu z důvodu omezeného přístupu molekul vody na negativně nabitý povrch komplexu.⁶² Byla také publikována práce, kde je komplex [Gd(III)DOTP] vpraven do červených krvinek a toto je použito jako pO₂ specifická kontrastní látka.⁶³ Komplex [Dy(III)DOTP] byl použit pro zobrazování změny extracelulárního pH při nádorovém onemocnění.⁶⁴ Komplex [Gd(III)DO2A2P^R] s dipikolyaminovou skupinou navázanou na fosfinát byl zkoumán jako kontrastní látka senzitivní na přítomnost iontů Zn(II).⁶⁵

Ve snaze docílit kombinace vhodných vlastností H₄DOTA i H₈DOTP byly studovány další ligandy obsahující zároveň acetátová i fosfonátová/fosfinátová pendantní ramena. Komplex [Gd(III)DO2A2P] ještě na sobě přímo neváže molekulu vody a zvýšení relaxivity je dáno, obdobně jako u [Gd(III)DOTP], příspěvkem druhé sféry.⁶⁶ Komplex [Gd(III)DO3AP] však již obsahuje přímo koordinovanou molekulu vody.⁶⁷ Přítomnost jednoho fosfonátového pendantního ramene v blízkosti koordinačního místa pro molekulu vody vede k zrychlení výměny vody. Rychlost výměny vody je dále ovlivněna velikostí náboje pendantního ramene – snižuje se u mono- nebo diesterifikovaných derivátů [Gd(III)DO3AP^{0Et}] a [Gd(III)DO3AP^{0Et2}].⁶⁸

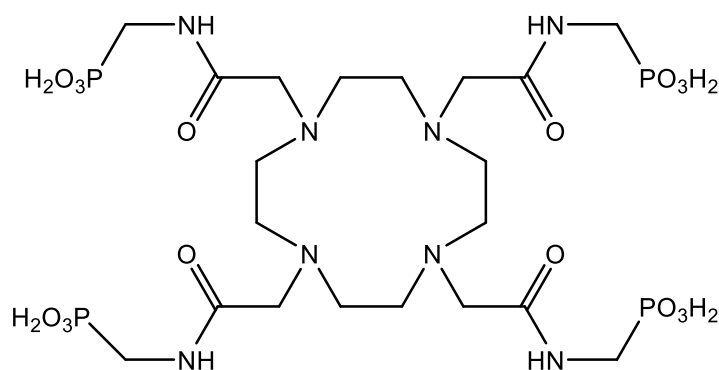
Další možností, jak zvýšit účinnost kontrastních látek, je zvýšit jejich molekulovou hmotnost. Byly proto studovány interakce komplexů [Ln(III)DOTP]⁶⁹ a [Ln(III)DO3AP^{ABn}]⁷⁰ s β/γ-cyklodextrinem obsahujícím amino skupiny.

Jak již bylo řečeno, bis(fosfonátové) deriváty mají vysokou afinitu k hydroxyapatitu. Proto byly ligandy odvozené od H₄DOTA nesoucí na pendantním rameni

bisfosfonátovou skupinu studovány jako kontrastní látky specificky se vážící na kostní tkáň.⁷¹ Po adsorpci na hydroxyapatit se relaxivita kontrastní látky významně zvyšuje díky snížení pohybu ukotvením komplexu. Úspěšně byly testovány deriváty obsahující bis(fosfonátovou) skupinu vázanou prostřednictvím karboxamidových nebo fosfinátových spacerů⁷² i analogický ligand obsahující hydroxybis(fosfonát).⁷³

Fosfonátové skupiny vykazují také vysokou afinitu k povrchům různých oxidových materiálů. Byly připraveny Gd(III) komplexy na nanokrystalickém TiO₂. Po adsorbování komplexu na povrch nanokrystalického TiO₂ přes fosfonátovou skupinu došlo k signifikantnímu zvýšení relaxivity.⁷⁴

Hodnota disociační konstanty kyseliny fosfonové se nachází v neutrální oblasti, a proto komplexy derivátů DOTA s pendantním ramenem obsahujícím distální fosfonáty byly studovány jako „chytré“ kontrastní látky reagující na změnu pH tkáně. Jako příklad lze uvést ligand DOTA-4AmP (**Obr. 8**). Fosfonátové skupiny v jeho komplexu [Gd(III)DOTA-4AmP] jsou lokalizovány v blízkosti koordinované molekuly vody, a proto jejich protonizace vede k rychlé prototropní výměně.⁷⁵ Změny relaxivity jsou v rozmezí pH vhodném pro měření *in vivo*. Komplex byl použit na zvířecích modelech na zobrazování ledvin a nádorů.⁷⁶ Komplex byl také konjugován s PAMAM dendrimerem, čímž se zvýšila jeho účinnost v MRI zobrazování.⁷⁷ Dále byl také použit jako součást nanočástic reagujících na pH.⁷⁸ Ligandy DOTA-4AmP, jeho estery a analogy s prodlouženými pendantními rameny byly také studovány jako kontrastní látky využívající CEST efekt (Chemical Exchange Saturation Transfer).⁷⁹



Obr. 8 Struktura ligandu DOTA-4AmP

Změna hodnoty relaxivity na pH byla popsána také pro derivát DO3A s 2-ethylfosfonátem a 3-propylfosfonátem. Po protonizaci je slabě koordinovaný fosfonát nahrazen molekulou vody. To vede ke zvýšení hydratačního čísla a tím pádem i ke zvýšení relaxivity.⁸⁰

Přítomnost fosfonátů způsobuje celkový negativní náboj Gd(III) komplexů. V důsledku toho komplex interaguje s pozitivně nabitými amidy makrocyclů a výsledný agregát vykazuje zvýšenou relaxivitu.⁸¹ Avšak u bis(fosfonátového) derivátu BPPED interakce s ionty kovů vede přímo k tvorbě koordinačních oligomerů a následně ke zvýšení relaxivity o 200–500 % prodloužením rotačně-korelačního času.⁸²

TERMODYNAMICKÁ STABILITA KOMPLEXŮ

Disociační konstanty H_4DOTA a konstanty stability jejích komplexů byly publikovány již na začátku 90. let.⁸³ U derivátů obsahující atomy fosforu byla hlavní pozornost věnována analogům H_8DOTP ,⁸⁴ nicméně řada termodynamických dat byla publikována také pro deriváty monofosfonátů/fosfinátů.⁸⁵

Stanovené hodnoty disociačních konstant a konstant stability jsou silně závislé na použitém elektrolytu sloužícího k udržení konstantní iontové síly. Použití solí sodných nebo draselných v porovnání se solemi tetramethylamonnými vede ke snížení bazicity makrocyclu kvůli koordinaci iontů Na^+ či K^+ do makrocyclické kavity.

Porovnání hodnot pK_a H_4DOTA a jejích fosfonátových/fosfinátových analogů (**Tab. 1**) ukazuje podobný způsob protonizace. První dvě protonizační konstanty se nacházejí v bazické oblasti a odrážejí protonizaci dvou protilehlých atomů dusíku makrocyclického kruhu. Na základě protonizace $H_4DOTA \cdot HCl$,⁸⁶ $H_4DOTP^{Ph} \cdot 4H_2O$, $(AdNH_3)_2(H_2DOTP^{Ph}) \cdot 6H_2O$ (kde $AdNH_2 = 1$ -adamantylamin),⁸⁷ $H_4DOTP^{Bn} \cdot HCl$ ⁸⁸ nebo H_8DOTP ⁸⁹ v pevném stavu je všeobecně přijímáno, že na pendantních ramenech dochází k dalším protonizacím, zatímco další dva atomy dusíku makrocyclu zůstávají neprotonizované. Přítomnost fosfonátových skupin vede ke zvýšení disociačních konstant makrocyclů. Naproti tomu fosfinátové deriváty snižují bazicitu makrocyclů. Izde však byla nalezena výjimka – poslední disociační konstanta H_4DOTP^{Ph} je neočekávaně vyšší než analogické hodnoty pro H_4DOTP^H a H_4DOTP^{Et} . Na základě výsledků ^{31}P NMR byl tento jev připisován sterickým zábránám a hydrofobním interakcím.⁹⁰

Tab. 1 Srovnání hodnot pK_a H_4 DOTA a jejích fosfonátových/fosfinátových analogů

ligand	H_4 DOTA	H_8 DOTP	H_7 DO3AP	H_6 DO2A2P	H_5 DO3AP
<i>ref.</i>	91	92	93	94	95
pK_1	12,6	13,7	13,66	13,02	13,83
pK_2	9,70	12,2	12,11	11,82	10,35
pK_3	4,50	9,28	7,19	6,35	6,54
pK_4	4,14	8,09	6,15	6,33	4,34
pK_5	2,32	6,12	5,77	3,13	3,09
pK_6	-	5,22	2,97	2,64	1,63

ligand	cyklen	H_4 DOTP ^{Ph}	H_4 DOTP ^H	H_4 DOTP ^{Et}	H_4 DO3AP ^{ABn}
<i>ref.</i>	96	97	98	99	100
pK_1	10,6	11,44	10,41	10,94	12,55
pK_2	9,6	7,27	6,84	8,24	9,60
pK_3	(1,5)	2,75	1,97	3,71	5,11
pK_4	(0,7)	1,45	-	-	4,11

Konstanty stability komplexů $[Ln(III)DOTA]$ jsou vysoké, většinou v rozmezí $\log K = 20-25$. V případě fosfonátových/fosfinátových derivátů následují konstanty stability velmi dobře bazicitu makrocyklu a jejich hodnota je v korelaci se součtem $pK_1 + pK_2$ makrocyklu. Konstanty stability komplexů $Ln(III)$ tedy obvykle odpovídají pořadí $H_4DOTP^R < H_4DOTA < H_8DOTP$. Protonizační konstanty i konstanty stability komplexů odpovídají součtu účinků příspěvků pendantních ramen. Proto se protonizační konstanty makrocyklu i stabilita komplexu zvyšuje s počtem fosfonátových skupin a snižuje s počtem fosfinátových skupin. Vybrané příklady konstant stability jsou uvedeny v **Tab. 2**. Konstanty stability komplexů iontů $Cu(II)$ a $Zn(II)$ mají podobnou hodnotu jako komplexy iontů $Ln(III)$. V tomto případě je stabilizační energie ligandového pole kompenzována nižším koordinačním číslem iontů přechodných kovů. To je také důvod, proč nižší počet fosfonátových ramen vede k vyšší stabilitě komplexu $Cu(II) - H_4DO2P$ ($\log K = 28,7$), H_6DO3P ($\log K = 26,9$) a H_8DOTP ($\log K = 25,4$).¹⁰¹ Velikost kavity H_4DOTA vyhovuje velkým iontům kovů, a proto většina derivátů H_4DOTA vykazuje selektivitu pro $Ca(II)$ oproti $Mg(II)$. Fosfonátová/fosfinátová skupina je objemnější než karboxylátová, a proto deriváty fosfonátů/fosfinátů mají ještě větší preferenci pro velké ionty kovů než má H_4DOTA . Ve srovnání s karboxylátovými

deriváty tvoří fosfonátové deriváty stabilní protonizované komplexy s protonem umístěným na nekoordinovaném atomu kyslíku fosfonátu. Fosfonátové deriváty mohou také tvořit komplexy se stechiometrií L:M = 1:2.⁹⁵ Zde je jeden ion kovu koordinován v makrocyclické kavitě, zatímco druhý se váže na nekoordinované atomy kyslíků fosfonátů a karboxylátů.

Tab. 2 Konstanty stability $\log K_{ML}$ H₄DOTA a jejích fosfonátových/fosfinátových analogů

	H ₄ DOTA	H ₈ DOTP	H ₆ DO2A2P	H ₅ DO3AP	H ₄ DOTPEt	H ₄ DO3AP ^{ABn}
ref.	102, 103	104, 105	106	95	107	100
La(III)	22.9	27.6	23.3	25.5	-	22.4
Gd(III)	24.7	28.8	25.7	27.5	16.50	24.04
Lu(III)	25.4	29.6	26.4	28.6	-	24.0
Cu(II)	22.25	25.4	24.9	-	19.57	-
Zn(II)	21.10	24.8	22.5	-	15.80	-

KINETIKA FORMACE A DISOCIACE KOMPLEXŮ

Komplexace iontů lanthanoidů s ligandy odvozenými od H₄DOTA je dvoustupňový proces. Ligand okamžitě váže iont kovu pomocí pendantních ramen a tvoří *out-of-cage* komplex, kde aminové skupiny makrocycly stále zůstávají protonizované. Makrocycklus je poté deprotonizován a iont kovu je koordinován do kavity ligandu, čímž se vytvoří konečný *in-cage* komplex. Tento krok určuje rychlost reakce.

Inertnost komplexů odvozených od H₄DOTA je většinou studována jako odolnost vůči disociaci pomocí kyseliny. Zde je důležitým krokem protonizace atomů dusíku v makrocycly, po které následuje disociace komplexu.

Formační a disociační kinetika komplexů lanthanoidů byla studována pro různé fosfonátové i fosfinátové deriváty H₄DOTA.¹⁰⁸ Ve srovnání s H₄DOTA komplexy přítomnost fosfonátových skupin snižuje rychlost komplexace. Je to kvůli vyšší stabilitě *out-of-cage* meziproductů. Rychlost tvorby se zvyšuje v pořadí H₈DOTP < H₇DOA3P < H₆DO2A2P < H₅DO3AP < H₄DOTA. Rychlost disociace komplexů Gd(III) nebo Eu(III) se zvyšuje se zvyšujícím se počtem fosfonátů díky schopnosti fosfonátových skupin aktivně se podílet na přenosu protonů. Koordinovaná fosfonátová skupina může být i protonizována, čímž pomáhá při přenosu protonů z roztoku na atomy dusíku makrocycly. Nicméně u komplexů Ce(III) byl zaznamenán odlišný trend. U ligandů odvozených od H₄DOTA obsahujících jak fosfonáty, tak i karboxyláty se zvyšuje kinetická

inertnost komplexů Ce(III) se zvyšujícím se počtem fosfonátových skupin, což naznačuje odlišný mechanismus disociace komplexu.⁹⁴ Ukazuje se tak, že velikost iontů Ln(III) má vliv na vlastnosti jejich komplexů.

V případě fosfinátů výsledky ukazují, že tvorba komplexu je pomalejší a disociace jejich komplexů rychlejší než u H₄DOTA. Tyto závěry však nemusí být obecně platné, protože není k dispozici dostatek údajů. Výsledky každopádně ukazují důležitou roli další koordinační skupiny připojené k fosfinátové skupině na formační kinetiku.

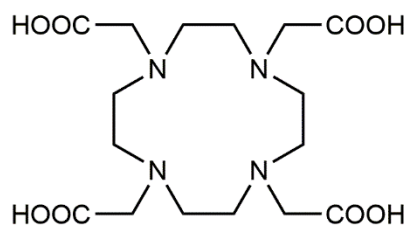
Kromě komplexů lanthanoidů byla určitá pozornost věnována také kinetickým vlastnostem komplexů Cu(II). Výsledky ukazují, že rychlost tvorby komplexů Cu(II) je vyšší pro fosfonátové deriváty než pro H₄DOTA.¹⁰⁹ Naopak rychlost tvorby komplexu s deriváty tetrafosfinátů je o dva řády nižší než u [Cu(II)DOTA].¹¹⁰ Porovnání kinetické stability komplexů [Cu(II)DOTP] a [Cu(II)DOTA] ukázalo, že disociace [Cu(II)DOTP] je rychlejší než [Cu(II)DOTA]. Poločas rozpadu komplexu v 5 M kyselině je 1,15 min pro [Cu(II)DOTP] a 28,1 hodiny pro [Cu(II)DOTA].¹¹¹ Podobné rozdíly byly také zjištěny u dalších tetrafosfinátových derivátů.¹¹² V případě ligandů obsahujících jak fosfonáty, tak i karboxyláty klesá kinetická inertnost se zvyšujícím se počtem fosfonátových skupin, ale rozdíly jsou mnohem menší.¹¹³

CÍL PRÁCE

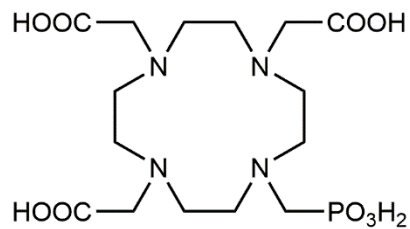
Práce se zaměřuje na studium kinetických vlastností ligandu H₄DOTA a jeho fosfonátových/fosfinátových derivátů a zkoumá možnosti ovlivnění mechanismu a rychlosti komplexace za různých podmínek.

Soubor studovaných látek je zobrazen na **Obr. 9**. Ligand H₄DOTA, který má na makrocyclickém kruhu navázány čtyři stejné acetátové skupiny, tvoří vysoce stabilní komplexy, avšak rychlost komplexace je poměrně nízká. Proto byly navrženy deriváty, ve kterých je jedna acetátová skupina nahrazena skupinou obsahující atom fosforu. Tyto deriváty lze dále rozdělit na ligandy obsahující pouze methylfosfinát/fosfonát (H₄DO3AP^H, H₅DO3AP^{OH}) a ligandy s druhým koordinačním centrem (H₆DO3AP^{IDA}, H₅DO3AP^{PIN}, H₄DO3AP^{AM}, H₈DO3AP^{BP} a H₇DOTAM^{BP}). Jedním z cílů práce bylo zhodnotit vliv různých substituentů na pendantním rameni a způsobu jejich navázání na makrocycklus (typ spaceru) na ovlivnění kinetiky komplexace

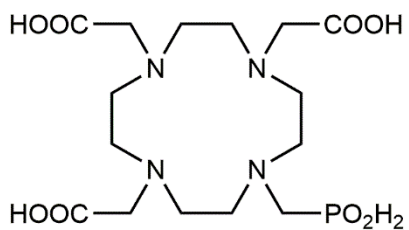
Při použití v medicíně hraje rychlost vzniku komplexu důležitou roli, obzvláště při přípravě radiokomplexů. V laboratorních podmínkách měření kinetik obvykle probíhá v nadbytku iontů kovu, což neodpovídá reálným podmínkám, kdy se radiokomplexy naopak připravují ve výrazném nadbytku ligandu. Ve snaze se co nejvíce přiblížit skutečným podmínkám byly provedeny experimenty nejen v nadbytku iontů kovu, ale i v nadbytku ligandu. Cílem bylo porovnat výsledky měření a navrhnout mechanismus vzniku komplexu včetně typů meziproductů vznikajících v průběhu komplexace.



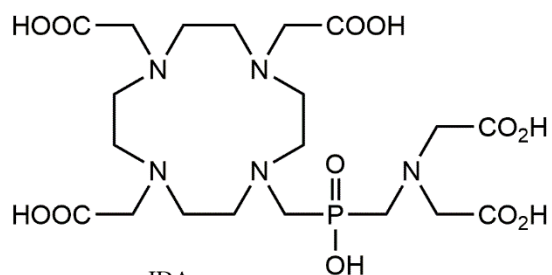
H₄DOTA



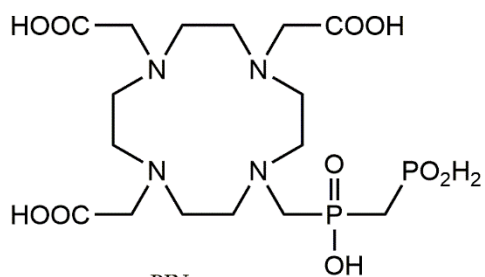
H₅DO3AP^{OH}



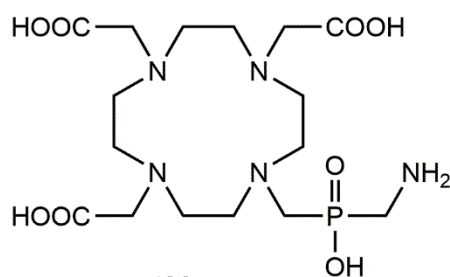
H₄DO3AP^H



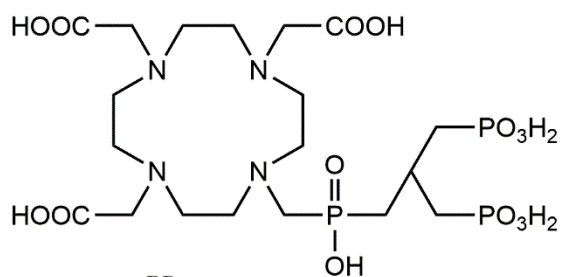
H₆DO3AP^{IDA}



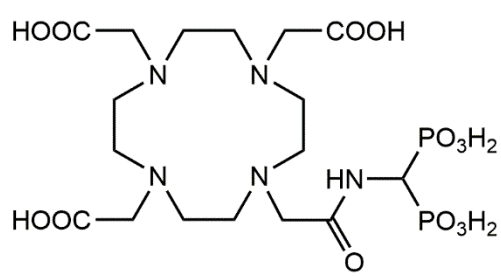
H₅DO3AP^{PIN}



H₄DO3AP^{AM}



H₈DO3AP^{BP}



H₇DOTAM^{BP}

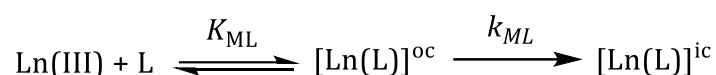
Obr. 9 Studované polyazamakrocykly

VÝSLEDKY A DISKUZE

Při použití v medicíně hraje rychlost vzniku komplexů důležitou roli. Do určité míry ji lze ovlivnit podmínkami komplexace (teplota, pH), ale ne vždy a dostatečně. Jako mnohem účinnější cesta k urychlení tvorby komplexů se jeví přímo vývoj nových ligandů s požadovanými vlastnostmi. V další části je popsáno chování ligandu H₄DOTA a několika dalších ligandů od něj odvozených během tvorby komplexů.

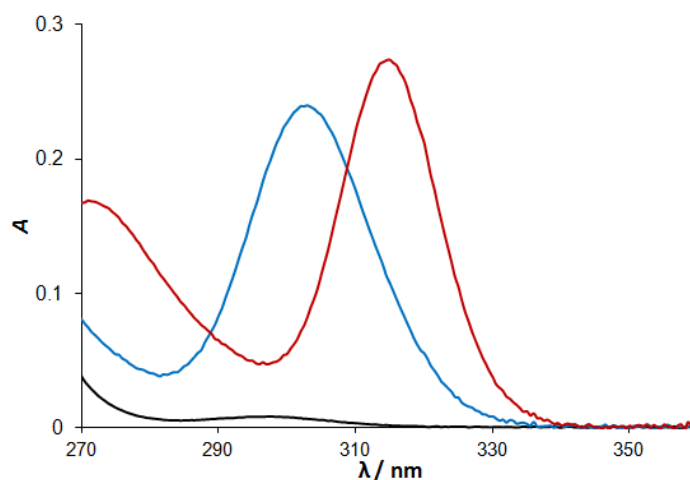
KINETIKA FORMACE KOMPLEXŮ

Komplexace iontů Ln(III) ligandem H₄DOTA a ligandy od něj odvozenými probíhá ve dvou krocích.



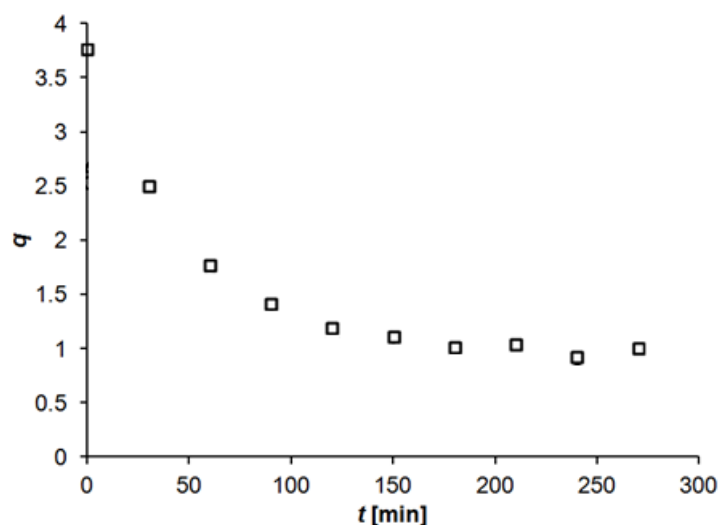
Nejprve se velmi rychle vytvoří *out-of-cage* komplex (značen horním indexem OC), který ve druhém kroku zvolna přechází v *in-cage* komplex (značen horním indexem IC), za deprotonizace dvou atomů dusíku makrocycly.

Pro sledování tvorby komplexů metodou UV-Vis spektroskopie byly použity ionty Eu(III) a Ce(III). Oba tyto ionty mají se zkoumanými ligandy výrazné absorpční pásy v blízké UV oblasti. Při použití iontu Ce(III), který je velmi citlivý na změny své koordinační sféry, je možno navíc rozlišit absorpční pásy spektra volného iontu, *out-of-cage* i *in-cage* komplexu (**Obr. 10**).



Obr. 10 Příklad absorpčního spektra: volný iont Ce(III) (černá), *out-of-cage* (modrá) a *in-cage* (červená) komplex Ce(III)-DO3AP^{PIV} ($c_M = c_L = 4,0 \cdot 10^{-4}$ M, 25 °C).

Iont Eu(III) má zase tu výhodu, že poskytuje i luminiscenční spektra, ze kterých lze určit počet koordinovaných molekul vod v komplexu a jeho změnu v čase (**Obr. 11**).



Obr. 11 Příklad závislosti počtu koordinovaných molekul vod na iontu Eu(III) v průběhu komplexace s H₄DOTA na čase (pH = 3,5, 25 °C).

Stabilita *out-of-cage* komplexu hraje důležitou roli pro rychlost vzniku *in-cage* komplexu, která je úměrná koncentraci *out-of-cage* komplexu. Koncentrace *out-of-cage* komplexu je určena termodynamickou rovnováhou (náboje jsou pro přehlednost vynechány):



Pro tuto rovnováhu lze podmíněnou konstantu stability K^{oc} definovat jako:

$$K^{\text{oc}} = \frac{[\text{OC}] \times [\text{H}]^n}{[\text{Ln}] \times [\text{L}]},$$

kde [OC] je koncentrace *out-of-cage* komplexu, [Ln] koncentrace volného iontu Ln(III) a [L] koncentrace volného ligandu.

Kinetická měření se za laboratorních podmínek obvykle provádí ve velkém nadbytku iontů kovu, aby se matematický popis reakcí dal zjednodušit na kinetiku prvního řádu. Naopak v praxi se při přípravě radiokomplexů používá ohromný nadbytek ligandu. Proto se nabízí otázka, zda se systémy chovají stejně v nadbytku iontů kovu i v nadbytku ligandu. Obecně se totiž předpokládá vznik pouze jednoho typu *out-of-cage* komplexu. Naše studie ukázala, že u studovaných ligandů se za různých podmínek může tvořit několik typů *out-of-cage* komplexů s rozdílnou stechiometrií v závislosti na poměrech koncentrací ligandů a iontů kovu a na druhu pendantního ramene navázaného na makrocyclus (**Schéma 1**).

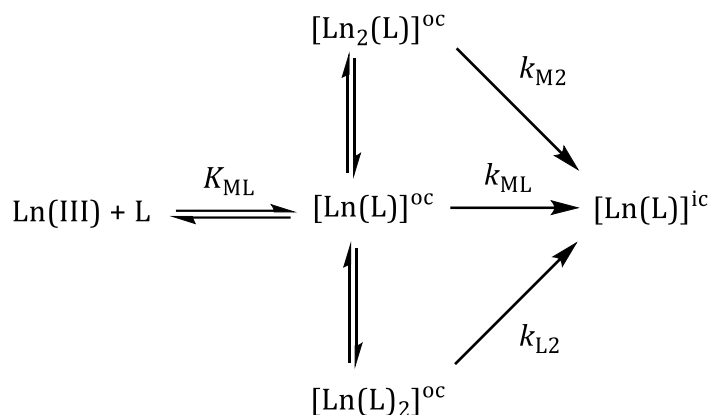
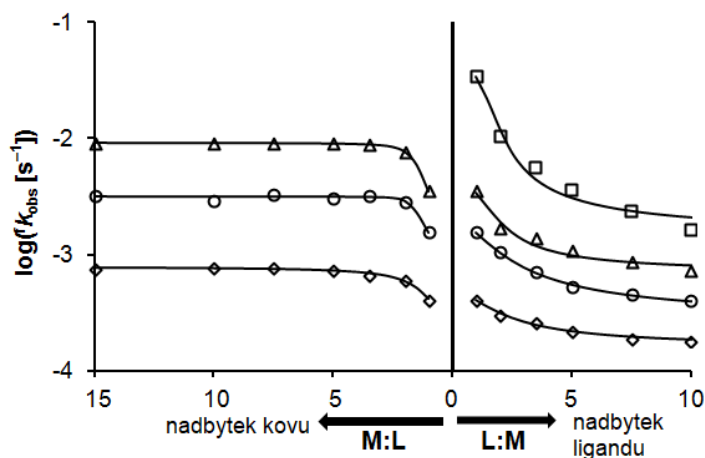


Schéma 1 Předpokládaný mechanismus komplexace Ln(III)–L systému v závislosti na podmínkách

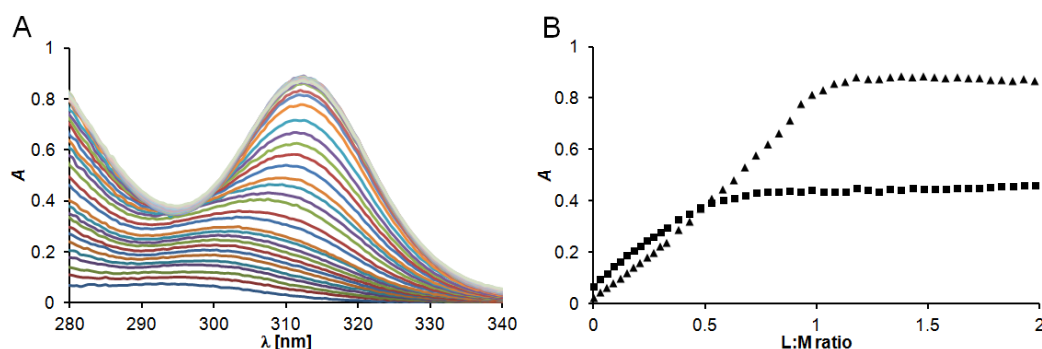
Proto bylo porovnáno chování systémů při poměrech kov:ligand 1:1 (ekvimolární poměr), 10:1 (nadbytek kovu) a 1:10 (nadbytek ligandu). Nejmarkantnější rozdíl v chování v nadbytku iontů kovu oproti nadbytku ligandu byl pozorován u ligandu $\text{H}_6\text{DO3AP}^{\text{IDA}}$. Tento ligand má dvě jasně definovaná silně komplexující koordináční centra – makrocyclus a IDA–fosfinát. Na **Obr. 12** je jasně vidět zpomalení tvorby komplexu v nadbytku ligandu.



Obr. 12 Graf formace komplexu Ce(III)– $\text{H}_6\text{DO3AP}^{\text{IDA}}$ v nadbytku Ce(III) (levá část grafu, $\alpha_e = 5 \cdot 10^{-4}$ M) a v nadbytku ligandu (pravá část grafu, $\alpha_e = 5 \cdot 10^{-4}$ M) při 25 °C. pH bylo 5,9 (diamanty) 6,5 (kolečka), 7,0 (trojúhelníky) a 8,0 (čtverce).

Pro nadbytek ligandu i pro nadbytek kovu vykazují získané závislosti saturační tvar. Vzájemná odlišnost tvaru je důsledkem přítomnosti jiných reakčních meziproductů. Jak již bylo zmíněno výše, IDA skupina je silně komplexující, a proto je částice $[\text{ML}]^{\text{oc}}$ kvantitativně vytvořena již v ekvimolární směsi (ve sledovaném rozmezí pH). Saturační tvar křivky v nadbytku kovu ukazuje na tvorbu částice $[\text{M}_2\text{L}]^{\text{oc}}$. Kdežto

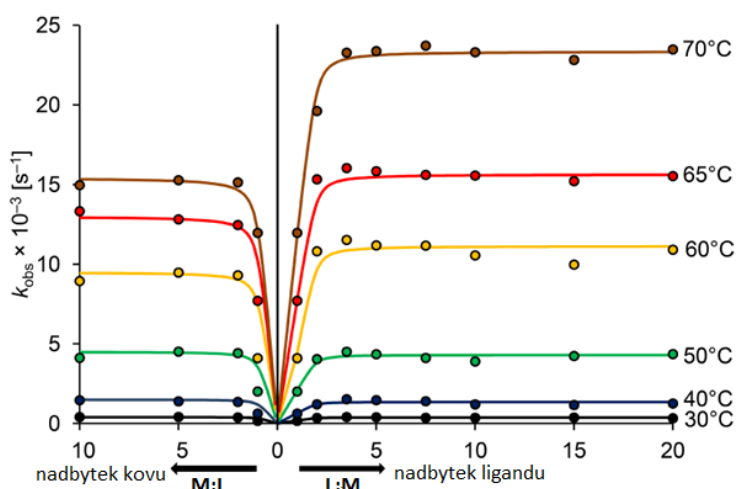
v nadbytku ligandu je reakce zpomalována na limitní hodnotu pravděpodobně tvorbou částice $[ML_2]^{oc}$, kde je iont kovu koordinován dvěma IDA skupinami různých ligandů, což výrazně znesnadňuje přechod iontu kovu do makrocyclické kavity a vzniku *in-cage* komplexu. Přítomnost různých reakčních intermediátů byla podpořena rovněž UV-Vis spektry komplexu Ce(III)–H₆DO3AP^{IDA} získanými ihned po smíchání při pH 4 a 8. Při pH 4 za konstantní koncentrace iontů Ce(III) je dosaženo prvního absorpčního maxima (300 nm) při poměru kov:ligand ~2:1 (komplex $[M_2L]^{oc}$). Během dalšího přidávání ligandu absorbance dále stoupá a absorpční maximum se posouvá k 314 nm a dosahuje maxima při poměru ~1:1, kdy je kvantitativně vytvořen komplex $[ML]^{oc}$ (Obr. 13). Při pH 8 se tvar spekter mění ještě nápadněji. Absorbance při 314 nm nejprve stoupá a dosahuje maxima při poměru kov:ligand ~1:1 (komplex $[ML]^{oc}$). Během dalšího přidávání ligandu začíná klesat absorbance při 314 nm a objevuje se nový narůstající pás s maximem při 291 nm (komplex $[ML_2]^{oc}$). Komplex $[ML]^{oc}$ je tvořen smíšenou koordinací IDA skupiny (má vysokou komplexační schopnost) a karboxylátů na ostatních pendantních ramenech makrocycly. V komplex $[M_2L]^{oc}$ je jeden iont kovu koordinován IDA skupinou a druhý karboxyláty makrocycly. Naproti tomu v komplexu $[ML_2]^{oc}$ je pravděpodobně iont kovu koordinován dvěma IDA skupinami dvou molekul ligandu.



Obr. 13 UV-Vis spektra *out-of-cage* komplexu Ce(III)-DO3AP^{IDA} (A) a odpovídající závislost absorbance při 300 nm (čtverce) a 312 nm (trojúhelníky) na poměru kov:ligand (B) při pH 4 ($c_M = 2,5 \cdot 10^{-3}$ M, $c_L = 0-5 \cdot 10^{-3}$ M).

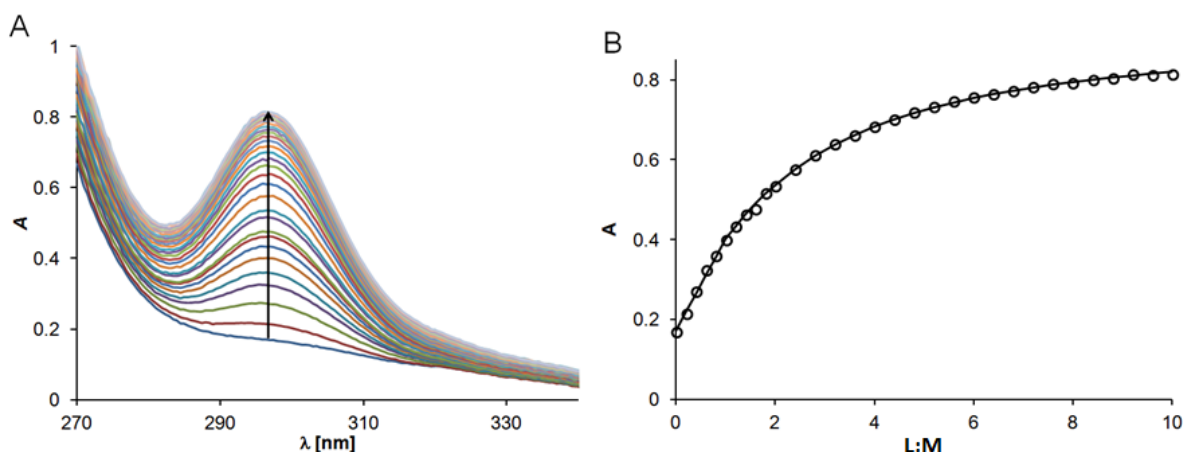
I systém Ln(III)–H₄DOTA se choval odlišně v nadbytku iontů kovu a v nadbytku ligandu. Obr. 14 zobrazuje průběh formační kinetiky systému Eu(III)–H₄DOTA v závislosti na koncentraci a teplotě. Křivky mají podobný tvar jak v nadbytku kovu, tak v nadbytku ligandu. Při nízkých teplotách je rychlost komplexace srovnatelná. Se zvyšující se teplotou však vzrůstá rozdíl mezi rychlostmi komplexace – v nadbytku ligandu se komplex tvoří značně rychleji než v nadbytku iontů kovu. Všechny získané

křivky téměř okamžitě dosahují plata. To naznačuje, že hodnoty termodynamických konstant stability *out-of-cage* komplexů (K^*_1 a K^*_2) jsou vysoké ($\log K^*_1 > 6$ a $\log K^*_2 \sim 3$) a komplex $[\text{EuL}_2]^{oc}$ je plně tvořen již při poměru ligand:kov 5:1.



Obr. 14 Závislost rychlosti tvorby komplexu Eu(III)-DOTA v nadbytku ligandu (vpravo, $c_{\text{Eu}} = 2,5 \cdot 10^{-3} \text{ M}$) a v nadbytku kovu (vlevo, $c_{\text{L}} = 2,5 \cdot 10^{-3} \text{ M}$) při pH = 3,5 pro různé teploty. Pro větší názornost jsou body proloženy křivkami.

Pro další potvrzení těchto výsledků byla měřena UV-Vis spektra systému Ce(III)-H₄DOTA ihned po smíchání komponent (**Obr. 15**). Fitováním dat byly získány o něco nižší hodnoty konstant stability *out-of-cage* komplexů ($\log K^*_1 \sim 6$ a $\log K^*_2 \sim 2-3$) než pro systém Eu(III)-H₄DOTA. To odpovídá obecnému trendu stability komplexů v lanthanoidové řadě.



Obr. 15 UV-VIS spektra *out-of-cage* komplexu Ce(III)-H₄DOTA *out-of* (A) a odpovídající závislost absorbance při 297 nm na poměru kov:ligand (B) při pH 3 ($c_{\text{M}} = 2,5 \cdot 10^{-3} \text{ M}$, $c_{\text{L}} = 0-25 \cdot 10^{-3} \text{ M}$).

Navržený komplexační mechanismus zahrnuje více meziproduktů. V nadbytku ligandu pravděpodobně vzniká kromě komplexu $[ML]^{oc}$ ještě i částice $[ML_2]^{oc}$ (Schéma 2).

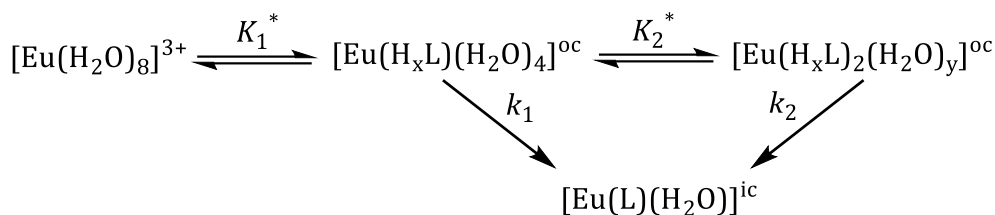
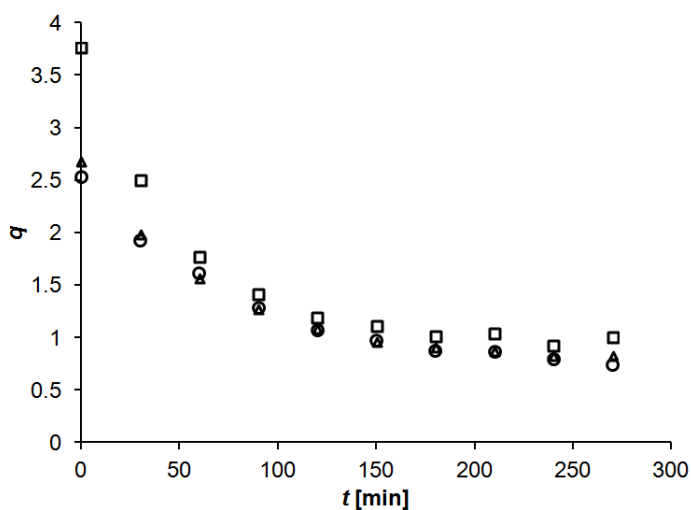


Schéma 2 Mechanismus komplexace Eu(III)–H₄DOTA systému

Pro další potvrzení vzniku částice $[ML_2]^{oc}$ byla využita metoda časově rozlišené molekulové luminiscenční spektroskopie („life-time“ měření). Ion Eu(III) je pro použití v luminiscenční spektroskopii velmi vhodný díky svému nedegenerovanému emisnímu stavu ⁵D₀. Zhášení luminiscence Eu(III) vysokoenergetickými O–H vibracemi dovoluje určit počet molekul vody (q) vázaných ve vnitřní sféře komplexu. K výpočtu byla použita rovnice:¹¹⁴

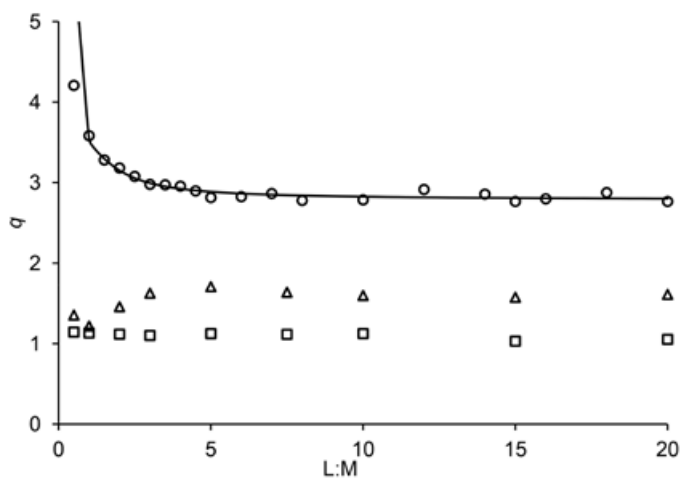
$$q = 1,05 \cdot \tau_H^{-1} - 0,44$$

, kde τ_H je rychlost vyhasínání luminiscence roztoku vzorku v H₂O. *Out-of-cage* komplex systému Eu(III)–H₄DOTA vzniklého ihned po smíchání obsahuje ~4 molekuly vody.¹¹⁵ Tento intermediát se zvolna přeměňuje na *in-cage* komplex a počet molekul vody klesá na jednu. Avšak při použití nadbytku ligandu je hydratační číslo *out-of-cage* komplexu hned od počátku nižší (Obr. 16).



Obr. 16 Závislosti počtu koordinovaných molekul vod (q) na iontu Eu(III) v průběhu komplexace s H₄DOTA na čase (pH = 3,5, 25 °C), $\alpha_{Eu} = 2,5 \cdot 10^{-3}$ M, $\alpha_L = 2,5 \cdot 10^{-3}$ M (čtverce), $\alpha_L = 2,5 \cdot 10^{-2}$ M (kolečka), $\alpha_L = 5 \cdot 10^{-2}$ M (trojúhelníky).

Proto byl podrobněji zkoumán počet molekul vody *out-of-cage* komplexu v závislosti na poměru ligand:kov (Obr. 17).



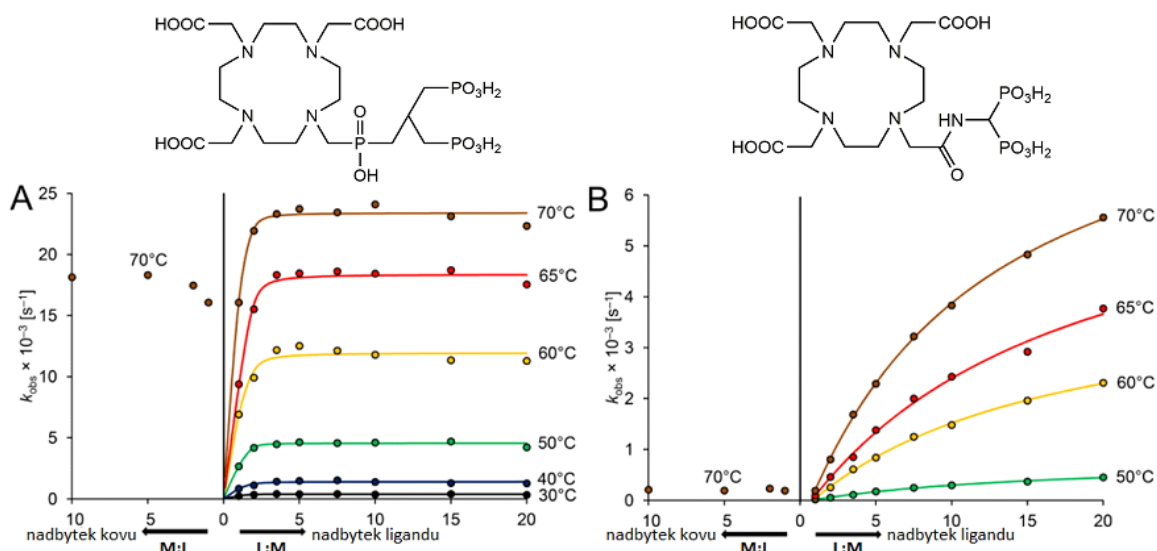
Obr. 17 Závislosti počtu koordinovaných molekul vod (q) na iontu Eu(III) *out-of-cage* komplexů (měřeno okamžitě po smíchání) pro různé poměry ligand:kov (25 °C, $c_{\text{Eu}} = 2,5 \cdot 10^{-3}$ M); H₄DOTA (kolečka, pH = 3,5), H₇DO3AP^{BP} (trojúhelníky, pH = 3,5), H₇DOTAM^{BP} (čtverečkys, pH = 4,0). Křivka odpovídá nejlepšímu fitu systému Eu(III)–H₄DOTA podle rovnice $q = (q_{\text{Eu}} \cdot [\text{Eu}(\text{H}_2\text{O})_8] + q_{\text{ML}} \cdot [\text{EuL}]^{\text{oc}} + q_{\text{ML}_2} \cdot [\text{EuL}_2]^{\text{oc}}) / [\text{Eu}]_{\text{tot}}$

Výsledky odpovídají výše navrženému mechanismu. V ekvimolární směsi se tvoří komplex $[\text{ML}]^{\text{oc}}$ s ~ 4 koordinovanými molekulami vody. Komplex $[\text{ML}_2]^{\text{oc}}$ s hydratačním číslem < 3 se objevuje v nadbytku ligandu. Efektivní hydratační číslo je vyjádřeno jako:

$$q = (q_{\text{Eu}} \cdot [\text{Eu}(\text{H}_2\text{O})_8] + q_{\text{ML}} \cdot [\text{EuL}]^{\text{oc}} + q_{\text{ML}_2} \cdot [\text{EuL}_2]^{\text{oc}}) / [\text{Eu}]_{\text{tot}}$$

, kde q_{Eu} je hydratační číslo volného aquaiontu Eu(III), q_{ML} a q_{ML_2} jsou hydratační čísla komplexů $[\text{EuL}]^{\text{oc}}$, resp. $[\text{EuL}_2]^{\text{oc}}$ a $[\text{Eu}]_{\text{tot}}$ je celková koncentrace iontů Eu(III). Když vezmeme v úvahu termodynamickou rovnováhu částic Eu(III) a do předešlé rovnice dosadíme do za $q_{\text{Eu}} = 8$ a $q_{\text{ML}} = 4$ (lit.¹¹⁵), dostaneme proložením experimentálních dat $q_{\text{ML}_2} = 2,8 \pm 0,1$.

Zajímavé chování ukázaly také oba bis(fosfonátové) ligandy H₆DO3AP^{BP} a H₇DOTAM^{BP} (Obr. 18). U obou ligandů byl zkoumán především vliv nadbytku ligandu, protože ten více odpovídá radiochemickým podmínkám při značení ligandu radioizotopy lanthanoidů. Navíc bis(fosfonáty) tvoří v nadbytku iontů kovu špatně definované polynukleární komplexy až oligomery,⁸² a proto by hodnocení výsledků experimentů bylo krajně obtížné. Experiment v nadbytku iontů kovu (sloužící jen k porovnání) ukázal za stejné teploty nižší rychlost tvorby komplexů oproti nadbytku ligandu.



Obr. 18 Grafy formace komplexu Eu(III)-DO3AP^{BP} (A, pH 3,5) a Eu(III)-DOTAM^{BP} (B, pH 4) v nadbytku ligandu (pravá část, $c_{Eu} = 2,5 \cdot 10^{-3}$ M) nebo kovu (levá část, $c_L = 2,5 \cdot 10^{-3}$ M).

Ukázalo se, že na tvorbu *out-of-cage* komplexů má vliv nejen koordinační skupina na pendantním rameni, ale i způsob jejího navázání na makrocyklus. Zatímco ligand H₆DO3AP^{BP}, ve kterém je bis(fosfonátová) skupina připojena přes fosfinát, se choval podobně jako H₄DOTA, tvorba komplexů s ligandem H₇DOTAM^{BP}, který má bis(fosfonátovou) skupinu navázanou na amid, vykazovala jiný typ závislosti.

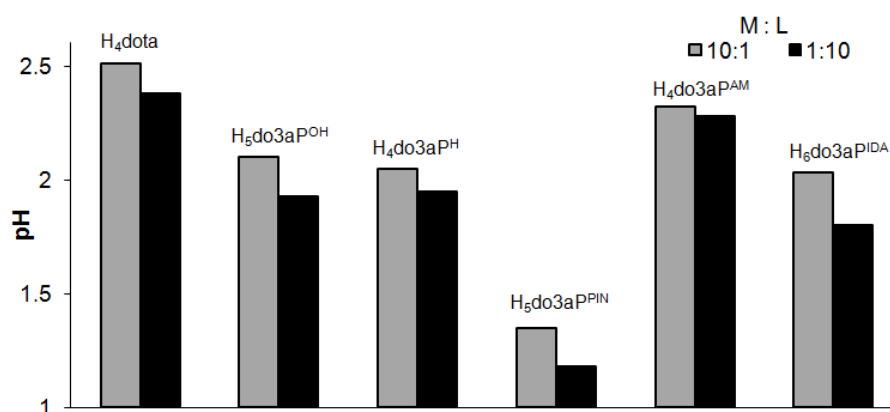
Tvorba komplexu Eu(III) s ligandem H₇DOTAM^{BP} probíhá o poznání pomaleji ve srovnání s H₄DOTA i H₆DO3AP^{BP}. I při 70 °C se komplex tvořil extrémně pomalu díky tvorbě vysoce stabilního intermediátu [ML]^{oc}. V nadbytku ligandu se křivky liší od ostatních – neobjevuje se plato, ale rychlost komplexace se zvyšuje s nadbytkem ligandu. To naznačuje jen slabou koordinaci druhé molekuly ligandu a tvorbu málo stabilního intermediátu [ML₂]^{oc}.

Co se týče hydratačních čísel, oba bis(fosfonáty) jsou na tom podobně (a výrazně se liší proti H₄DOTA). Ihned po smíchání iontů Eu(III) s ligandy H₈DO3AP^{BP} a H₇DOTAM^{BP} jsou koordinovány méně než dvě molekuly vody a počáteční hydratační číslo zůstává téměř nezměněno po celou dobu přeměny *out-of-cage* komplexu na *in-cage*. Podobně i závislost hydratačního čísla *out-of-cage* komplexu na nadbytku ligandu je téměř konstantní v celém sledovaném rozmezí a $q = 1-2$ (**Obr. 17**). Jemný nárůst hodnot hydratačního čísla v systému Eu(III)-DO3AP^{BP} může být přičten molekulám vody interagujícími s bis(fosfonátovými) skupinami pomocí vodíkových vazeb (druhá sféra), které také přispívají ke zhášení luminiscence.^{60, 116}

STABILITA *OUT-OF-CAGE* KOMPLEXŮ

Z předešlých experimentů je patrné, že *out-of-cage* komplexy hrají během komplexace větší roli, než se předpokládalo. Proto byly dále podrobněji studovány.

Aby bylo možné porovnat stabilitu *out-of-cage* komplexů všech studovaných ligandů, byla jako referenční vybrána hodnota pH, která odpovídá 50% zastoupení *out-of-cage* komplexu. (Obr. 19). Měření probíhala v silně kyselých podmínkách ($\text{pH} \approx 0-3$), protože při vyšších hodnotách pH docházelo k příliš rychlému přechodu na *in-cage* komplex. Obecně platí, že čím je vyšší pH, kdy je dosaženo 50% zastoupení *out-of-cage* komplexů, tím jsou *out-of-cage* komplexy méně stabilní.



Obr. 19 Podmíněné stability *out-of-cage* komplexů s ionty Ce(III). Sloupce ukazují pH, kdy bylo dosaženo formace 50% *out-of-cage* komplexu při 25 °C (koncentrace v nadbytku kovu: $\alpha_{\text{Ce}} = 4,0 \cdot 10^{-3}$ M, $\alpha_{\text{L}} = 4,0 \cdot 10^{-4}$ M; koncentrace v nadbytku ligandu: $\alpha_{\text{Ce}} = 4,0 \cdot 10^{-4}$ M, $\alpha_{\text{L}} = 4,0 \cdot 10^{-3}$ M).

Nejnižší stabilitu *out-of-cage* komplexu ukázal ligand H₄DOTA, za kterým následoval H₄DO3AP^{AM}. Stabilita komplexů H₅DO3AP^{OH}, H₄DO3AP^H a H₆DO3AP^{IDA} byla podobná s tvorbou okolo pH 2. Stabilita komplexu H₆DO3AP^{IDA} mírně vzrůstá v nadbytku ligandu nejspíše kvůli tvorbě komplexu s jinou stechiometrií (pravděpodobně ML₂).

Všechny fosfinátové i fosfonátové ligandy ukázaly vyšší stabilitu než H₄DOTA díky nižšímu $\text{p}K_{\text{a}}$ fosfinátových či fosfonátových skupin ve srovnání s karboxyláty. Srovnatelnou stabilitu komplexů H₅DO3AP^{OH} a H₄DO3AP^H lze vysvětlit protonizací fosfonátové skupiny do prvního stupně ve sledovaném rozmezí pH. Pozitivní náboj protonizované amino skupiny u komplexu H₄DO3AP^{AM} pravděpodobně snižuje stabilitu *out-of-cage* komplexu. U ligandu H₆DO3AP^{IDA} je negativní vliv protonizované amino skupiny kompenzován dvěma negativně nabitými karboxyláty. Proto je stabilita jeho

out-of-cage komplexu srovnatelná s $\text{H}_5\text{DO}_3\text{AP}^{\text{OH}}$ i $\text{H}_4\text{DO}_3\text{AP}^{\text{H}}$. Nejvyšší stabilita *out-of-cage* komplexu $\text{H}_5\text{DO}_3\text{AP}^{\text{PIN}}$ je způsobena vyšší aciditou a dobrými chelatačními vlastnostmi geminální bis(fosfinátové) skupiny, která tvoří stabilní šestičlenný chelatační kruh.

TVORBA *IN-CAGE* KOMPLEXŮ

Out-of-cage komplex vzniká kvantitativně a téměř okamžitě ať už v nadbytku kovu, nebo v nadbytku ligandu a jeho přeměna na *in-cage* komplex pak probíhá podle kinetiky prvního řádu. Krok určující rychlost komplexace je deprotonizace atomů dusíku v makrocyclu *out-of-cage* komplexu a přesunu iontu Ln(III) do makrocyclické kavity. Tento krok závisí na koncentraci hydroxidových aniontů a rychlostní konstanta k_{obs} je vyjádřena rovnicí:

$$k_{\text{obs}} = k_0 + k_1 \cdot [\text{OH}^-] + k_2 \cdot [\text{OH}^-]^2$$

, kde k_0 je rychlostní konstanta nezávislá na koncentraci $[\text{OH}^-]$ a konstanty k_1 a k_2 určují závislost rychlosti přeměny *out-of-cage* komplexu na finální *in-cage* komplex na $[\text{OH}^-]$. Ne u všech komplexů musí být zastoupeny všechny konstanty k_0 , k_1 i k_2 .

Tvorba *in-cage* komplexu byla detailně studována u ligandu H_4DOTA . V systému Eu(III)– H_4DOTA v nadbytku kovu i nadbytku ligandu byl pozorován lineární nárůst hodnoty k_{obs} v závislosti na koncentraci $[\text{OH}^-]$ iontů. Za laboratorní teploty, v celé sledované škále pH (3,5 – 7,5), vzniká komplex mírně rychleji v nadbytku kovu než v nadbytku ligandu. Hodnota k_1 je pro oba systémy téměř stejná. Rozdíl v rychlosti vzniku komplexu je dán odlišnou velikostí k_0 – v nadbytku ligandu je její hodnota téměř zanedbatelná, kdežto pro nadbytek kovu již nabývá významné hodnoty. V průběhu reakce se proton přemístí z meziprojektu na hydroxidový aniont. Jiná možnost je, že proton zachytí jiná Brønstedova báze (např. pufr), což vyústí v nenulovou hodnotu k_0 .

Systém Ce(III)– H_4DOTA se choval obdobně. U všech komplexů bylo pozorováno zvýšení rychlosti formace se vzrůstajícím pH. I zde byla pozorována mírně rychlejší komplexace v nadbytku ligandu. Velmi nízké hodnoty k_0 ukazují na minimální příspěvek $[\text{OH}^-]$ nezávislého reakčního mechanismu. Výsledky jsou shrnuty v **Tab 3**.

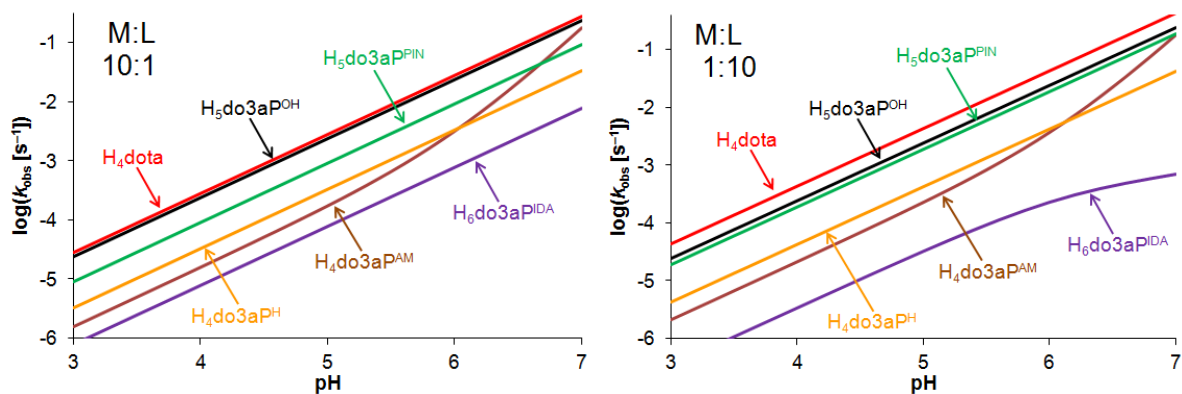
Tab. 3 Rychlostní konstanty tvorby Eu(III) a Ce(III) komplexů s ligandem H₄DOTA.

	Nadbytek kovu (10 ekv.)		Nadbytek ligandu (10 ekv.)	
	k_0 [s ⁻¹]	k_1 [s ⁻¹ mol ⁻¹ dm ³]	k_0 [s ⁻¹]	k_1 [s ⁻¹ mol ⁻¹ dm ³]
Eu-H ₄ DOTA	$2,3 \pm 0,3 \cdot 10^{-2}$	$1,97 \pm 0,03 \cdot 10^7$	$7 \pm 9 \cdot 10^{-4}$	$1,90 \pm 0,03 \cdot 10^7$
Ce-H ₄ DOTA	–	$2,8 \pm 0,2 \cdot 10^6$	–	$4,3 \pm 0,7 \cdot 10^6$

Pro další experimenty porovnávající rychlost vzniku *in-cage* komplexů ligandů odvozených od H₄DOTA s fosfonátovým/fosfinátovým pendantním ramenem byl vybrán iont Ce(III). Jeho absorpční pásy umožňují sledovat přeměnu *out-of-cage* komplexu vznikajícího ihned po smísení ligandu a iontu kovu na finální *in-cage* komplex. Hodnoty k_0 byly opět zanedbatelné. Získané konstanty všech ligandů shrnuje **Tab. 4** a fity **Obr. 20**. Kromě systému Ce(III)–H₄DO3AP^{AM}, všechny závislosti $\log k_{\text{obs}}$ na pH byly lineární, a tudíž konstanta k_1 zde má zcela dominantní příspěvek. V případě Ce(III)–H₄DO3AP^{AM} nelineární průběh ukazuje i na významný příspěvek konstanty k_2 , který je nejspíše spojen s protonizací amino skupiny na pendantním rameni. Hodnocení systému Ce(III)–H₆DO3AP^{IDA} bylo komplikováno protonizací skupin na pendantním rameni a vytvořením stabilních *out-of-cage* komplexů s různou stechiometrií.

Tab. 4 Rychlostní konstanty tvorby *in-cage* Ce(III) komplexů se studovanými ligandy v nadbytku iontů kovu ($c_{\text{Ce}} = 10^{-3}$ M, $c_{\text{L}} = 10^{-4}$ M) a v nadbytku ligandu ($c_{\text{Ce}} = 10^{-3}$ M, $c_{\text{L}} = 10^{-4}$ M) při teplotě 25 °C.

	Nadbytek iontů kovu		Nadbytek ligandu	
	$k_1 \times 10^5$ [s ⁻¹ mol ⁻¹ dm ³]	$k_2 \times 10^{12}$ [s ⁻¹ mol ⁻² dm ⁶]	$k_1 \times 10^5$ [s ⁻¹ mol ⁻¹ dm ³]	$k_2 \times 10^{12}$ [s ⁻¹ mol ⁻² dm ⁶]
H ₄ DOTA	28 ± 2 35^{117}	–	43 ± 7	–
H ₅ DO3AP ^{OH}	$24,1 \pm 0,3$; $9,56^{95}$	–	$24,5 \pm 0,7$	–
H ₄ DO3AP ^H	$3,3 \pm 0,5$	–	$4,29 \pm 0,04$	–
H ₅ DO3AP ^{PIN}	$9,2 \pm 0,2$	–	$18,8 \pm 0,1$	–
H ₄ DO3AP ^{AM}	$1,6 \pm 0,2$	16 ± 2	$2,1 \pm 0,6$	16 ± 2
H ₆ DO3AP ^{IDA}	0,86	–	0,019 ^c	–



Obr. 20 Graf vypočtené rychlostní konstanty tvorby *in-cage* Ce(III) komplexů v závislosti na pH při 25 °C v nadbytku kovu ($\alpha_{\text{Ce}} = 10^{-3}$ M, $\alpha_{\text{L}} = 10^{-4}$ M) a v nadbytku ligandu ($\alpha_{\text{Ce}} = 10^{-3}$ M, $\alpha_{\text{L}} = 10^{-4}$ M).

Většina studovaných ligandů ukázala podobný pH profil rychlosti komplexace jak v nadbytku ligandu, tak i v nadbytku kovu. U H_4DOTA byla pozorována mírně rychlejší komplexace v nadbytku ligandu. To odpovídá i předešlým výsledkům z měření rychlosti formace Eu(III) komplexů. Větší rozdíl rychlostí komplexace byl pozorován u ligandu $\text{H}_5\text{DO3AP}^{\text{PIN}}$. Ten může být vysvětlen tvorbou několika typů *out-of-cage* komplexů v závislosti na poměrech koncentrací ligandu a kovu. Oproti tomu u ligandu $\text{H}_6\text{DO3AP}^{\text{IDA}}$ dochází v nadbytku ligandu ke zpomalení komplexace kvůli tvorbě velmi stabilního *out-of-cage* komplexu $[\text{ML}_2]$ koordinací iminodiacetátových skupin pendantních ramen dvou různých molekul ligandu.

Nejrychleji docházelo k tvorbě komplexu s ligandem H_4DOTA , nepatrně pomaleji s $\text{H}_5\text{DO3AP}^{\text{OH}}$ a $\text{H}_5\text{DO3AP}^{\text{PIN}}$. Tyto dva ligandy obsahují snadno protonizovatelná pendantní ramena, která mohou sloužit jako akceptor protonu při deprotonaci aminoskupin makrocyklu v rychlost určujícím kroku komplexace. Fosfinátové skupiny tuto schopnost nemají. Proto není přenos protonu u ligandu $\text{H}_4\text{DO3AP}^{\text{H}}$ podporován a vznik komplexu je výrazně pomalejší. Amino skupina na pendantním rameni $\text{H}_4\text{DO3AP}^{\text{AM}}$ je v kyselém prostředí protonizována; v neutrálním nebo zásaditém pH je pak deprotonizována, a tudíž se může podílet na přenosu protonu. Tím pádem u ligandu $\text{H}_4\text{DO3AP}^{\text{AM}}$ při $\text{pH} > 6$ dochází k výraznému nárůstu rychlosti komplexace ve srovnání s ostatními sledovanými ligandy. Nejpomaleji vzniká *in-cage* komplex s ligandem $\text{H}_6\text{DO3AP}^{\text{IDA}}$ kvůli přítomnosti silně komplexující skupiny v pendantním rameni. Ligand $\text{H}_6\text{DO3AP}^{\text{IDA}}$ obsahuje dvě koordinační centra – makrocyklus a IDA skupinu připojenou k cyklu přes methylfosfinát. Druhé koordinační místo (IDA skupina) je schopné vázat

iont kovu z roztoku, čímž by měla být urychlena tvorba *out-of-cage* komplexu. Nicméně se ukázalo, že vzniklý *out-of-cage* komplex je natolik stabilní, že vznik finálního *in-cage* komplexu je naopak výrazně zpomalen. To ukazuje, že použití příliš silně komplexující skupiny na pendantním rameni při vývoji ligandů pro radiomedicínu není vhodná strategie.

Překvapivě však srovnání neukázalo žádnou závislost rychlosti komplexace na bazicitě ligandu nebo na podmíněných konstantách stability *out-of-cage* komplexů.

KOMPLEXACE ZA RADIOCHEMICKÝCH PODMÍNEK

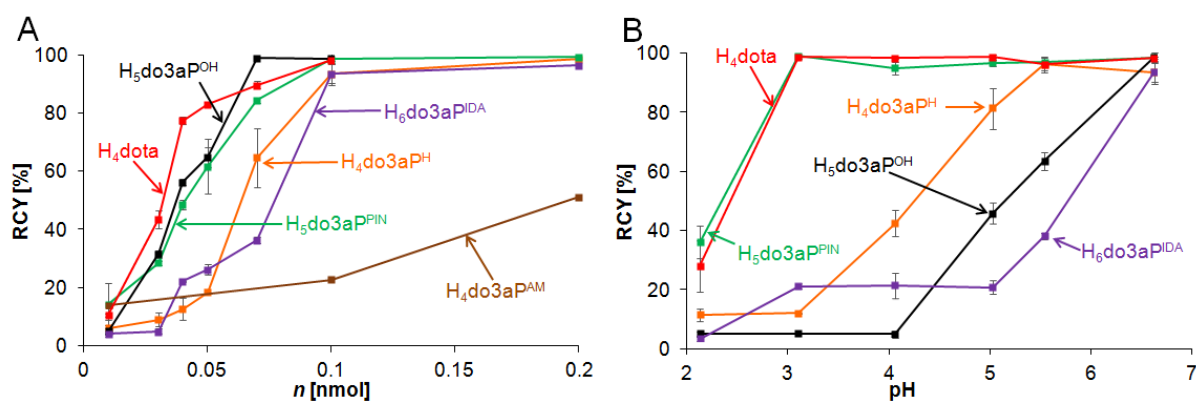
Podmínky vzniku značených komplexů používaných v radiomedicině se podstatně liší od syntézy komplexů s ionty stabilních kovů. Trendy a závislosti získané při „chemických“ podmínkách bývají špatně přenositelné do „radiochemických“ podmínek. Koncentrace reaktantů při radiokomplexaci je o několik řádů nižší. Reakční roztok je tedy velmi zředěný, a tudíž obtížněji dochází k interakci molekul. Dále při komplexačních procesech v takovýchto koncentracích již hrají roli například i nečistoty (hlavně ionty jiných kovů) z roztoku radionuklidu.

Zkoumané komplexy byly značeny iontem $^{177}\text{Lu}(\text{III})$. Byl studován vliv koncentrace a pH na radiochemický výtěžek komplexů (**Obr. 21**). V závislosti na koncentraci bylo potřeba nejmenšího molárního množství ligandu pro kvantitativní značení (při pH 6,6 po dobu 30 min při 95 °C) u ligandů H_4DOTA , $\text{H}_5\text{DOA3P}^{\text{OH}}$ a $\text{H}_5\text{DO3AP}^{\text{PIN}}$. Nepatrně více pak bylo potřeba pro ligandy $\text{H}_4\text{DO3AP}^{\text{H}}$ a $\text{H}_6\text{DO3AP}^{\text{IDA}}$. Ligand $\text{H}_4\text{DO3AP}^{\text{AM}}$ vykazoval o poznání horší vlastnosti, kdy i při použití dvojnásobné koncentrace ve srovnání s ostatními ligandy došlo k označení méně než z 50 %.

Větší rozdíly mezi jednotlivými ligandy byly pozorovány při sledování závislosti značení na pH. Podobně se chovaly ligandy H_4DOTA a $\text{H}_5\text{DO3AP}^{\text{PIN}}$ – oba ukázaly kvantitativní značení při pH ≈ 3 . Ostatní ligandy potřebovaly výrazně vyšší hodnotu pH – $\text{H}_4\text{DO3AP}^{\text{H}}$ pH $\approx 5,5$, $\text{H}_5\text{DOA3P}^{\text{OH}}$ a $\text{H}_6\text{DO3AP}^{\text{IDA}}$ pH $\approx 6,5$. Ligand $\text{H}_4\text{DO3AP}^{\text{AM}}$, který nevykázal kvantitativní značení ani při pH 6,6, nebyl pro nižší pH vůbec sledován.

Nejlepší „značící vlastnosti“ mezi všemi fosfonátovými/fosfinátovými deriváty při nízkém pH ukázal ligand $\text{H}_5\text{DO3AP}^{\text{PIN}}$. Tyto výsledky jsou ve shodě s výše uvedenými hodnotami stabilit *out-of-cage* komplexů. Na druhou stranu radiochemický výtěžek nevykázal jasnou korelaci ani s bazicitou ligandu a ani s rychlostí tvorby *in-cage* komplexů. Tyto výsledky naznačují, že stabilita *out-of-cage* komplexů pravděpodobně

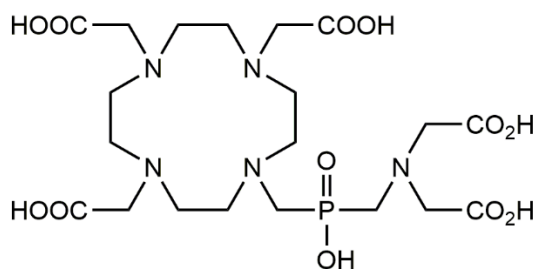
určuje účinnost inkorporace radionuklidu. Formace *out-of-cage* komplexu je rychlost určující faktor nejspíše kvůli nízkým koncentracím (nanomolárním) a přítomnosti konkurujících iontů kovů během radiochemických komplexací. To naznačuje, že přítomnost další chelatující skupiny na pendantním rameni je slibná strategie ke zvýšení rychlosti tvorby radiokomplexu. Nicméně typ chelatující skupiny musí být vybrán obezřetně s ohledem na sílu koordinace, typu spaceru mezi chelatujícími skupinami a druhem makrocyclu. Nevhodná skladba těchto komponent by naopak mohla celkovou rychlost komplexace radionuklidu zpomalit. Naše výsledky naznačují, že přítomnost amino skupiny na pendantním rameni není žádoucí (viz ligand H_4DO3AP^{AM}). Koordinující skupina na pendantním rameni by se měla skládat z kyselé skupiny, jako jsou např. fosfináty na H_5DO3AP^{PIN} .



Obr. 21 Radiochemický výtěžek $^{177}\text{Lu(III)}$ -komplexu v závislosti na koncentraci ligandu (A, 10 MBq, pH 6,6, 95 °C, 30 min) a pH (B, 10 MBq, $n_L = 0,1$ nmol, 95 °C, 30 min).

VLASTNOSTI LIGANDŮ S DVĚMA KOORDINAČNÍMI CENTRY

Pro studium toho, jak jsou ovlivněny komplexační vlastnosti ligandu dalším koordinujícím místem v molekule, byl vybrán ligand H_6DO3AP^{IDA} , který má dvě jasně definovaná koordináční centra – makrocyclus a IDA skupinu připojenou k cyklu přes methylfosfinát (Obr. 22).



Obr. 22 Ligand H_6DO3AP^{IDA}

TERMODYNAMICKÁ STABILITA

Pomocí potenciometrie bylo určeno sedm protonizačních konstant. Tři v bazické oblasti odpovídají protonizaci atomů dusíků (jeden IDA skupiny a dva na makrocyklu). Další čtyři protonizační konstanty ležící v kyselé oblasti náležejí protonizaci atomů kyslíku karboxylátových skupin (**Tab. 4**).

Tab. 4 Protonizační konstanty ligandu H_6DO3AP^{IDA} a dalších diskutovaných ligandů (25 °C, $I = 0,1 \text{ M NMe}_4\text{Cl}$).

	H_6DO3AP^{IDA}	H_4DOTA^{118}	$H_5DO3AP^{PrA, 100}$
$\log K_1$	12,85	12,93	12,68
$\log K_2$	9,63	9,72	9,44
$\log K_3$	8,13	4,62	5,04
$\log K_4$	4,40	4,15	4,34
$\log K_5$	3,27	2,29	3,10
$\log K_6$	1,98	1,34	1,93
$\log K_7$	1,58	–	–

V porovnání se samotnou kyselinou iminodioctovou jsou hodnoty protonizačních konstant jejích fosfinátových derivátů o více než jeden řád nižší kvůli zápornému indukčnímu efektu fosfinátových skupin.¹¹⁹ Hodnoty protonizace atomů dusíku na makrocyklu ligandu jsou srovnatelné s publikovanými konstantami pro H_4DOTA nebo monofosfinátovými analogy (např. H_5DO3AP^{PrA}).¹⁰⁰

Protože v kyselé oblasti pH je komplexace iontů Ln(III) pomalá, systém byl sledován metodou out-of-cell. Tuto metodu nelze použít při vyšších pH ($\text{pH} > 5$) kvůli možnému srážení hydroxidů lanthanoidů. Ve studovaných podmínkách ($\text{pH} < 5$) byly nalezeny jen protonizované komplexy – $[Ln(H_3L)]$, $[Ln(H_2L)]^-$ a $[Ln(HL)]^{2-}$. Pro popsání celého systému bylo tedy nutno znát hodnoty prvních protonizačních konstant patřících protonizaci IDA skupiny (odpovídají formaci částice $[Ln(HL)]^{2-}$). Z acido-bazické titrace předpřipraveného komplexu byla stanovena hodnota protonizační konstanty částice $[Ln(L)]^{3-}$ a následně vypočtena konstanta stability komplexu $[Ln(L)]^{3-}$. Protože komplexace nebyla studována v nadbytku iontů kovů (riziko srážení hydroxidů kovů), byly určeny jen konstanty stability mononukleárních komplexů. Stabilita těchto komplexů je mírně vyšší než u srovnatelných komplexů H_4DOTA (**Tab. 5**).

Tab. 5 Porovnání konstant stability $\log\beta_{011}$ ($\beta_{011} = [M(L)] / ([L] \times [M])$) diskutovaných komplexů (25 °C, $I = 0,1$ M NMe₄Cl).

ligand	Cu(II)	Zn(II)	La(III)	Nd(III)	Eu(III)	Gd(III)	Y(III)
H ₆ DO3AP ^{IDA}	23,75	21,79	22,09	24,02	24,94	25,27	25,39
H ₄ DOTA ¹²⁰	22,3	20,8	22,0	23,7	23,0	24,0	24,0
H ₅ DO3AP ^{PrA, 100}	–	–	23,1	–	25,3	25,04	24,63

Dále byla studována komplexace dvojmocných iontů (Cu(II) a Zn(II)). Při nadbytku kovu jsou v celé měřené oblasti pH dominantně zastoupeny dinukleární komplexy. V bazické oblasti rovněž vznikají dinukleární hydroxidokomplexy, protože jedna molekula ligandu plně nevysytí koordinační sféru obou iontů kovu. Komplexace byla studována standardní in-cell metodou v poměru ligand:kov 1:1 a 1:2. Oba systémy vykazují podobné chování. Za ekvimolárních podmínek jsou v neutrálním a zásaditém prostředí dominantní částice $[M(L)]$ a $[M(HL)]$. Jejich hodnoty konstant stability jsou asi o řád vyšší než pro srovnatelné komplexy H₄DOTA, což ukazuje, že ionty kovů jsou vázány v makrocyclické kavitě. V kyselé oblasti bylo nalezeno více různě protonizovaných částic, kde protonizované jsou nekoordinované karboxylové skupiny nebo atom dusíku IDA skupiny. V Cu(II) komplexu je protonizovaná pouze jedna karboxylátová skupina, což nasvědčuje koordinaci dvou karboxylátů k centrálnímu kovu. Fosfinátové pendantní rameno tak zůstává zřejmě nekoordinované. Překvapivě bylo v kyselé oblasti nalezeno velké množství dinukleárních komplexů i v poměru ligand:kov 1:1. Přítomnost dinukleárních komplexů i v ekvimolárním poměru může být vysvětlena změnou rozložení náboje po koordinaci prvního iontu kovu. Při nízkém pH jsou v makrocycly protonizovány jak atomy dusíku, tak i atomy kyslíku karboxylátových skupin. Pro koordinaci iontu kovu do makrocycly (*in-cage*) musí disociovat nejméně dva protony a snižuje se tak celkový náboj makrocyclické části molekuly.

Přítomnost dvou chelatačních center v ligandu umožňuje vznik heterodinukleárních komplexů. Ln(III) komplexy ligandu H₆DO3AP^{IDA} jsou kineticky vysoce stabilní, a proto mohl být Gd(III) komplex považován za rigidní částici a koordinační chování IDA–fosfinátové skupiny mohlo být hodnoceno nezávisle. Na předpřipraveném komplexu $[Gd(DO3AP^{IDA})]^{3-}$ byla studována koordinace dvojmocných (Cu(II), Zn(II), Ca(II)) i trojmocných (Eu(III)) iontů kovů IDA skupinou (**Tab. 6**).

Tab. 6 Konstanty stability a disociační konstanty předpřipraveného komplexu $[\text{Gd}(\text{DO3AP}^{\text{IDA}})]^{3-}$ s ionty dalších kovů (25 °C, $I = 0,1 \text{ M NMe}_4\text{Cl}$).

Rovnováha ^a	Cu(II)	Zn(II)	Ca(II)	Eu(III)
$\text{M} + [\text{Gd}(\text{L})] = [\text{M}\{\text{Gd}(\text{L})\}]$	10,53	8,10	5,19	8,98
$[\text{M}\{\text{Gd}(\text{HL})\}] = [\text{M}\{\text{Gd}(\text{L})\}] + \text{H}^+$	-	-	-	2,59
$[\text{M}\{\text{Gd}(\text{L})\}] + \text{H}_2\text{O} = [\text{M}\{\text{Gd}(\text{L})\}(\text{OH})] + \text{H}^+$	9,06	^b	11,88	^b
$[\text{M}\{\text{Gd}(\text{L})\}(\text{OH})] + \text{H}_2\text{O} = [\text{M}\{\text{Gd}(\text{L})\}(\text{OH})_2] + \text{H}^+$	11,62	^b	-	^b
$[\text{Gd}(\text{L})] + [\text{M}\{\text{Gd}(\text{L})\}] = [\text{M}\{\text{Gd}(\text{L})\}_2]$	4,87	5,20	-	7,33
$[\text{Gd}(\text{HL})] + [\text{M}\{\text{Gd}(\text{L})\}] = [\text{M}\{\text{Gd}(\text{HL})\}\{\text{Gd}(\text{L})\}]$	2,63	2,58	-	3,84
$[\text{M}\{\text{Gd}(\text{HL})\}\{\text{Gd}(\text{L})\}] = [\text{M}\{\text{Gd}(\text{L})\}_2] + \text{H}^+$	5,55	5,17	-	4,30
$[\text{M}\{\text{Gd}(\text{L})\}_2] + \text{H}_2\text{O} = [\text{M}\{\text{Gd}(\text{L})\}_2(\text{OH})] + \text{H}^+$	10,01	10,71	-	10,3

^a Kvůli přehlednosti jsou vynechány náboje.

^b Konstanty nemohly být stanoveny kvůli srážení hydroxidů kovu v neutrální oblasti.

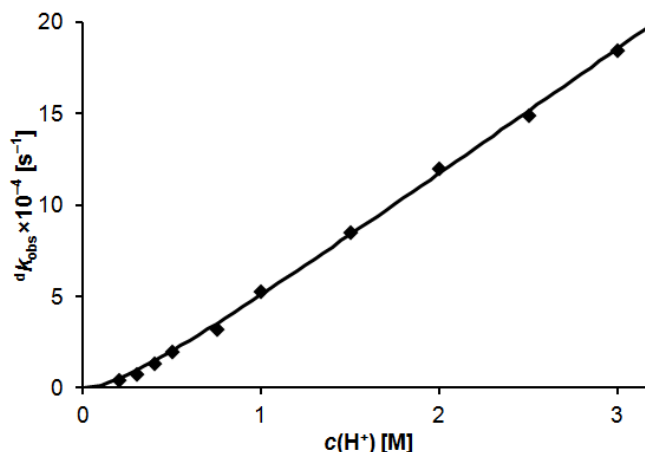
Za ekvimolárních podmínek jsou přednostně tvořeny komplexy $\text{M}:[\text{Gd}(\text{L})]$ 1:1, při nadbytku $[\text{Gd}(\text{L})]$ pak v poměru 1:2. V systému s ionty Eu(III) jsou jejich hodnoty srovnatelné, kdežto u iontů Cu(II) a Zn(II) není koordinace druhé molekuly ligandu preferována z důvodu menší velikosti a nižšího kladného náboje iontu kovů. Na zbývající volná koordinační místa iontů kovu se v bazickém prostředí váží hydroxidové částice za vzniku hydroxidokomplexů. Vznik hydroxidokomplexů v systémech s ionty Ca(II) lze vysvětlit disociací protonu molekuly vody koordinované k centrálnímu iontu Gd(III), která je usnadněna blízkou přítomností koordinovaného iontu Ca(II). Konstanty stability jsou obdobné nebo mírně vyšší ve srovnání s komplexy H_2IDA i přes nižší bazicitu atomu dusíku v komplexu $[\text{Gd}(\text{DO3AP}^{\text{IDA}})]^{3-}$. Ta je komplenzována vyšší denticitou IDA-fosfinátové skupiny, kde se fosfinát může zároveň koordinovat na oba ionty kovů. Tím se IDA-fosfinátová skupina chová jako tetradentátní ligand i přesto, že fosfinát je již vázán na iont kovu v kavitě makrocycly.

Získané hodnoty protonizačních konstant i konstant stability ukazují, že se obě koordinační místa – makrocyclyk i IDA-fosfinát – chovají obdobně jako ligandy, z kterých vycházejí – H_4DOTA a H_2IDA – a vzájemně se i přes svou těsnou blízkost příliš neovlivňují.

DISOCIAČNÍ KINETIKY

Při medicínálním použití je odolnost komplexu vůči jeho disociaci v těle rovněž velmi důležitá. Komplexy odvozené od H_4DOTA obecně vykazují vysokou disociační stabilitu, proto byly disociační kinetiky studovaných komplexů sledovány jen okrajově.

Disociace komplexu $[\text{Ce}(\text{DO3AP}^{\text{IDA}})]^{3-}$ v kyselém prostředí byla studována za použití 0,2–3,0 M HClO_4 (Obr. 23).



Obr. 23 Disociace komplexu $[\text{Ce}(\text{DO3AP}^{\text{IDA}})]^{3-}$ (25 °C, $I = 3 \text{ M (Na/H)ClO}_4$).

Závislost rychlostní konstanty ${}^d k_{\text{obs}}$ na koncentraci $[\text{H}^+]$ se jeví téměř lineární. Nicméně při proložení experimentálních bodů lineární funkcí funkce neprochází bodem $[0;0]$, což naznačuje, že je přítomna další jinak protonizovaná částice ovlivňující kinetiku reakce. Potenciometrií byly určeny 3 protonizační konstanty Ln(III) komplexů ($[\text{M}(\text{HL})]^{2-}$, $[\text{M}(\text{H}_2\text{L})]^-$ a $[\text{M}(\text{H}_3\text{L})]$). Nicméně disociační měření probíhala při pH nižším, než jaké je rozmezí v potenciometrii. Kineticky významnou roli zde nejspíš hraje rovnováha $[\text{M}(\text{H}_3\text{L})] \rightleftharpoons [\text{M}(\text{H}_4\text{L})]^+$, která je definovaná disociační konstantou K_a . Méně protonizovaná částice $[\text{M}(\text{H}_3\text{L})]$ nepřispívá k celkové rychlosti disociace. Částice $[\text{M}(\text{H}_4\text{L})]^+$ může disociovat buď spontánně (rychlostní konstanta ${}^d k_0$), nebo v závislosti na koncentraci protonů (rychlostní konstanta ${}^d k_1$). Rychlost disociace je pak definována rovnicí:

$$v = {}^d k_{\text{obs}} \cdot [\text{komplex}]_{\text{tot}} = {}^d k_0 \cdot [\text{M}(\text{H}_4\text{L})]^+ + {}^d k_1 \cdot [\text{M}(\text{H}_4\text{L})]^+ \cdot [\text{H}^+]$$

, kde $[\text{komplex}]_{\text{tot}}$ představuje celkovou koncentraci komplexu. Použitím výše navržené disociační rovnováhy lze rovnici upravit do tvaru:

$${}^d k_{\text{obs}} = \frac{{}^d k_0 \times [\text{H}^+] / K_a + {}^d k_1 \times [\text{H}^+]^2 / K_a}{1 + [\text{H}^+] / K_a}$$

Hodnota konstanty ${}^d k_1$ je srovnatelná s hodnotami obdobných konstant pro Ce(III) komplexy H_4DOTA a $\text{H}_5\text{DO3AP}$ (Tab. 7). Hodnota ${}^d k_0$ byla zanedbatelná, což naznačuje, že částice $[\text{M}(\text{H}_4\text{L})]^+$ samovolně disociuje jen pozvolna. Toto vše ukazuje na vysokou kinetickou stabilitu komplexu a minimální roli IDA-skupiny pendantního ramene na disociaci komplexu.

Tab. 7 Disociační konstanty diskutovaných Ce(III) komplexů (25 °C).

ligand	disociace ^a (poločas při pH 0)	
H ₆ DO3AP ^{IDA}	${}^d k_1 = 6,9 \times 10^{-4} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	$t_{1/2} = 23 \text{ min}$
H ₄ DOTA	${}^d k_1 = 8 \times 10^{-4} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ${}^d k_2 = 2 \times 10^{-3} \text{ M}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (ref. ¹¹⁷)	$t_{1/2} = 4 \text{ min}$
	${}^d k_1 = 3,4 \times 10^{-4} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ${}^d k_2 = 1,6 \times 10^{-3} \text{ M}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (ref. ¹²¹)	$t_{1/2} = 6 \text{ min}$
H ₅ DO3AP	${}^d k_1 = 1,22 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (ref. ⁹⁵)	$t_{1/2} = 10 \text{ min}$

$${}^a {}^d k_{\text{obs}} = {}^d k_1 \cdot [\text{H}^+] + {}^d k_2 \cdot [\text{H}^+]^2$$

V podmínkách bližších medicínálnímu použití (pH 7,4) byla pomocí NMR spektroskopie sledována disociace resp. transmetalace komplexu Eu–H₈DO3AP^{BP} za laboratorní teploty v přítomnosti pětinasobného množství iontů Zn(II). Systém se jevil velmi inertní. Po třech týdnech došlo k transmetalaci jen z 5 % a po dvou měsících z 9 %. Všechny disociační experimenty tak ukazují, že přítomnost silně koordinující skupiny v pendantním rameni nesnižuje kinetickou inertnost komplexů.

ZÁVĚR

Komplexy kovů našly široké uplatnění v medicíně. Nicméně ani klinicky používané látky zdaleka nedosahují ideálních vlastností a je zde proto prostor pro jejich vylepšení.

Hlavní limitací je především pomalá tvorba komplexů s radioizotopy. Studovaný ligand H_4DOTA , který má na makrocyclickém kruhu navázány čtyři stejné acetátové skupiny, tvoří vysoce stabilní komplexy, avšak rychlost komplexace je často poměrně nízká.

Tato práce se zaměřila na fosfonátové a fosfinátové deriváty ligandu H_4DOTA . Studované látky lze rozdělit na ligandy obsahující pouze methylfosfinát/fosfonát (H_4DO3AP^H , H_5DO3AP^{OH}) a ligandy s druhým koordinačním centrem (H_6DO3AP^{IDA} , H_5DO3AP^{PIN} , H_4DO3AP^{AM} , H_8DO3AP^{BP} a H_7DOTAM^{BP}).

Jednou z cest ke zrychlení komplexace, a tím pádem i k získání většího výtěžku, je přidání další slabě koordinující skupiny do molekuly ligandu. Jako vhodné se ukázaly kyselé skupiny (např. fosfináty na H_5DO3AP^{PIN}), naopak nevhodná je přítomnost amino skupiny (H_4DO3AP^{AM}).

Důležitá je stabilita *out-of-cage* komplexu, která hraje stěžejní roli pro rychlost vzniku *in-cage* komplexu. Všechny fosfinátové i fosfonátové ligandy ukázaly vyšší stabilitu *out-of-cage* komplexů než H_4DOTA díky nižšímu pK_a fosfinátových či fosfonátových skupin ve srovnání s karboxyláty. Ukázalo se, že na tvorbu *out-of-cage* komplexů má vliv nejen koordinační skupina na pendantním rameni, ale i způsob jejího navázání na makrocycklus. Zatímco ligand H_6DO3AP^{BP} , ve kterém je bis(fosfonátová) skupina připojena přes fosfinát, se choval obdobně jako H_4DOTA , tvorba komplexů s ligandem H_7DOTAM^{BP} , který má bis(fosfonátovou) skupinu navázanou na amid, vykazovala odlišný typ závislosti. Pokud jde o vliv skupiny na pendantním rameni, přítomnost slabě koordinující skupiny komplexaci urychlovala, ale již silněji koordinující skupina na pendantním rameni rychlost přechodu iontu kovu do makrocycclu (vznik *in-cage* komplexu) výrazně zpomalovala (H_6DO3AP^{IDA}).

Kinetická měření se za laboratorních podmínek provádí ve velkém nadbytku iontů kovu (matematický popis reakcí se zjednoduší na kinetiku prvního řádu), ale v praxi se při přípravě radiokomplexů používá ohromný nadbytek ligandu. Proto bylo zkoumáno, zda se systémy chovají stejně v nadbytku iontů kovu i v nadbytku ligandu. Obecně se totiž v literatuře předpokládá vznik pouze jednoho typu *out-of-cage* komplexu. Naše

studie ukázala, že u studovaných ligandů se za různých podmínek může tvořit několik typů *out-of-cage* komplexů s rozdílnou stechiometrií v závislosti na poměrech koncentrací ligandů a iontů kovu a na druhu pendantního ramene navázaného na makrocyklus.

Většina studovaných ligandů ukázala podobný pH profil rychlosti komplexace jak v nadbytku ligandu, tak i v nadbytku kovu. Překvapivě však srovnání neukázalo žádnou závislost rychlosti komplexace na bazicitě ligandu nebo na podmíněných konstantách stability *out-of-cage* komplexů.

Při komplexaci za radiochemických podmínek, kdy je koncentrace reaktantů řádově nižší, výsledky naznačují, že stabilita *out-of-cage* komplexů i zde pravděpodobně určuje účinnost inkorporace radionuklidu. Naše výsledky ukazují, že vhodná chelatující skupiny na pendantním rameni je cestou ke zvýšení rychlosti tvorby radiokomplexu. Koordinující skupina by měla obsahovat kyselou skupinu, jako jsou např. fosfináty na $H_5DO_3AP^{PIN}$. Naopak nevhodná je přítomnost amino skupiny na pendantním rameni ($H_4DO_3AP^{AM}$), která celkovou rychlost komplexace radionuklidu zpomalila.

Lze říci, že vliv na rychlost tvorby komplexů mají koordinující skupiny na pendantním rameni, typ linkeru mezi chelatujícími skupinami i druh makrocyklu. Je třeba najít vhodnou skladbu těchto komponent, aby bylo dosaženo požadovaných vlastností.

LITERATURA

- ¹ J. Scheuerová, *Praktická radiologie* 2019, 4, 8–14
- ² J. Kotek, I. Lukeš, *Chem. Listy* 2010, 104, 1163–1174
- ³ L. Caschera, A. Lazzara, L. Piergallini, D. Ricci, B. Tuscano, A. Vanzulli, *Pharmacol. Res.* 2016, 110, 65–75
- ⁴ D. K. Cabiness, D. W. Margerum, *J. Am. Chem. Soc.* 1969, 91, 6540
- ⁵ H. Stetter, W. Frank, R. Mertens, *Tetrahedron* 1981, 37, 767–772
- ⁶ S. Zhang, G. Gangal, H. Uludag, *Chem. Soc. Rev.* 2007, 36, 507–531; V. Kubíček, I. Lukeš, *Future Med. Chem.* 2010, 2, 521–531; K. Ogawa, K. Washiyama, *Curr. Med. Chem.*, 2012, 19, 3290–3300
- ⁷ M. I. Kabachnik, T. Ya. Medvedev, Yu. M. Polikarpov, B. K. Sherbakov, F. I. Belski, E. I. Matrosov, M. P. Pasechnik, *Bull. Acad. Sci. USSR, Div. Chem. Sci.*, 1984, 33, 769–777
- ⁸ M. I. Kabachnik, T. Ya. Medvedev, F. I. Belski, S. A. Pisareva, *Bull. Acad. Sci. USSR, Div. Chem. Sci.*, 1984, 33, 777–782
- ⁹ S. A. Pisareva, F. I. Belski, T. Ya. Medvedev, M. I. Kabachnik, *Bull. Acad. Sci. USSR, Div. Chem. Sci.*, 1987, 36, 372–376
- ¹⁰ D. Parker, J. A. G. Williams, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, 1996, 3613–3628; K. P. Wainwright, *Coord. Chem. Rev.*, 1997, 166, 35–90; P. Caravan, J. J. Ellison, T. J. McMurry, R. B. Lauffer, *Chem. Rev.*, 1999, 99, 2293–2352; D. Parker, R. S. Dickins, H. Puschmann, C. Crossland, J. A. K. Howard, *Chem. Rev.*, 2002, 102, 1977–2010; D. Parker, *Chem. Soc. Rev.* 2004, 33, 156 – 165; R. Delgado, V. Felix, L. M. P. Lima, D. W. Price, *Dalton Trans.* 2007, 2734–2745; L. Frullano, T. J. Meade, *J. Biol. Inorg. Chem.* 2007, 12, 939–949; S. J. Archibald, *Annu. Rep. Prog. Chem., Sect. A* 2007, 103, 264–286; J.-G. Mao, *Coord. Chem. Rev.* 2007, 251, 1493–1520; E. J. Werner, A. Datta, Ch. J. Jocher, K. N. Raymond, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2008, 47, 8568 – 8580; P. Hermann, J. Kotek, V. Kubíček, I. Lukeš, *Dalton Trans.*, 2008, 3027–3047; E. Mewis, S. J. Archibald, *Coord. Chem. Rev.* 2010, 254, 1686–1712; S. Viswanathan, Z. Kovacs, K. N. Green, S. J. Ratnakar, A. D. Sherry, *Chem. Rev.* 2010, 110, 2960–3018; A. J. L. Villaraza, A. Bumb, M. W. Brechbiel, *Chem. Rev.* 2010, 110, 2921–2959; C. Tu, E. A. Osborne, A. Y. Louie, *Ann. Biomed. Eng.* 2011, 39, 1335–1348; B. Drahoš, I. Lukeš, É. Tóth, *Eur. J. Inorg. Chem.* 2012, 1975–1986

-
- ¹¹ S. Vallabhajosula, *Molecular imaging. Radiopharmaceuticals for PET and SPECT*. Berlin – Heidelberg: Springer-Verlag, 2009; G. B. Saha, *Fundamentals of nuclear pharmacy*. New York: SpringerScience, 2010
- ¹² P. Zanzonico, *Radiat. Res.* 2012, 177, 349–364
- ¹³ M. M. Khalil, J. L. Tremoleda, T. B. Bayomy, W. Gsell, *Int. J. Mol. Imaging* 2011, 2011: 796025
- ¹⁴ M. Kohlíčková, V. Jedináková–Křížová, F. Melichar, *Chem. Listy* 1998, 92, 643–655; K. Schwochau, *Technetium: chemistry and radiopharmaceutical applications*. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH, 2000
- ¹⁵ L. Habala, J. Valentová, *Čes. Slov. Farm.* 2018, 67, 182–191
- ¹⁶ G. B. Saha, *Basics of PET imaging. Physics, chemistry, and regulations*. New York: Springer Science, 2010
- ¹⁷ A. L. Vāvere, J. S. Lewis, *Dalton Trans.* 2007; 43, 4893–4902
- ¹⁸ A. Datta, P. Panwar, K. Chuttani, A. K. Mishra, *Cancer Biother. Radiopharm.* 2009, 24, 123–128
- ¹⁹ N. J. Parks, T. G. Kawakami, M. J. Avila, R. White, G. R. Cain, S. D. Raaka, W. Hornoff, P. Fisher, P. Moore, J. A. Seibert, J. Garlich, J. Simon, R. Champlin, *Blood* 1993, 82, 318–325
- ²⁰ J. G. Rajendran, J. F. Eary, W. Bensinger, L. D. Durack, C. Vernon, A. Fritzberg, J. Nucl. Med. 2002, 43(10), 1383–1390; S. Giralt, W. Bensinger, M. Goodman, D. Podoloff, J. Eary, R. Wendt, R. Alexanian, D. Weber, D. Maloney, L. Holmberg, J. Rajandran, H. Breitz, R. Ghalie, R. Champlin, *Blood* 2003, 102, 2684–2691; A. V. Christoforidou, R. M. Saliba, P. Williams, M. Qazilbash, L. Roden, A. Aleman, D. Weber, F. Mendoza, D. Podoloff, R. Wendt III, H. Breitz, R. Alexanian, R. Champlin, S. Giralt, *Biol. Blood Marrow Transplantation* 2007, 13, 543–549
- ²¹ H. Breitz, R. Wendt, M. Stabin, L. Bouchet, B. Wessels, *Cancer Biother. Radiopharm.* 2003, 18, 225–230
- ²² J. T. Cessna, B. E. Zimmerman, M. P. Unterweger, D. B. Golas, *Appl. Radiation Isotopes*, 2004, 60, 505–510
- ²³ N. T. Ueno, J. A. de Souza, D. Booser, K. Nakayama, J. Madewell, R. E. Wendt, G. N. Hortobagyi, D. Podoloff, R. E. Champlin, *Clinical Breast Cancer* 2009, 9, 173–177

-
- ²⁴ K. Kothari, G. Samuel, S. Banerjee, P. R. Unni, H. D. Sarma, P.R. Chaudhari, T. P. Unnikrishnan, M. R. A. Pillai, Nucl. Med. Biol. 2001, 28, 709–717
- ²⁵ F. C. Alves, P. Donato, A. D. Sherry, A. Zaheer, S. Zhang, A. J. M. Lubag, M. E. Merritt, R. E. Lenkiski, J. V. Frangioni, M. Neves, M. I. M. Prata, A. C. Santos, J. J. P. de Lima, C. F. G. C. Geraldies, Invest. Radiol. 2003, 38, 750–760.; H. Yousefnia, A. R. Jalilian, S. Zolghadri, A. Mirzaei, A. Bahrami–Samani, M. Mirzaii, M. Ghannadi, J. Radioanal. Nucl. Chem. 2015, 304, 911–916; H. Yousefnia, A. R. Jalilian, S. Zolghadri, A. Mirzaei, A. Bahrami–Samani, M. Mirzaii, M. Ghannadi, J. Radioanal. Nucl. Chem. 2015, 304, 911–916
- ²⁶ J. Simon, R. K. Frank, D. K. Crump, W. D. Erwin, N. T. Ueno, R. E. Wendt, Nucl. Med. Biol. 2012, 39, 770–776
- ²⁷ R. Chakravarty, S. Chakraborty, V. Chirayil, A. Dash, Nucl. Med. Biol. 2014, 41, 163–170
- ²⁸ K. Vats, T. Das, H. D. Sarma, S. Banerjee, M.R.A. Pillai, Cancer Biother. Radiopharm. 2013, 28, 737–745
- ²⁹ L. Safarzadeh, M. Ghannadi–Maragheh, A. Anvari, S. M. R. Aghamiri, S. Shirvani–Arani, A. Bahrami–Samani, Iranian J. Pharm. Sci. 2012, 8, 135–141
- ³⁰ T. Das, S. Chakraborty, P. R. Unni, S. Banerjee, G. Samuel, H. D. Sarma, M. Venkatesh, M. R. A. Pillai, Appl. Radiation Isotopes, 2002, 57, 177–184
- ³¹ M. Fellner, R. P. Baum, V. Kubíček, P. Hermann, I. Lukeš, V. Prasad, F. Rösch, Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging 2010, 37, 834
- ³² H. Yousefnia, S. Zolghadri, A. R. Jalilian, Radiochim. Acta 2015, 103, 653–661; M. Vaez–Tehrani, S. Zolghadri, H. Afarideh, H. Yousefnia, J. Radioanal. Nucl. Chem. 2015, 309, 1183–1190; ³² H. Yousefnia, N. Amraei, M. Hoshtalab, S. Zolghadri, A. Bahrami–Samani, J. Radioanal. Nucl. Chem. 2015, 304, 1285–1291; H. Yousefnia, S. Zolghadri, H. R. Sadeghi, M. Naderi, A. R. Jalilian, S. Shanehsazzadeh, J. Radioanal. Nucl. Chem. 2016, 307, 1243–1251; A. Rabiei, M. Shamsaei, H. Yousefnia, S. Zolghadri, A. R. Jalilian, R. Enayati, Radiochim. Acta 2016, 104, 727–734
- ³³ M. Fellner, B. Biesalski, N. Bausbacher, V. Kubíček, P. Hermann, F. Roesch, O. Thews, Nuclear Medicine and Biology 2012, 39, 993–999
- ³⁴ M. Meckel, A. Nauth, J. Timpe, K. Zhernosekov, A. D. Puranik, R. P. Baum, F. Roesch, Cancer Biother. Radiopharm. 2015, 30, 94–99

-
- ³⁵ K. Suzuki, M. Satake, J. Suwada, S. Oshikiri, H. Ashino, H. Dozono, A. Hino, H. Kasahara, T. Minamizawa, *Nucl. Med. Biol.* 2011, 38, 1011–1018; J. Holub, M. Meckel, V. Kubíček, F. Rösch, P. Hermann, *Contrast Media Mol. Imaging* 2015, 10, 122–134
- ³⁶ A. Passah, M. Tripathi, R. Kumar, C. J. Das, A. Goyal, C. S. Bal, *Clin. Nucl. Med.* 2014, 39, 653–654
- ³⁷ B. Sandhöfer, M. Meckel, J. M. Delgado–Lopez, T. Patricio, A. Tampieri, F. Roesch, M. Iafisco, *ACS Appl. Mater. Interfaces* 2015, 7, 10623–10633
- ³⁸ T. J. Norman, D. Parker, L. Royle, A. Harisson, P. Antoniw, D. J. King, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 1995, 1877–1878
- ³⁹ M. Försterová, M. Petřík, A. Lázničková, M. Lázniček, P. Hermann, I. Lukeš, F. Melichar, *Appl. Radiation Isotopes*, 2009, 67, 21–29
- ⁴⁰ Lázničková, M. Petřík, P. Hermann, I. Lukeš, *J. Radioanal. Nucl. Chem.* 2007, 273, 583–586
- ⁴¹ S. Lacerda, F. Marques, P. Campello, L. Gano, V. Kubíček, P. Hermann, I. Santos, *J. Label Compd. Radiopharm.*, 2010, 53, 36–43
- ⁴² R. Kerdjoudj, M. Pniok, C. Alliot, V. Kubíček, J. Havlíčková, F. Rösch, P. Hermann, S. Huclier–Markai, *Dalton Trans.* 2016, 45, 1398–1409
- ⁴³ A. E. Merbach, L. Helm and É. Tóth, *The Chemistry of Contrast Agents in Medical Magnetic Resonance Imaging*, John Wiley & Sons, Chichester, 2013; C. Westbrook, *MRI at a glance*. Chichester: John Wiley & Sons Ltd, 2016
- ⁴⁴ S. Laurent, C. Henoumont, D. Stanicki, S. Boutry, E. Lipani, S. Belaid, R. N. Muller, L. V. Elst, *MRI contrast agents. From molecules to particles*. Singapore: Springer Nature, 2017
- ⁴⁵ H.–K. Kim, G. H. Lee, Y. Chang, *Future Med. Chem.*, 2018, 10, 639–661; Z. Zhang, A. N. Shrikumar, T. J. McMurry, *Curr. Med. Chem.*, 2005, 12, 751–778
- ⁴⁶ L. Caschera, A. Lazzara, L. Piergallini, D. Ricci, B. Tuscano, A. Vanzulli, *Pharmacol. Res.*, 2016, 110, 65–75; G. B. Giovenzana, L. Lattuada, R. Negri, *Isr. J. Chem.* 2017, 57, 825–832
- ⁴⁷ C. S. Bonnet, É. Tóth, *Chimia*, 2016, 70, 102–108, J. Lux, A. D. Sherry, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2018, 45, 121–130
- ⁴⁸ A. D. Sherry, Y. Wu, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2013, 17, 167–174
- ⁴⁹ R. Pullicino, K. Das, *J. R. Coll. Physicians Edinb.* 2017, 47, 243–246

-
- ⁵⁰ S. E. Cowper, H. S. Robin, S. M. Steinberg, L. D. Su, S. Gupta, P. E. Leboit, *Lancet* 2000, 356(9234), 1000–1001
- ⁵¹ T. Grobner, *Nephrol. Dial. Transplant.* 2006, 21(4), 1104–1108
- ⁵² J. Mladá, P. Vacková, *Urol. praxi* 2011, 12(3), 189–190
- ⁵³ J. Vymazal, P. Šustek, *Ces. Radiol.*, 2017, 4, 260–264
- ⁵⁴ T. Kanda, K. Ishii, H. Kawaguchi, K. Kitajima, D. Takenaka, *Radiology*, 2014, 270(3), 834–841
- ⁵⁵ J. Vymazal, A. M. J. Rulseh, M. Dracinsky, J. Kotek, J. Tarabek, P. Majer, M. Pingle, P. Cigler, *ESMRMB 2017, 34th Annual Scientific Meeting, Barcelona, MAGMA*, 2017, 30(Suppl 1), 1–152 Proceedings of ESMRMB Meeting.
- ⁵⁶ J. Lohrke, A. L. Frisk, T. Frenzel, L. Schöckel, M. Rosenbruch, G. Jost, D. C. Lenhard, M.A. Sieber, V. Nischwitz, A. Küppers, H. Pietsch, *Invest. Radiol.*, 2017, 52(6), 324–333
- ⁵⁷ S. S. Kelkar, T. M. Reineke, *Bioconjugate Chem.*, 2011, 22, 1879–1903
- ⁵⁸ C. F. G. C. Geraldes, R. D. Brown, W. P. Cacheris, S. H. Koenig, A. D. Sherry, M. Spiller, *Magnet. Reson. Med.* 1989, 9, 94–104
- ⁵⁹ D. Kruk, J. Kowalewski, *J. Chem. Phys.* 2002, 117, 1194–1200
- ⁶⁰ S. Aime, M. Botta, D. Parker, J. A. G. Williams, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* 1996, 17–23; A. Borel, L. Helm, A. E. Merbach, *Chem. Eur. J.* 2001, 7, 600–610; Z. Kotková, G. A. Pereira, K. Djanashvili, J. Kotek, J. Rudovský, P. Hermann, L. Vander Elst, R. N. Muller, C. F. G. C. Geraldes, I. Lukeš, J.A. Peters, *Eur. J. Inorg. Chem.* 2009, 119–136
- ⁶¹ S. Aime, M. Botta, E. Terreno, P. L. Anelli, F. Uggeri, *Magnet. Reson. Med.* 1993, 30, 583–691; X. Wu, A. C. Dawsey, B. N. Siriwardena–Mahanama, M. J. Allen, T. J. Williams, *J. Fluorine Chem.* 2014, 168, 177–183
- ⁶² F. C. Alves, P. Donato, A. D. Sherry, A. Zaheer, S. Zhang, A. J. M. Lubag, M. E. Merritt, R. E. Lenkinski, J. V. Frangioni, M. Neves, M. I. M. Prata, A. C. Santos, J. J. P. de Lima, C. F. G. C. Geraldes, *Invest. Radiol.* 2003, 38, 750–760
- ⁶³ E. Di Gregorio, G. Ferrauto, E. Gianolio, S. Lanzardo, C. Carrera, F. Fedeli, S. Aime, *ACSnano* 2015, 9, 8239–8248
- ⁶⁴ G. V. Martinez, X. Zhang, M. L. García–Martín, D. L. Morse, M. Woods, A. D. Sherry, R. J. Gillies, *NMR Biomed.* 2011, 24, 1380–1391
- ⁶⁵ J. Yu, A. F. Martins, Ch. Preihs, V. C. Jordan, S. Chirayil, P. Zhao, Y. Wu, K. Nasr, G. E. Kiefer, A. D. Sherry, *J. Am. Chem. Soc.* 2015, 137, 14173–14179

-
- ⁶⁶ F. K. Kálmán, Z. Baranyai, I. Tóth, I. Bányai, R. Király, E. Brücher, S. Aime, X. Sun, A. D. Sherry, Z. Kovács, *Inorg. Chem.* 2008, 47, 3851–3862
- ⁶⁷ J. Rudovský, P. Cígler, J. Kotek, P. Hermann, P. Vojtíšek, I. Lukeš, J. A. Peters, L. Vander Elst, R. N. Miller, *Chem. Eur. J.* 2005, 11, 2373–2384
- ⁶⁸ P. Lebdušková, P. Hermann, L. Helm, E. Tóth, J. Kotek, K. Binnemans, J. Rudovský, I. Lukeš, A. E. Merbach, *Dalton Trans.*, 2007, 493–501
- ⁶⁹ G. A. Pereira, J. A. Peters, E. Terreno, D. D. Castelli, S. Aime, S. Laurent, L. Vander Elst, R. N. Muller, C. F. G. C. Geraldes, *Eur. J. Inorg. Chem.* 2012, 2087–2098
- ⁷⁰ J. Rudovský, J. Kotek, P. Hermann, I. Lukeš, V. Mainero, S. Aime, *Org. Biomol. Chem.* 2005, 3, 112–117
- ⁷¹ V. Kubíček, I. Lukeš, *Future Med. Chem.* 2010, 2, 521–531
- ⁷² V. Kubíček, J. Rudovský, J. Kotek, P. Hermann, L. Vander Elst, R. N. Muller, Z. I. Kolar, H. Th. Wolterbeek, J. A. Peters, I. Lukeš, *J. Am. Chem. Soc.* 2005, 127, 16477–16485; T. Vitha, V. Kubíček, P. Hermann, L. Vander Elst, R. N. Muller, Z. I. Kolar, H. T. Wolterbeek, W. A. P. Breeman, I. Lukeš, J. A. Peters, *J. Med. Chem.*, 2008, 51, 677–683; T. Vitha, V. Kubíček, J. Kotek, P. Hermann, L. Vander Elst, R. N. Muller, I. Lukeš, J. A. Peters *Dalton Trans.* 2009, 3204–3214
- ⁷³ J. Marmuk, K. Nasr, E. Vinogradov, A. J. Madhuranthakam, J. V. Frangioni, R. E. Lenkinski, *Proc. Intl. Soc. Mag. Reson. Med.* 2011, 19, 457
- ⁷⁴ I. Řehoř, V. Kubíček, J. Kotek, P. Hermann, I. Lukeš, J. Szaková, L. Vander Elst, R. N. Muller, J. A. Peters, *J. Mater. Chem.*, 2009, 19, 1494–1500; I. Řehoř, V. Vilímová, P. Jendelová, V. Kubíček, D. Jiráček, V. Herynek, M. Kapcalová, J. Kotek, J. Černý, P. Hermann, I. Lukeš, *J. Med. Chem.*, 2011, 54, 5185–5194
- ⁷⁵ S. Zhang, K. Wu, A. D. Sherry, *Angew. Chem. Int. Ed.* 1999, 38, 3192–3194; F. K. Kálmán, M. Woods, P. Caravan, P. Jurek, M. Spiller, G. Tircso, R. Kiraly, E. Brücher, A. D. Sherry, *Inorg. Chem.* 2007, 46, 5260–5270
- ⁷⁶ N. Raghunand, Ch. Howison, A. D. Sherry, S. Zhang, R. J. Gillies, *Magnet. Reson. Med.* 2003, 49, 249–257; M. L. Garcia–Martin, G. V. Martinez, N. Raghunand, A. D. Sherry, S. Zhang, R. J. Gillies, *Magnet. Reson. Med.* 2006, 55, 309–315; G. V. Martinez, X. Zhang, M. L. Garcia–Martin, D. L. Morse, M. Woods, A. D. Sherry, R. J. Gillies, *NMR Biomed.* 2011, 24, 1380–1391

⁷⁷ M. M. Ali, M. Woods, P. Caravan, A. L. Opina, M. Spiller, J. C. Fettinger, A. D. Sherry, *Chem. Eur. J.* 2008, 14, 7250–7258

⁷⁸ J. Arinez–Soriano, J. Albalad, A. Carne–Sanchez, C. S. Bonnet, F. Busque, J. Lorenzo, J. Juanhuix, M. W. Terban, I. Imaz, E. Toth, D. MasPOCH, *Chem. Eur. J.* 2016, 22, 13162–13170

⁷⁹ Y. Huang, D. Coman, M. M. Ali, F. Hyder, *Contrast Media Mol. Imaging* 2015, 10, 51–58; X. Wang, Y. Wu, T. C. Soesbe, J. Yu, P. Zhao, G. E. Kiefer, A. D. Sherry, *Agew. Chem. Int. Ed.* 2015, 54, 8662–8664; W. S. Fernando, A. F. Martins, P. Zhao, Y. Wu, G. E. Kiefer, C. Platas–Iglesias, A. D. Sherry, *Inorg. Chem.* 2016, 55, 3007–3014

⁸⁰ I. Mamedov, A. Mishra, G. Angelovski, H. A. Mayer, L.–O. Palsson, D. Parker, N. K. Logothetis *Dalton Trans.* 2007, 5260–5267; I. Mamedov, P. Táborský, P. Lubal, S. Laurent, L. Vander Elst, H. A. Mayer, N. K. Logothetis, G. Angelovski, *Eur. J. Inorg. Chem.* 2009, 3298–3306

⁸¹ D. Lawson, A. Barge, E. Terreno, D. Parker, S. Aime, M. Botta, *Dalton Trans.* 2015, 44, 4910–4917

⁸² V. Kubíček, T. Vitha, J. Kotek, P. Hermann, L. Vander Elst, R. N. Muller, I. Lukeš, J. A. Peters, *Contrast Media Mol. Imag.* 2010, 5, 294–296

⁸³ E. T. Clarke, A. E. Martell, *Inorg. Chim. Acta*, 1991, 190, 37–46; S. Chaves, R. Delgado, J.J.R. Frausto Da Silva, *Talanta* 1992, 39, 249–254

⁸⁴ C. F. G. C. Geraldés, A. D. Sherry, W. P. Cacheris, *Inorg. Chem.* 1989, 28, 3336–3341; R. Delgado, L. C. Siegfried, T. A. Kaden, *Helv. Chim. Acta* 1990, 73, 140–148; K. Bazakas, I. Lukeš, *J. Chem. Soc. Dalton. Trans.*, 1995, 1133–1137; A. D. Sherry, J. Ren, J. Huskens, E. Brücher, É. Tóth, C. F. C. G. Geraldés, M. M. C. A. Castro, W. P. Cacheris, *Inorg. Chem.* 1996, 35, 4604–4612; W. D. Kim, G. E. Kiefer, J. Huskens, A. D. Sherry, *Inorg. Chem.* 1997, 36, 4128–4134; R. Delgado, J. Costa, K. P. Guerra¹, L. M. P. Lima, *Pure Appl. Chem.* 2005, 77, 569–579; M. Försterová, Z. Jandurová, F. Marques, L. Gano, P. Lubal, J. Vaněk, P. Hermann, I. Santos, *J. Inorg. Biochem.* 2008, 102, 1531–1540; L. C. Sepini, N. V. Jarvis, D. R. Jansen, J. R. Zeevaart *Anal. Chim. Acta* 2012, 730, 66–70; E. Cole, D. Parker, G. Ferguson, J. F. Gallagher, B. Kaitner, *J. Chem. Soc., Chem. Commun* 1991, 1473–1475; I. Lázár, A. D. Sherry, R. Ramasamy, E. Brücher, R. Király, *Inorg. Chem.*, 1991, 30, 5016–5019; P. Lubal, M. Kývala, P. Hermann, J. Holubová, J. Rohovec, J. Havel, I. Lukeš, *Polyhedron*, 2001, 20, 47–55; J. Rohovec, M. Kývala, P. Vojtíšek, P. Hermann, I. Lukeš,

Eur. J. Inorg. Chem., 2000, 195–203; Z. Kotková, G. A. Pereira, K. Djanashvili, J. Kotek, J. Rudovský, P. Hermann, L. Vander Elst, R. N. Muller, C. F. G. C. Geraldés, I. Lukeš, J.A. Peters, Eur. J. Inorg. Chem. 2009, 119–136; J. Šimeček, P. Hermann, J. Havlíčková, E. Hardtweck, T. G. Kapp, N. Engelbogen, H. Kessler, H.–J. Wester, J. Notni, Chem. Eur. J. 2013, 19, 7748–7757; R. Ševčík, J. Vaněk, P. Lubal, Z. Kotková, J. Kotek, P. Hermann, Polyhedron 2014, 67, 449–455

⁸⁵ P. Táborský, P. Lubal, J. Havel, J. Kotek, P. Hermann, I. Lukeš, Collect. Czech. Chem. Commun., 2005, 70, 1909–1942; M. Försterová, I. Svobodová, P. Lubal, P. Táborský, J. Kotek, P. Hermann, I. Lukeš, Dalton Trans., 2007, 535–549; M. Reková, P. Vačura, V. Jedináková–Křížová, Open Inorg. Chem. J., 2009, 3, 26–32; S. Lacerda, F. Marques, P. Campello, L. Gano, V. Kubíček, P. Hermann, I. Santos, J. Label Compd. Radiopharm., 2010, 53, 36–43; R. Kerdjoudj, M. Pniok, C. Alliot, V. Kubíček, J. Havlíčková, F. Rösch, P. Hermann, S. Huclier–Markai, Dalton Trans. 2016, 45, 1398–1409; J. Huskens, D. A. Torres, Z. Kovacs, J. P. Andre, C. F. G. C. Geraldés, A. D. Sherry, Inorg. Chem. 1997, 36, 1495–1503; L. Burai, J. Ren, Z. Kovacs, E. Brucher, A. D. Sherry. Inorg. Chem. 1998, 37, 69–75; C. Bianchini, G. Giambastiani, F. Laschi, P. Mariani, A. Vacca, F. Vizza, P. Zanello, Org. Biomol. Chem. 2003, 1, 879–886; F. K. Kálmán, Z. Baranyai, I. Tóth, I. Bányai, R. Király, E. Brücher, S. Aime, X. Sun, A. D. Sherry, Z. Kovács, Inorg. Chem. 2008, 47, 3851–3862; M. P. C. Campello, S. Lacerda, I. C. Santos, G. A. Pereira, C. F. G. C. Geraldés, J. Kotek, P. Hermann, J. Vaněk, P. Lubal, V. Kubíček, E. Tóth, I. Santos, Chem. Eur. J. 2010, 16, 8446–8465; M. P. Campello, M. Balbina, I. Santos, P. Lubal, R. Ševčík, R. Ševčíková, Helv. Chim. Acta 2009, 92, 2398–2413; U. Kreher, M. T. W. Hearn, L. Spiccia, Aust. J. Chem. 2009, 62, 1583–1592; L. M. P. Lima, R. Delgado, P. Hermann, R. Ševčík, P. Lubal, H. F. Carvalho, A. F. Martins, É. Tóth, C. F. G. C. Geraldés, Eur. J. Inorg. Chem. 2012, 2548–2559; L. M. P. Lima, C. V. Esteves, R. Delgado, P. Hermann, J. Kotek, R. Ševčíková, P. Lubal, Eur. J. Inorg. Chem. 2012, 2533–2547

⁸⁶ S. Aime, A. Barge, J. I. Bruce, M. Botta, J. A. K. Howard, J. M. Moloney, D. Parker, A. S. de Sousa, M. Woods, J. Am. Chem. Soc. 1999, 121, 5762–5771

⁸⁷ J. Rohovec, M. Kývala, P. Vojtíšek, P. Hermann, I. Lukeš, Eur. J. Inorg. Chem. 2000, 195–203

⁸⁸ S. Aime, A. S. Batsanov, M. Botta, J. A. K. Howard, D. Parker, K. Senanayake, G. Williams, Inorg. Chem. 1994, 33, 4696–4706

-
- ⁸⁹ I. Lázár, D. C. Hrnčir, W. D. Kim, G. E. Kiefer, A. D. Sherry, *Inorg. Chem.* 1992, 31, 4422–4424
- ⁹⁰ J. Rohovec, M. Kývala, P. Vojtíšek, P. Hermann, I. Lukeš, *Eur. J. Inorg. Chem.* 2000, 195–203
- ⁹¹ A. Bianchi, L. Calabi, C. Giorgi, P. Losi, P. Mariani, P. Paoli, P. Rossi, B. Valtancoli, M. Virtuani, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* 2000, 697–705
- ⁹² R. Delgado, L. C. Siegfried, T. A. Kaden, *Helv. Chim. Acta* 1990, 73, 140–148.
- ⁹³ M. P. C. Campello, M. Balbina, I. Santos, P. Lubal, R. Ševčík, R. Ševčíková, *Helv. Chim. Acta* 2009, 92, 2398–2413
- ⁹⁴ M. P. C. Campello, S. Lacerda, I. C. Santos, G. A. Pereira, C. F. G. C. Geraldés, J. Kotek, P. Hermann, J. Vaněk, P. Lubal, V. Kubíček, E. Tóth, I. Santos, *Chem. Eur. J.* 2010, 16, 8446–8465
- ⁹⁵ P. Táborský, P. Lubal, J. Havel, J. Kotek, P. Hermann, I. Lukeš, *Collect. Czech. Chem. Commun.* 2005, 70, 1909–1942
- ⁹⁶ R. M. Smith, A. E. Martell, *Critical Stability Constants Vols 1–6*. Plenum Press, New York 1974–1989; NIST Standard Reference Database 46 (Critically Selected Stability Constants of Metal Complexes), Version 5.0, 1994
- ⁹⁷ J. Rohovec, M. Kývala, P. Vojtíšek, P. Hermann, I. Lukeš, *Eur. J. Inorg. Chem.* 2000, 195–203
- ⁹⁸ K. Bazakas, I. Lukeš, *J. Chem. Soc. Dalton. Trans.* 1995, 1133–1137
- ⁹⁹ I. Lázár, A. D. Sherry, R. Ramasamy, E. Brücher, R. Király, *Inorg. Chem.* 1991, 30, 5016–5019
- ¹⁰⁰ M. Försterová, I. Svobodová, P. Lubal, P. Táborský, J. Kotek, P. Hermann, I. Lukeš, *Dalton Trans.* 2007, 535–549
- ¹⁰¹ X. Sun, M. Wuest, Z. Kovacs, A. D. Sherry, R. Motekaitis, Z. Wang, A. E. Martell, M. J. Welch, C. J. Anderson, *J. Biol. Inorg. Chem.* 2003, 8, 217–225
- ¹⁰² W. P. Cacheris, S. K. Nickle, A. D. Sherry, *Inorg. Chem.* 1987, 26, 958–960
- ¹⁰³ S. Chaves, R. Delgado, J. J. R. Fausto da Silva, *Talanta* 1992, 39, 249–254
- ¹⁰⁴ A. D. Sherry, J. Ren, J. Huskens, E. Brücher, É. Tóth, C. F. C. G. Geraldés, M. M. C. A. Castro, W. P. Cacheris, *Inorg. Chem.* 1996, 35, 4604–4612
- ¹⁰⁵ I. M. Kabachnik, T. Y. Medved, F. I. Belskii, S. A. Pisareva, *Izv. Akad. Nauk Ser. Khim.* 1984, 4, 844–849

-
- ¹⁰⁶ F. K. Kálmán, Z. Baranyai, I. Tóth, I. Bányai, R. Király, E. Brücher, S. Aime, X. Sun, A. D. Sherry, Z. Kovács, *Inorg. Chem.* 2008, 47, 3851-3862
- ¹⁰⁷ I. Lázár, A. D. Sherry, R. Ramasamy, E. Brücher, R. Király, *Inorg. Chem.* 1991, 30, 5016-5019
- ¹⁰⁸ L. Burai, R. Király, I. Lázár, E. Brücher, *Eur. J. Inorg. Chem.* 2001, 813-820; P. Táborský, P. Lubal, J. Havel, J. Kotek, P. Hermann, I. Lukeš, *Collect. Czech. Chem. Commun.* 2005, 70, 1909-1942; M. Försterová, I. Svobodová, P. Lubal, P. Táborský, J. Kotek, P. Hermann, I. Lukeš, *Dalton Trans.* 2007, 535-549; P. Táborský, I. Svobodová, P. Lubal, Z. Hnatejko, S. Lis, P. Hermann, *Polyhedron* 2007, 26, 4119-4130; Z. Piskula, I. Svobodová, P. Lubal, S. Lis, Z. Hnatejko, P. Hermann, *Inorg. Chim. Acta* 2007, 360, 3748-3755.; M. Försterová, Z. Jandurová, F. Marques, L. Gano, P. Lubal, J. Vaněk, P. Hermann, I. Santos, *J. Inorg. Biochem.* 2008, 102, 1531-1540; F. K. Kálmán, Z. Baranyai, I. Tóth, I. Bányai, R. Király, E. Brücher, S. Aime, X. Sun, A. D. Sherry, Z. Kovács, *Inorg. Chem.* 2008, 47, 3851-3862; I. Svobodová, Z. Piskula, P. Lubal, S. Lis, P. Hermann, *J. Alloys Comp.* 2008, 451, 42-45; M. P. Campello, M. Balbina, I. Santos, P. Lubal, R. Ševčík, R. Ševčíková, *Helv. Chim. Acta* 2009, 92, 2398-2413; M. P. C. Campello, S. Lacerda, I. C. Santos, G. A. Pereira, C. F. G. C. Geraldes, J. Kotek, P. Hermann, J. Vaněk, P. Lubal, V. Kubíček, E. Tóth, I. Santos, *Chem.-Eur. J.* 2010, 16, 8446-8465; L. M. P. Lima, R. Delgado, P. Hermann, R. Ševčík, P. Lubal, H. F. Carvalho, A. F. Martins, É. Tóth, C. F. G. C. Geraldes, *Eur. J. Inorg. Chem.* 2012, 2548-2559; M. Polášek, P. Caravan, *Inorg. Chem.* 2013, 52, 4084-4096
- ¹⁰⁹ R. Ševčík, J. Vaněk, R. Michalicová, P. Lubal, P. Hermann, I. C. Santos, I. Santos, M. P. C. Campello, *Dalton Trans.* 2016, 45, 12723-12733
- ¹¹⁰ R. Ševčík, J. Vaněk, P. Lubal, Z. Kotková, J. Kotek, P. Hermann, *Polyhedron* 2014, 67, 449-455
- ¹¹¹ R. Ševčík, P. Lubal, *Chem. Listy* 2009, 103, 203-206
- ¹¹² P. Lubal, M. Kývala, P. Hermann, J. Holubová, J. Rohovec, J. Havel, I. Lukeš, *Polyhedron* 2001, 20, 47-55; R. Ševčík, J. Vaněk, P. Lubal, Z. Kotková, J. Kotek, P. Hermann, *Polyhedron* 2014, 67, 449-455
- ¹¹³ L. M. P. Lima, C. V. Esteves, R. Delgado, P. Hermann, J. Kotek, R. Ševčíková, P. Lubal, *Eur. J. Inorg. Chem.* 2012, 2533 - 2547; I. Voráčová, J. Vaněk, J. Pasulka, Z. Střelcová, P. Lubal, P. Hermann, *Polyhedron* 2013, 61, 99-104; R. Ševčík, J. Vaněk, R.

Michalicová, P. Lubal, P. Hermann, I. C. Santos, I. Santos, M. P. C. Campello, Dalton Trans. 2016, 45, 12723–12733

¹¹⁴ T. Kimura, Y. Kato, J. Alloys Compd. 1998, 275–277, 806–810

¹¹⁵ S. L. Wu, W. D. Horrocks, Inorg. Chem. 1995, 34, 3724–3732

¹¹⁶ Z. Kotková, G. A. Pereira, K. Djanashvili, J. Kotek, J. Rudovský, P. Hermann, L. Vander Elst, R. N. Muller, C. F. G. C. Geraldés, I. Lukeš, J. A. Peters, Eur. J. Inorg. Chem. 2009, 119–136

¹¹⁷ É. Tóth, E. Brücher, I. Lázár, I. Tóth, Inorg. Chem. 1994, 33, 4070–4076

¹¹⁸ M. Pniok, V. Kubíček, J. Havlíčková, J. Kotek, A. Sabatie-Gogová, J. Plutnar, S. Huclier-Markai, P. Hermann, Chem. Eur. J. 2014, 20, 7944–7955

¹¹⁹ I. Lukeš, J. Kotek, P. Vojtíšek, P. Hermann, Coord. Chem. Rev. 2001, 217–218, 287–312

¹²⁰ A. E. Martell, R. M. Smith, Critical Stability Constants, Plenum Press, New York, 1974–1989, vol. 1–6; NIST Standard Reference Database 46 (Critically Selected Stability Constants of Metal Complexes), version 5.0, 1994

¹²¹ Chang C. A., Liu Y.-L. J. Chin. Chem. Soc. 2000, 47, 1001–1006

PODĚKOVÁNÍ

Děkuji svému školiteli za jeho neskonalou trpělivost.

PROHLÁŠENÍ O PODÍLU AUTORKY NA PRÁCI

Autorka prohlašuje, že její podíl na výzkumu popsáném v rámci publikací shrnutých v této dizertační práci byl následující:

S. Procházková, J. Hraníček, V. Kubíček, P. Hermann *“Formation kinetics of europium(III) complexes of DOTA and its bis(phosphonate) bearing analogues“*; *Polyhedron* **2016**, *111*, 143–149.

Autorka provedla veškerá měření a zpracování dat.

S. Procházková, V. Kubíček, Z. Böhmová, K. Holá, J. Kotek, P. Hermann *“DOTA analogue with phosphinate-iminodiacetate pendant arm: modification of complex formation rate with a strongly chelating pendant“*; *Dalton Trans.*, **2017**, *46*, 10484–10497.

Syntéza ligandu a předběžná kinetická měření byla dříve provedena K. Holou v rámci její bakalářské práce. Autorka opakovaně reprodukovala syntézu ligandu, provedla a vyhodnotila kompletní kinetická a spektrální měření a spolupracovala se Z. Böhmovou na potenciometrických měřeních a vyhodnocení získaných dat. RTG difrakční měření bylo provedeno I. Císařovou a struktury vypřesněny J. Kotkem.

S. Procházková, V. Kubíček, J. Kotek, A. Vágner, J. Notni, P. Hermann *“Lanthanide(III) complexes of monophosphinate/monophosphonate DOTA-analogues: effect of the substituents on formation rate and radiolabelling yield“*; *Dalton Trans.* **2018**, *47*, 13006–13015.

Autorka provedla syntézu některých ligandů, provedla a vyhodnotila kompletní kinetická, spektrální a potenciometrická měření. RTG difrakční měření bylo provedeno I. Císařovou a struktury vypřesněny J. Kotkem. Radiochemické experimenty byly provedeny na Technické univerzitě Mnichov A. Vágnerem a J. Notnim.

Autorka aktivně spolupracovala se školitelem na přípravě jednotlivých publikací.

PŘÍLOHY

S. Procházková, J. Hraníček, V. Kubíček, P. Hermann *“Formation kinetics of europium(III) complexes of DOTA and its bis(phosphonate) bearing analogues“*; *Polyhedron* **2016**, *111*, 143–149.

S. Procházková, V. Kubíček, Z. Böhmová, K. Holá, J. Kotek, P. Hermann *“DOTA analogue with phosphinate-iminodiacetate pendant arm: modification of complex formation rate with a strongly chelating pendant“*; *Dalton Trans.*, **2017**, *46*, 10484–10497.

S. Procházková, V. Kubíček, J. Kotek, A. Vágner, J. Notni, P. Hermann *“Lanthanide(III) complexes of monophosphinate/monophosphonate DOTA-analogues: effect of the substituents on formation rate and radiolabelling yield“*; *Dalton Trans.* **2018**, *47*, 13006–13015.