

Univerzita Karlova  
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Chemie  
Studijní obor: Anorganická chemie



**Bc. Alžběta Hörnerová**

# Bifunkční ligandy na bázi cyklamu pro selektivní komplexaci iontů kovů

Cyclam-based bifunctional ligands for selective metal ion  
complexation

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

Vedoucí práce: prof. RNDr. Jan Kotek, PhD.

Praha, 2022

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

V Praze dne 12. května 2022

.....

Podpis autora

## **Poděkování**

Ráda bych poděkovala svému školiteli za veškeré rady, nápady i častá povzbuzení do další práce a spoustu času, který mi ochotně věnoval. Velký dík mu patří i za vypřesnění krystalových struktur.

Děkuji rovněž RNDr. Ivaně Císařové, CSc. za změření rentgenostrukturních dat a Filipu Kouckému za změření NMR spekter na 600MHz spektrofotometru.

Všem kolegům ze skupiny děkuji za poskytnuté rady, pomoc a přátelskou atmosféru.

V neposlední řadě děkuji své rodině za jejich podporu v průběhu studia, za vychování a za zázemí, které mi po celý život poskytují. Děkuji, mami, díky, tati.

**Abstrakt:** V poslední době rostoucí poptávka po cílených radiofarmakách motivuje výzkum bifunkčních ligandů, které by měly být schopny koordinovat ion radiokovu do stabilního komplexu a také mít dostupné funkční skupiny k navázání na biologický vektor. Zejména široká škála radionuklidů mědi vyvolává zájem kvůli potenciálním aplikacím v diagnostice a terapii nádorových onemocnění. Ligandy na bázi cyklamu jsou jedny z nejvhodnějších pro komplexaci Cu(II). Byl připraven relativně malý počet nesymetricky *trans*-disubstituovaných derivátů z důvodu složité a netriviální syntézy těchto látek. V této diplomové práci je představeno nové ortogonální chránění cyklamu jako možná cesta přípravy těchto látek. Skrze tento meziprodukt byl připraven ligand s methylenfosfonátovým a methylen(*p*-aminobenzyl)fosfinátovým pendantním ramenem, byly připraveny měďnaté komplexy tohoto ligandu a byla studována jejich izomerie, stabilita a inertnost.

**Klíčová slova:** PET, SPECT, radioterapie, měď, bifunkční ligandy, ortogonální chránění cyklamu.

**Abstract:** Recently, the increasing demand for targeting radiopharmaceuticals motivates the research of bifunctional ligands which should be able to coordinate radiometal ion into a stable complex and also contains available functional group for binding to a biological vector. Especially the wide range of copper radionuclides is sparking interest for potential applications in diagnosis and therapy of tumorous diseases. The ligands of the cyclam family are one of the most suitable for Cu(II) complexation. Relatively small number of unsymmetrically *trans*-disubstituted derivatives has been prepared because of difficult and non-trivial synthesis of these compounds. In this Diploma thesis a new orthogonal protection of cyclam is presented as a possible route of preparation of these compounds. Through this intermediate a ligand with methylenephosphonate and methylene(*p*-aminobenzyl)phosphinate pendant arms was synthesized, copper complexes of the ligand were prepared and their isomerism and stability/inertness were studied.

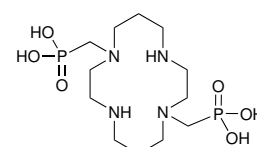
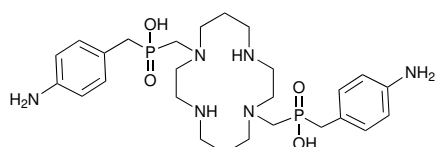
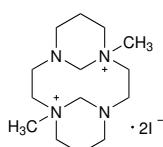
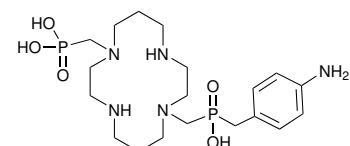
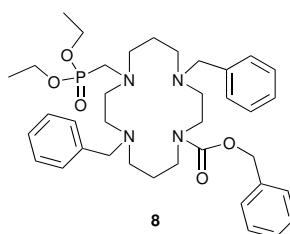
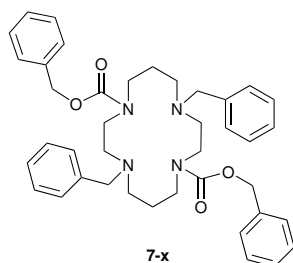
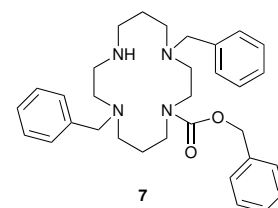
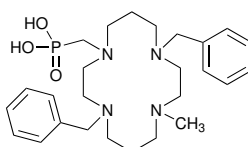
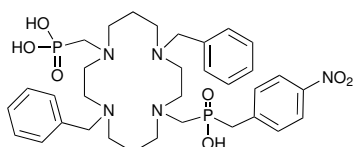
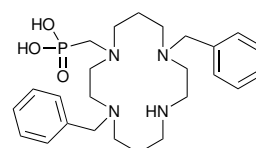
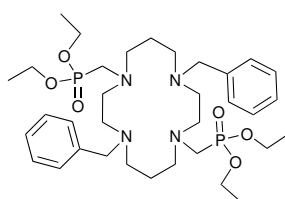
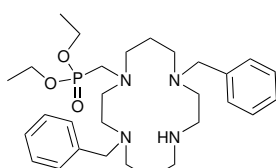
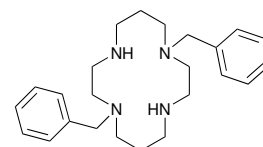
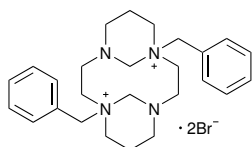
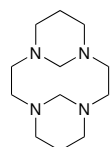
**Keywords:** PET, SPECT, radiotherapy, copper, bifunctional ligands, orthogonal protection of cyclam.

# Obsah

<b>Přehled látek</b>	<b>3</b>
<b>1 Teoretické pozadí práce</b>	<b>4</b>
1.1 Úvod . . . . .	4
1.2 Využití kovů v medicínských zobrazovacích metodách . . . . .	4
1.2.1 Základní principy radiochem. zobrazovacích metod . . . . .	4
1.2.2 Toxicita kovů a potřeba ligandů . . . . .	5
1.2.3 Radioizotopy mědi . . . . .	6
1.3 Makrocyclické ligandy . . . . .	7
1.3.1 Ligandy na bázi cyklamů . . . . .	8
1.3.2 Konjugace bifunkčních ligandů . . . . .	14
1.4 Možnosti derivatizace cyklamů . . . . .	15
1.4.1 Přímá funkcionalizace . . . . .	15
1.4.2 Cyklizace <i>N</i> -substituovaných prekurzorů . . . . .	16
1.4.3 <i>N</i> -substituce chráněných makrocycklů . . . . .	17
1.4.4 Orthogonální chránění cyklamů . . . . .	19
<b>2 Cíle práce</b>	<b>21</b>
<b>3 Experimentální část</b>	<b>22</b>
3.1 Obecné poznámky . . . . .	22
3.2 Syntetická část . . . . .	24
3.2.1 Příprava makrocyclických prekurzorů . . . . .	24
3.2.2 Příprava látky <b>5</b> – syntetická cesta A . . . . .	24
3.2.3 Příprava látky <b>5</b> – syntetická cesta B . . . . .	27
3.2.4 Zavedení <i>p</i> -nitrobenzylfosfinátové skupiny . . . . .	31
3.2.5 Odchránění benzylových skupin a redukce nitroskupiny . . . . .	32
3.2.6 Příprava měďnatých komplexů . . . . .	33
3.3 UV-Vis spektroskopie . . . . .	34
3.4 Rentgenostrukturní analýza . . . . .	35

<b>4</b>	<b>Výsledky a diskuze</b>	<b>37</b>
4.1	Syntéza cílového ligandu . . . . .	37
4.1.1	Příprava ((4,11-dibenzyl-1,4,8,11-tetraazacyklotetra-dekan-1-yl)methyl)fosfonové kyseliny, <b>5</b> . . . . .	37
4.1.2	Zavedení druhé pendantní skupiny a odchránění . . . . .	44
4.2	Mědnaté komplexy . . . . .	47
4.3	Disociační kinetiky . . . . .	50
	<b>Závěr</b>	<b>54</b>
	<b>Seznam použitých zkratk</b>	<b>55</b>
	<b>Seznam použité literatury</b>	<b>57</b>

# Přehled látek



# 1. Teoretické pozadí práce

## 1.1 Úvod

Moderní doba přináší mnoho tzv. civilizačních chorob, mezi něž se řadí obezita, kardiovaskulární onemocnění, cukrovka, ale i rakovina. Cíleně léčit a včasné diagnostikovat nádorová onemocnění a jejich případná druhotná ložiska (metastáze) je již mnoho let snahou lékařů a vědců. Tento společný cíl spojuje mnoho výzkumníků z různých oborů a vybízí k interdisciplinární spolupráci.

Jednou ze zkoumaných oblastí je využití komplexů makrocyclických ligandů. Diagnosticky lze využít jejich komplexy s paramagnetickými ionty kovů jako kontrastní látky pro zobrazování pomocí magnetické rezonance (MRI). Komplexy radionuklidů pak nachází uplatnění při zobrazování pomocí pozitronové emisní tomografie (PET) a jednofotonové emisní tomografie (SPECT). Potenciálně je lze také využít k léčbě nádorů radioterapií (terapie využívající radionuklidy).

## 1.2 Využití kovů v medicínských zobrazovacích metodách

V mediální chemii a potažmo v medicíně jsou již delší dobu využívány zajímavé vlastnosti iontů kovů. Může se jednat např. o paramagnetické vlastnosti využívané pro ovlivňování relaxačních časů v MRI nebo radioaktivní přeměny některých nuklidů – emise  $\beta^+$  částic využívá metoda PET,  $\gamma$  fotonů metoda SPECT. Radionuklidy s přeměnami  $\alpha$  a  $\beta^-$  jsou zase vhodnými adepty na terapeutické využití.

### 1.2.1 Základní principy radiochem. zobrazovacích metod PET

Pozitronová emisní tomografie využívá emitovaných pozitronů, které vzápětí anihilují za vzniku dvou fotonů o energii 511 keV. Tyto fotony se od místa anihilace šíří po koincidenční přímce na opačné strany, ve stejný čas jsou detekovány

pomocí kruhového detektoru a zpětnou projekcí je rekonstruován obraz.

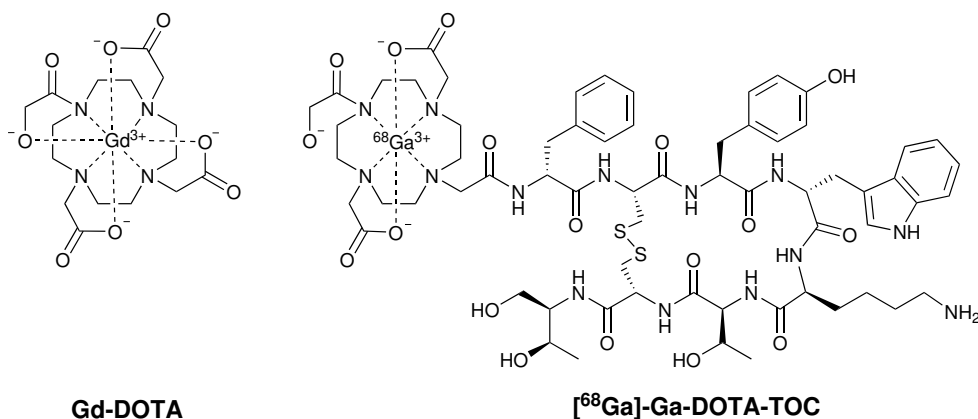
## SPECT

Metoda SPECT je založená na detekci  $\gamma$ -fotonů scintilačním detektorem pohybujícím se okolo pacienta. Ze snímků pořízených pod různými úhly lze následně rekonstruovat trojrozměrný obraz distribuce radiofarmaka.

### 1.2.2 Toxicita kovů a potřeba ligandů

V mnohých případech je samotný ion kovu vhodný pro medicínské zobrazování vysoce toxický anebo se jedná o radioizotop (jenž chceme cíleně zavést do místa nemoci), a proto jej nelze použít v podobě volného iontu. Výhodným řešením může být komplexace iontu do stabilního komplexu, který by v těle pacienta nepodléhal nežádoucím přeměnám (disociaci, hydrolyze, transchelataci, transmetalaci), pokud možno selektivně interagoval s vybranými tělními strukturami (např. nádorovou tkání) a nakonec byl efektivně vyloučen z těla bez vedlejších účinků.

Jedním z nejznámějších příkladů je trojmocný ion gadolinia ( $\text{GdCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$  má  $\text{LD}_{50}$  cca 100–200 mg/kg), [1] jehož komplexy jsou v dnešní době běžně využívány jako kontrastní látky v MRI, např. komplex s ligandem DOTA (Dotarem<sup>®</sup>, Obr. 1.1).



Obrázek 1.1: Příklady komplexů využívaných pro zobrazování pomocí MRI (Gd-DOTA) a PET (<sup>68</sup>Ga]-Ga-DOTA-TOC).

Další příkladem může být <sup>68</sup>Ga-DOTA komplex navázaný na somatostatinový analog octreotid (SomaKit TOC<sup>®</sup>, Obr. 1.1) schválený v roce 2016 v Evropě

(v roce 2019 v USA) pro zobrazování pomocí PET, který by potenciálně mohl být v budoucnu použit pro terapii neuroendokrinních nádorů, které se vyznačují nadměrnou expresí somatostatinových receptorů.[2, 3]

### 1.2.3 Radioizotopy mědi

V posledních letech stále větší zájem vzbuzují stále dostupnější radionuklidy různých kovů. Z nich je věnována velká pozornost např. mědi, jejíž radioizotopy nabízí širokou plejádu poločasů, druhů a energií přeměn (Tab. 1.1) a mohly by tak být využity jak v PET a SPECT, tak i v radioterapii. Ani v tomto případě však nelze využít přímo mědnaté ionty (přestože měď je biogenním prvkem a jako kofaktor některých enzymů je zapojena do důležitých biochemických procesů), ale je nutné je použít vázané v komplexu a omezit tak nespecifické ukládání radionuklidů v tkáních.[4]

Tabulka 1.1: Fyzikální vlastnosti vybraných radionuklidů mědi.[5]

radionuklid	$t_{1/2}$ (h)	přeměna (%)	zdroj
$^{60}\text{Cu}$	0,38	$\beta^+$ (93), EZ (7)	cyklotron
$^{61}\text{Cu}$	3,3	$\beta^+$ (62), EZ (38)	cyklotron
$^{62}\text{Cu}$	0,16	$\beta^+$ (98), EZ (2)	generátor, cyklotron
$^{64}\text{Cu}$	12,7	$\beta^+$ (19), EZ (41), $\beta^-$ (40)	reaktor, cyklotron
$^{66}\text{Cu}$	0,09	$\beta^-$ (100)	reaktor, cyklotron
$^{67}\text{Cu}$	62	$\beta^-$ (100)	reaktor, cyklotron

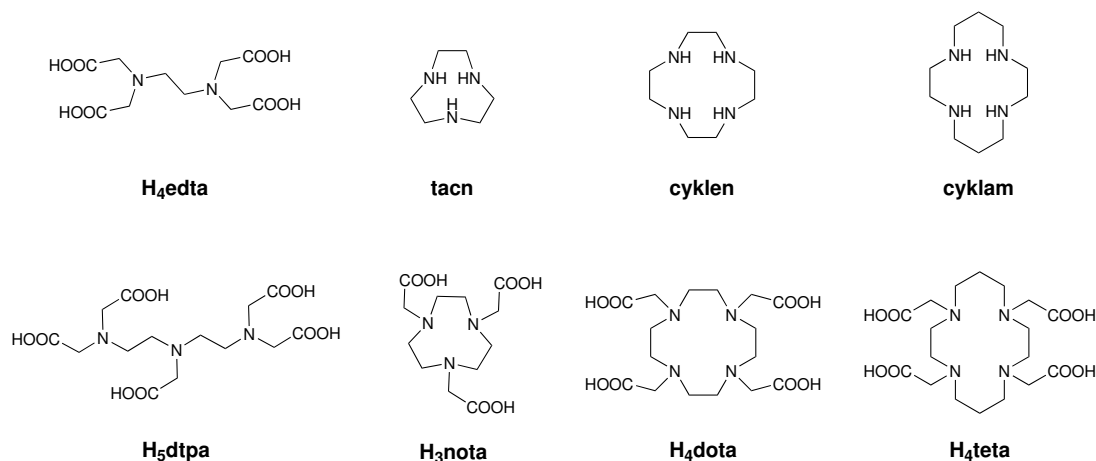
Produkce radionuklidů mědi většinou vyžaduje ozařování vhodného mateřského nuklidu (nejčastěji Zn nebo Ni) protony nebo deuterony v cyklotronu. Poté je potřeba separovat radionuklidy mědi od velkého nadbytku mateřského nuklidu, avšak výsledný roztok radioizotopu mědi může i tak stále obsahovat malé množství výchozího nuklidu (je třeba si uvědomit, že látkové množství připraveného radionuklidu je extrémně malé, a tak i stopové zbytky mateřského nuklidu jsou významnou nečistotou). Ligandy pro komplexaci mědi by tedy měly být velmi selektivní pro Cu(II) oproti Ni(II) a Zn(II), ať už z termodynamického nebo kinetického hlediska.

Dobře známá koordinační chemie, rychlé komplexační reakce, vhodné poločasy přeměn a vysoká specifická aktivita činí měď velmi atraktivní pro medicín-

ské aplikace, což motivuje výzkum k syntéze nových ligandů. Komplexy musí být termodynamicky stálé a ligandy by měly selektivně koordinovat daný ion (vůči kompetitivním iontům přítomných v těle – hlavně Zn(II), Ca(II) a Mg(II) ionty). Obecně je také přijímáno, že nejdůležitější je kinetická inertnost, která je rozhodující pro stabilitu *in vivo*. [6] Dalším požadavkem je rychlá komplexace vzhledem ke krátkým poločasům přeměny radioizotopů.

### 1.3 Makrocyclické ligandy

Nejprve byly jako potenciální chelátory zkoumány dobře známé acyklické ( $H_4$ edta,  $H_5$ dtpa) nebo makrocyclické ligandy jako tacn, cyklen, cyklam,  $H_3$ nota,  $H_4$ dota a  $H_4$ teta (Obr. 1.2). Avšak mědnaté komplexy těchto prvotních ligandů nejsou optimální, hlavně kvůli rychlosti vzniku (příliš pomalá pro většinu makrocyclických ligandů), kinetické inertnosti (příliš nízká pro komplexy acyklických ligandů a ligandů s příliš mnoha donorovými atomy) a malé odolnosti vůči redukci na jednomocnou měď (mědné komplexy jsou obecně labilnější, hlavně kvůli malému náboji kovového iontu a nulové stabilizaci ligandovým polem). [4]



Obrázek 1.2: Ligandy zmíněné v textu.

V dnešní době jsou jako potenciální ligandy pro ionty přechodných kovů a lanthanoidů intenzivně zkoumány hlavně polyazamakrocycly (makrocycly obsahující několik dusíkových atomů) s koordinujícími pendantními rameny. Atraktivní jsou tím, že tvoří termodynamicky stabilní a kineticky inertní komplexy, vykazují vysokou selektivitu pro ionty kovů a vhodně zvolenými pendantními rameny na

makrocyklu lze ovlivnit (zvýšit) rychlost komplexace. Vzhledem k relativně krátkým poločasům přeměny některých radioizotopů je jedním z největších problémů makrocyclických ligandů pomalá komplexace.

Mezi takovéto ligandy patří v posledních letech zkoumané deriváty  $H_3$ nota, jejichž komplexy se tvoří rychle za mírných podmínek a jsou stabilní *in vivo*. [7] Nicméně jsou to převážně deriváty cyklamů, které poskytují nejlepší selektivitu pro dvojmocnou měď oproti  $Zn(II)$  a  $Ni(II)$ , tedy iontům, které jsou běžnými nečistotami v roztocích radiomědi. Z tohoto důvodu jsou studovány deriváty cyklamů s jedním nebo dvěma koordinujícími pendantními rameny (v těchto případech je naplněn požadavek – pro dvojmocnou měď optimálního – koordinačního čísla 5 nebo 6). [4, 8, 9]

### 1.3.1 Ligandy na bázi cyklamů

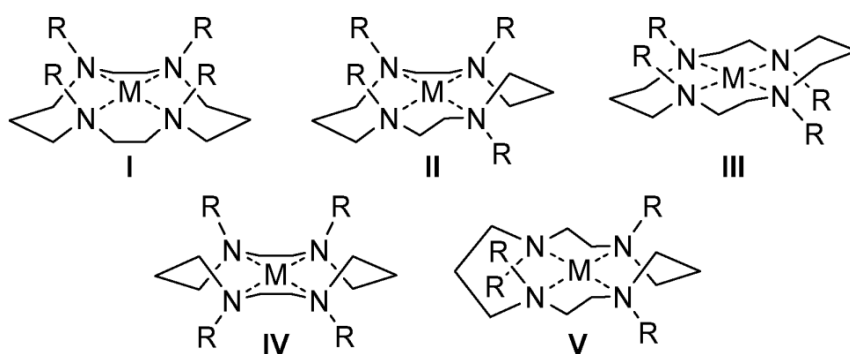
Ligandy na bázi cyklamů, jako např.  $H_4$ teta, jsou vhodné pro ionty přechodných kovů, protože větší cyklus (oproti cyklu nebo taen) umožňuje planární koordinaci všech dusíkových atomů. [8, 10] Již bylo připraveno mnoho derivátů cyklamů, přičemž bylo pozorováno, že počet a povaha pendantních ramen ovlivňuje nejen selektivitu ligandu, ale také rychlost komplexace a kinetickou inertnost výsledného komplexu. [11, 12]

Z kinetického hlediska vykazují nejrychlejší komplexaci při pH relevantním pro biochemické studie ligandy se slabě koordinující postranní skupinou. Komplexace pravděpodobně probíhá přes tvorbu „out-of-cage“ komplexu, kde je ion kovu koordinován pouze pendantním ramenem bez zapojení makrocyklu. Stabilita „out-of-cage“ komplexu je klíčová pro další přeuspořádání a tvorbu „in-cage“ komplexu, tj. koordinaci makrocyclické části. [9] Inertnost výsledného komplexu závisí také na bazicitě donorových atomů makrocyklu, která společně s možností protonace pendantních ramen a tvorbou silných intramolekulárních vodíkových vazeb hraje důležitou roli v mechanismu kyselě katalyzované disociace. [9]

Cyklamové komplexy mnohdy tvoří komplikované směsi izomerů kvůli různým možným konformacím makrocyclického kruhu a vzájemné orientaci pendantních ramen a vodíkových atomů N–H skupin vzhledem k rovině makrocyklu. [8, 13]

## Konfigurace cyklamového skeletu v komplexech

Cyklamový skelet je poměrně flexibilní, a proto cyklam a jeho deriváty po koordinaci mohou zaujmout jakoukoli z pěti konfigurací znázorněných na Obr. 1.3 (konformace jsou označovány I až V).[14] Každý ze čtyř atomů dusíku koordinovaných na kov je chirální a liší se prostorovým uspořádáním N–H vazby (popř. pendantů).[8] Centrální ion Cu(II) je v některých těchto izomerech pentakoordinován, v jiných konformacích může být hexakoordinován (oktaedrická koordinační sféra s *cis* i *trans* geometrií).[9]



Obrázek 1.3: Možné konformace makrocyklu v komplexech derivátů cyklamu.[9]

Bosnich et al.[13] učinil semikvantitativní odhady relativních energií pnutí („strain energy“) pro izomery kobaltitého komplexu cyklamu, které naznačují, že v oktaedrické koordinační sféře je nejstabilnější konfigurace *trans*-III. Výpočty molekulární mechanikou (Connolly et al. pro Ni(II)-cyklam)[15] ukázaly, že *trans*-I konfigurace se stává stabilnější vůči konfiguraci *trans*-III při přechodu od oktaedrických komplexů ke čtvercově pyramidálním a trigonálně bipyramidálním komplexům. Tyto závěry korespondují s výsledky analýzy všech nikelnatých komplexů s cyklamovým skeletem (tj. všech, jejichž rentgenová struktura byla v době vzniku této analýzy – 1999 – uložena v Cambridge Structural Database, CSD), kterou provedli Donnelly a Zimmer a zhodnotili, že nejčastější konfigurací je nejstabilnější konfigurace, kterou je *trans*-III (Tab. 1.2).[14] Ke stejným závěrům došli i Bakaj et. al., kteří hodnotili dostupné struktury měďnatých komplexů s cyklamovým skeletem.[16] Většina oktaedrických komplexů preferuje konfiguraci *trans*-III, a čtvercově pyramidální a trigonálně bipyramidální molekuly preferují *trans*-I konfiguraci (Tab. 1.2).

Tabulka 1.2: Zastoupení konfigurací 139 Ni(II) a 89 Cu(II) komplexů s cyklamovým skeletem na základě dat z CSD.[14, 16]

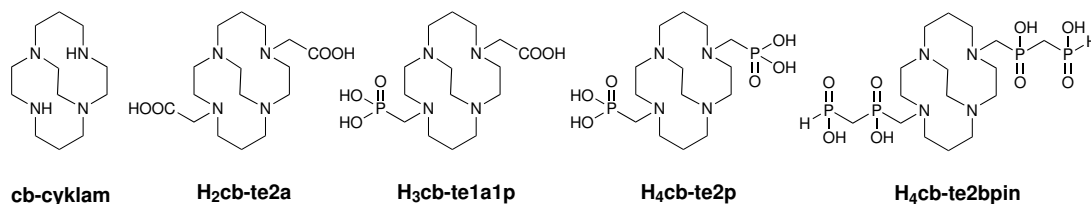
konfigurace	celkem (%)		oktaedr. (%)		čtv. pl. (%)		čtv. pyr. (%)		trig. bipy. (%)	
	Ni	Cu	Ni	Cu	Ni	Cu	Ni	Cu	Ni	Cu
celkem			54,7	44,6	40,0	20,7	2,67	24,9	0,7	10,9
<i>trans</i> -I	20,3	20,7	9,3	4,9	29,3	10,5	75,0	50,0	100,0	40,0
<i>trans</i> -II	0,0	1,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	4,5	0,0	0,0
<i>trans</i> -III	57,2	68,5	52,0	90,2	67,2	89,5	25,0	40,9	0,0	0,0
<i>trans</i> -V	1,5	0,0	0,0	0,0	3,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>cis</i> -V	21,0	8,7	38,7	0,0	0,0	0,0	0,0	4,5	0,0	60,0

Komplexace je ovlivněna nejenom povahou pendantu, ale také schopností měnit konformační uspořádání makrocyklu, což je relativně snadné v případě, že v cyklamovém skeletu jsou nějaké nesubstituované N–H skupiny.[4, 17] Takováto bohatá stereoizomerie komplikuje hodnocení dat, a tak vlastnosti jednotlivých pendantů nemohou být jednoduše porovnány. Avšak znalost, jak koordinující pendant ovlivňuje vlastnosti ligandu/komplexu, je důležitá pro design ligandů. Například je známo, že úplná substituce všech dusíkových atomů cyklamů pendantními skupinami vede k upřednostňování konformace I a absence sekundárních aminoskupin v pentakoordinovaných Cu(II) komplexech zabraňuje přeuspořádání.[18]

### Cross-bridged cyklamy

Cyklamy přemostěné ethylenovými můstky (cross-bridged cyklamy, Obr. 1.4) jsou přirozeně dalšími deriváty, které jsou studovány, protože rigidita cyklu a preorganizace ligandu je předurčuje k tvorbě kineticky inertních komplexů. Měďnatý ion přítomný v komplexech cross-bridged cyklamů se dvěma acetáty (H<sub>2</sub>cb-te2a, Obr. 1.4) nebo acetamidovými pendanty je zcela „zabalený“ v kavitě ligandu.[19] Struktura těchto ligandů zapříčiňuje vznik komplexů v konformaci *cis*-V.[19] Komplexy vykazují vysokou stabilitu, jak *in vitro*, tak *in vivo*, ale rychlost komplexace je velmi pomalá [20] anebo vznik komplexu vyžaduje velmi drsné podmínky nevhodné pro radiomedicínské aplikace (zde se obvykle používají ligandy navázané na biologicky aktivní molekulu, nejčastěji peptidy, tudíž nelze použít např. zvýšení teploty apod., viz 1.3.2). Nahrazením acetátových skupin za methyl-

fosfonátové pendanty ( $H_3cb-te1a1p$  a  $H_4cb-te2p$ , Obr. 1.4) se podařilo připravit ligandy, které komplexují  $^{64}Cu(II)$  rozumnou rychlostí při laboratorní teplotě.[21]



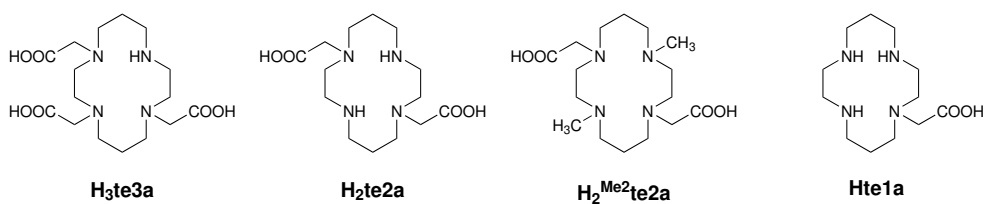
Obrázek 1.4: Deriváty cross-bridged cyklamu zmíněné v textu.

Nedávno bylo při porovnání cross-bridged derivátů  $H_4cb-te2p$  a  $H_4cb-te2bpin$  [22] s jejich cyklamovými analogy  $H_4te2p$  a  $H_4te2bpin$  (Obr. 1.6) zjištěno, že termodynamická stabilita komplexů cross-bridged derivátů je nižší než nepřemostěných analogů, přestože  $H_4cb-te2p$  a  $H_4cb-te2bpin$  vykazují vysokou bazicitu makrocyklu. Autoři se domnívají, že tato nižší stabilita je způsobena geometrií kavity cross-bridged cyklamu, která neumožňuje ekvatoriální koordinaci všech čtyř dusíkových atomů. Rovněž rychlost komplexace je menší než u nepřemostěných derivátů, ačkoli v rámci přemostěných derivátů cyklamu je můžeme zařadit mezi nejrychleji komplexující ligandy. Komplexy všech zmíněných cross-bridged derivátů však vykazují extrémní kinetickou inertnost.[22]

### Ligandy s acetátovými pendantními rameny

Mezi první a nejvíce prozkoumané cyklamové ligandy patří  $H_4teta$  (Obr. 1.2) a příbuzné deriváty s nižším počtem pendantních skupin (Obr. 1.5), tedy cyklamy s karboxymethylovými (běžně označovanými jako „acetátovými“) pendanty. Jak už bylo výše zmíněno, pendantní ramena ovlivňují vlastnosti ligandu i výsledného komplexu. Ladění těchto vlastností bylo studováno právě na prototypových ligandech  $H_3nota$ ,  $H_4dota$  a  $H_4teta$  a jejich analogiích substituovaných různými pendantními rameny s odlišnými koordinujícími skupinami (hydroxo, amin, thio, pyridin, fenoláto, fosfináto/fosfonáto atd.).[11, 12, 23]

Měďnatý ion tvoří stabilnější komplexy s  $H_4teta$  než s  $H_4dota$ . [24] Avšak  $H_4teta$  a  $H_4dota$  jako oktadentátní ligandy nevyužívají všechny donorové atomy pro koordinaci centrálního kovu v jednojaderných komplexech, což může vést k labilitě *in vivo*. [18] Nekoordinovaná pendantní ramena totiž mohou komple-



Obrázek 1.5: Deriváty cyklamu s acetátovými pendanty.

xovat ionty přítomné v těle za vzniku dinukleárních komplexů a následně může docházet k transmetalaci.

Ve snaze nalézt hexadentátní ligandy vhodné pro koordinaci iontů první přechodné řady kovů byly připraveny 1,8-diacetátové deriváty cyklamu  $\text{H}_2^{\text{Me}2}\text{te2a}$  a  $\text{H}_2\text{te2a}$  (Obr. 1.5).[23] Ligandy tvoří předpokládané oktaedrické komplexy s ionty kovů, avšak acetátový ligand  $\text{H}_2\text{te2a}$  se sekundárními aminovými skupinami není stabilní ve vodných roztocích a snadno se tvoří tricyklický laktam.[25]

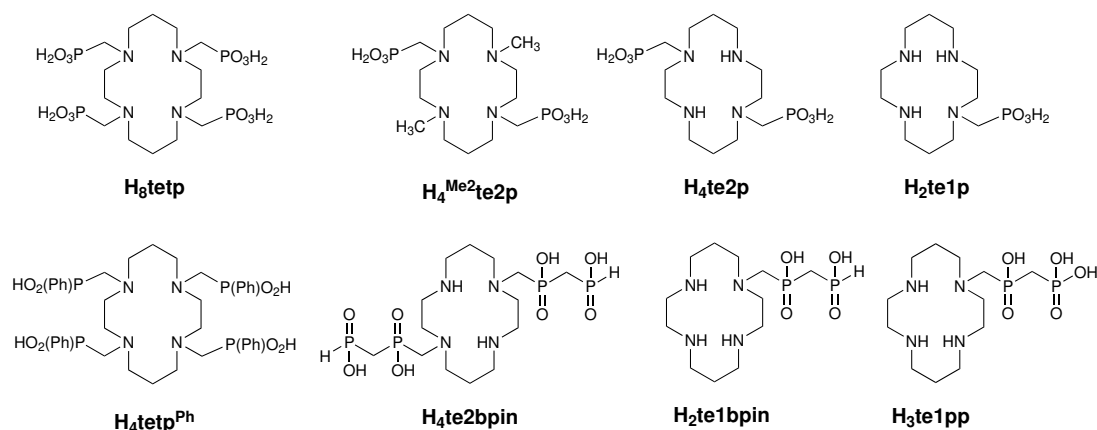
### Ligandy s pendantními rameny obsahujícími fosfor

Nahrazením acetátových pendantů za methylenfosfonátové nebo fosfinátové skupiny se mění komplexační vlastnosti ligandů. Bazicitu makrocyklu je ovlivněna pendantní skupinou a roste v řadě fosfinát < karboxylát < fosfonát.[26] Termodynamická stabilita Cu(II) komplexů v roztoku je ovlivněna hlavně bazicitou aminových skupin a konstanty stability mají podobný trend.

Byly připraveny různé methylenfosfonátové ( $-\text{CH}_2-\text{PO}_3\text{H}_2$ ) deriváty cyklamu (Obr. 1.6). Tyto ligandy, stejně jako jiné aminoalkylfosfonátové deriváty, jsou vysoce bazické.[27] Lze tak předpokládat vysoké hodnoty konstant stability a vysokou kinetickou inertnost vyplývající z koordinace všech donorových atomů ligandu. Rovněž v případě použití fosfonátových skupin nehrozí tvorba laktamových kruhů jako u derivátů s acetátovými pendanty.

V případě methylenfosfinátových ( $-\text{CH}_2-\text{P}(\text{R})\text{O}_2\text{H}$ ) derivátů lze různými  $-\text{R}$  skupinami ovlivnit selektivitu pro ionty [17, 28] a další vlastnosti makrocyklických sloučenin.[29]

Intenzivně byly studovány komplexy přechodných kovů fosforových analogů  $\text{H}_4\text{dota}$  a  $\text{H}_4\text{teta}$ . U analogů  $\text{H}_8\text{dotp}$  a  $\text{H}_8\text{tetp}$  bylo zjištěno, že tyto dva ligandy obsahují dva velmi bazické dusíkové atomy, nevyznačují se významnou selektivitou (snad kromě měďnatých iontů) a všechny donorové atomy na pendantních



Obrázek 1.6: Deriváty cyklamu s pendanty obsahujícími fosfor.

skupinách nemohou být koordinovány ke stejnému centrálnímu kovu.[30, 31] Před nějakým časem bylo ukázáno, že deriváty cyklamu s methylfosfonátovými pendantními rameny  $H_4te2p$  nebo  $H_2te1p$  (Obr. 1.6) skutečně rychle komplexují dvojmocnou měď.[17, 18, 32] Na základě všeobecně přijímaného předpokladu dvoukrokové tvorby komplexu s makrocyclickými ligandy s pendantními rameny by tato rychlá komplexace mohla být vysvětlena interakcí mezi iontem kovu a pendantní fosfonátovou skupinou mimo kavitu makrocyklu. Pendantní skupiny pak asistují při přechodu iontu kovu z roztoku do kavity ligandu a zároveň usnadňují uvolnění protonu z protonizované aminoskupiny makrocyklu prostřednictvím vodíkových vazeb. Tyto ligandy jsou selektivní pro  $Cu(II)$  a vzniklé komplexy jsou termodynamicky stabilní a kineticky inertní. Nedávno Notni et al. potvrdili tuto hypotézu pro deriváty trap (analoga  $H_3nota$  substituované methylfosfinátovými rameny), které vykazují rychlejší značení pomocí  $^{68}Ga$  díky silné „out-of-cage“ interakci mezi trojmocným galliem a pendantními rameny.[33, 34]

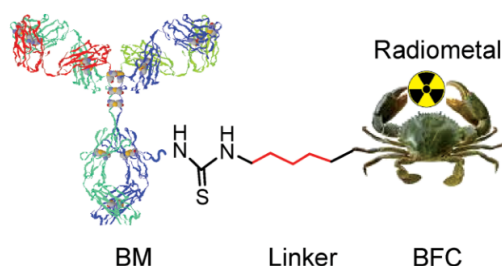
Byl studován vliv methyl(fenyl)fosfinátového pendantního ramena ( $H_4tetp^{Ph}$ , Obr. 1.6) na schopnost makrocyklu komplexovat přechodné kovy.[35, 36] Ukázalo se, že  $Cu(II)$  komplex tohoto ligandu vykazuje vysokou termodynamickou stabilitu, avšak kinetickou labilitu při kyselé katalyzované dekomplexaci.[36]

S cílem ještě více vylepšit efektivitu značení pomocí radioizotopů mědi byly připraveny deriváty cyklamu s geminálními fosforovými skupinami –  $H_2te1bpin$  a  $H_3te1pp$ . Tyto skupiny jsou velmi kyselé, takže se jedná o slabě koordinující skupiny.[4] Zároveň tato vlastnost předpokládá, že by měly být schopny vázat

ion kovu i v silně kyselém prostředí, ale neměly by soupeřit s mnohem lepšími ligandy, jakými jsou makrocycly. Takovéto pendentní rameno připojené na makrocycklus může zachytit velmi malé koncentrace radioizotopů kovů a následně urychlit komplexaci díky optimální stabilitě „out-of-cage“ intermediátu. Tyto deriváty vykazují vysokou bazicitu aminů, vysokou stabilitu komplexů s dvojmocnými ionty přechodných kovů a vysokou selektivitu pro Cu(II). Rychlou tvorbu komplexu autoři přisuzují slabě koordinujícím pendentním ramenům tvořícím „out-of-cage“ komplex, který dále tvoří zřídka pozorovaný „in-cage“ intermediát s konformací II cyklamového cyklu, který potom poskytuje finální izomer I.[4]

### 1.3.2 Konjugace bifunkčních ligandů

Pro radiomedicínské aplikace jsou nejčastěji používány biokonjugáty (Obr. 1.7). Kovový ion je koordinován vhodným bifunkčním ligandem zaručujícím minimální nežádoucí ukládání radioizotopů v těle (výsledek silného vázání kovu) a zároveň umožňujícím konjugaci komplexu s biomolekulou skrze nějakou další reaktivní skupinu. Důvodem, proč je většinou potřeba ion kovu připojit na biologicky aktivní vektor, je snaha o cílené zavedení iontu kovu na určité místo (targeting). Biomolekula slouží jako „nosič“ radionuklidu, resp. komplexu, který specificky dopraví do místa nemoci, pokud tam je vysoká koncentrace vybraných cílových receptorů. Takovým biologickým vektorem mohou být např. malé peptidy, monoklonální protilátky nebo jejich fragmenty.[37]



Obrázek 1.7: Schématicky znázorněná struktura radiofarmaka – radiokov koordinovaný bifunkčním chelátorem (BFC), který je přes linker navázán na biologickou molekulu (BM).[38]

Pro vylepšení farmakokinetiky a *in vivo* distribuce je výhodné navázat bi-

funkční ligand na biologický vektor skrze nějaký linker. Linkerem může být např. jednoduchý uhlovodíkový řetězec (zvýšení lipofility), peptid (zvýšení hydrofility a zlepšení vylučování pomocí ledvin) nebo polyethylenglykol (zpomalení extrakce radiofarmaka hepatocyty).[37]

Konjugáty jsou nejčastěji připravovány kaplinkem karboxylátových nebo aminových skupin pomocí různých kaplovacích činidel za vzniku amidových vazeb.[39] Často se využívá též spojení pomocí kaplinku isothiokyanátů, příp. isokyanátů s aminy za vzniku thiomocoviny, resp. močoviny. Alternativní možností jsou i různé bioorthogonální click reakce jako Cu-katalyzovaná azidová-alkynová cykloadice.[40]

## 1.4 Možnosti derivatizace cyklamů

Byly již popsány různé přístupy k selektivní *N*-funkcionalizaci tetraazamakrocyclů. Naneštěstí žádný z nich není obecný pro přípravu nejrůznějších derivátů. Byly studovány přímá substituce makrocyclu, zavádění funkčních skupin před cyklizací nebo použití sekvence ochrání-funkcionalizace-odchrání.[41] Do úvahy je potřeba vzít mnoho parametrů pro vybrání nejlepší syntetické cesty, včetně povahy výsledné sloučeniny, ale i počet reakčních kroků, celkový výtěžek, škálu reakcí a dostupnost a cenu reaktantů. Některé metody mohou být použity jak pro cyklam, tak pro cyklen nebo i jiný makrocyclus, některé přístupy jsou však velmi specifické jen pro daný makrocyclus.

Syntéza disubstituovaných cyklamů je obtížnější vzhledem k tvorbě několika izomerů. V případě cyklamů existuje jeden *trans* izomer (1,8) a dva *cis* izomery (1,4 a 1,11). Selektivní syntéza těchto izomerů může být provedena různými způsoby. Vzhledem k povaze této práce, která se zabývá syntézou nesymetricky 1,8-disubstituovaných derivátů cyklamů, budou níže popsány převážně možnosti 1,8-derivatizace a přípravy nesymetricky substituovaných cyklamů.

### 1.4.1 Přímá funkcionlizace

Dá se předpokládat, že přímá reakce cyklamů se dvěma ekvivalenty elektrofilu bude poskytovat směs mono-, tri-, tetra- a různé izomery disubstituovaných cyk-

lamů, ze které může být obtížné žádanou sloučeninu izolovat. Přímá disubstituce se tedy může jevit jako nevýhodná cesta přípravy disubstituovaných cyklamů. Avšak v některých specifických případech se může jednat o jednoduchou a účinnou metodu.

Byly popsány detailní podmínky tosylace cyklamu, kdy 1,5 ekv. TsCl v dichlormethanu (DCM) při 5 °C v přítomnosti Et<sub>3</sub>N poskytuje 1,8-ditosylovaný cyklam ve 30% výtěžku a zároveň se tvoří malé množství 1,11-derivátu (3,5 %).[42] Jiná selektivita byla pozorována při zavádění *t*-butyloxykarbonylové (Boc) skupiny.[43] Reakcí cyklamu s 1,8 ekv. di-*tert*-butyl dikarbonátu byl izolován 1,11-di(Boc)cyklam jako majoritní produkt (38,8 %), spolu s třikrát chráněným makrocylem (19,2 %) a *trans*-1,8 derivátem (25,2 %). Izomer 1,4 nebyl detekován a *cis* a *trans* izomery byly odděleny sloupcovou chromatografií.

### 1.4.2 Cyklizace *N*-substituovaných prekurzorů

Substituce dusíkových atomů může být provedena před cyklizací. Takovýto přístup není intuitivní, ale může představovat výhodnou alternativu, protože výchozí prekurzory jsou levnější než drahé makrocycly. K cyklizaci nejčastěji bývají využívány podmínky templátové syntézy cyklamu (Ni(II) templát), avšak tato cesta nelze použít vždy a většina systémů potřebuje vývoj nových cyklizačních podmínek. Barefield et al. studovali cyklizační reakce různých disubstituovaných lineárních tetraaminů (resp. jejich Ni(II) komplexů) pomocí glyoxalu.[44] Např. 1,4-dimethylcyklam byl připraven redukcí diiminového intermediátu a odstraněním nikelnatého iontu (Schéma 1.1). Nikelnaté komplexy 1,4-diethyl- a 1,4-dibenzylcyklamu byly rovněž připraveny, ale demetalace těchto komplexů na volné báze nebyly popsány.

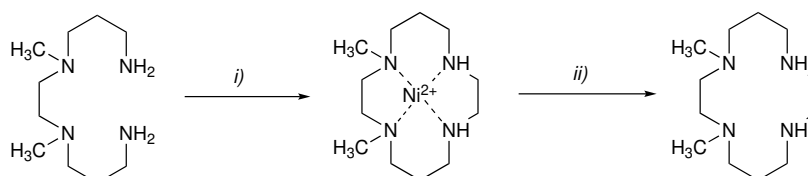


Schéma 1.1: Templátová syntéza 1,4-dimethylcyklamu: *i*) 1. Ni<sup>2+</sup>, 2. (CHO)<sub>2</sub>, 3. NaBH<sub>4</sub>; *ii*) demetalace pomocí CN<sup>-</sup>.

### 1.4.3 *N*-substituce chráněných makrocyklů

Makrocykly disubstituované chránícími skupinami jsou užitečnými intermedii, protože jedna sloučenina může umožnit syntézu různých difunkcionalizovaných ligandů. U cyklamů je mnohem těžší dosáhnout přímé selektivní disubstituce než u cyklenu. Lze např. připravit 1,8-ditosylcyklam zmíněný výše a použít ho jako startovní látku pro syntézu různých cyklamových derivátů.[42] Odstranění tosylových skupin z takovýchto sloučenin však není triviální (drastické podmínky), proto jsou před sulfonamidovými skupinami obecně preferovány karbamáty.

Karbamáty jsou běžně používány při syntéze peptidů k ochraně aminových skupin. Jedná se o stabilní látky, se kterými se snadno pracuje a mnohé z nich – benzyloxykarbonyl (Cbz), *t*-butyloxykarbonyl (Boc) – lze odstranit za mírných podmínek.[45] *Trans*-di(Boc)cyklam lze připravit již zmíněnou přímou reakcí z cyklamů,[43] ale i jinými (víceřadovými) způsoby popsány níže.

Cyklamy obsahující aminationovou skupinu byly použity pro syntézu částečně substituovaných derivátů. Vodný glyoxal reaguje s cyklamem za vzniku tetra-cyklického bisaminalu v 75% výtěžku a methylace s methyljodidem poskytuje vysoce regioselektivní *trans* kvarternizovanou sloučeninu.[46] Reduktivní rozštěpení bis(amoniové) soli poskytuje cross-bridged dimethylcyklam (Schéma 1.2).[47] Stejná reakce lze provést i při použití benzylobromidu místo methyljodidu, kdy následnou debenzylací můžeme připravit cb-cyklam (Schéma 1.2). Jiná reaktivita byla pozorována, když byl tetracyklický bisaminal redukován pomocí diisobutylaluminiumhydridu (DIBAL-H), kdy vzniká side-bridged cyklam (Schéma 1.2).[48] Reakcí kvartérní soli s vodným roztokem NaOH vznikají *trans*-disubstituované cyklamy.[49]

Formaldehydový bisaminal cyklamů, kde aminationové uhlíkové atomy nejsou vzájemně propojeny, je výborným prekurzorem pro syntézu *trans* substituovaných cyklamů. Tato sloučenina je snadno připravitelná reakcí vodného formaldehydu s cyklamem nebo zahříváním cyklamů ve směsi 30% aq. NaOH a DCM.[50, 51] Alkylací této sloučeniny methyljodidem nebo benzylobromidem dostaneme očekávané produkty s kvarterními dusíkovými atomy (Schéma 1.3).[50] V posledním kroku mohou být selektivně získány buď *trans* disubstituované nebo tetrasubsti-

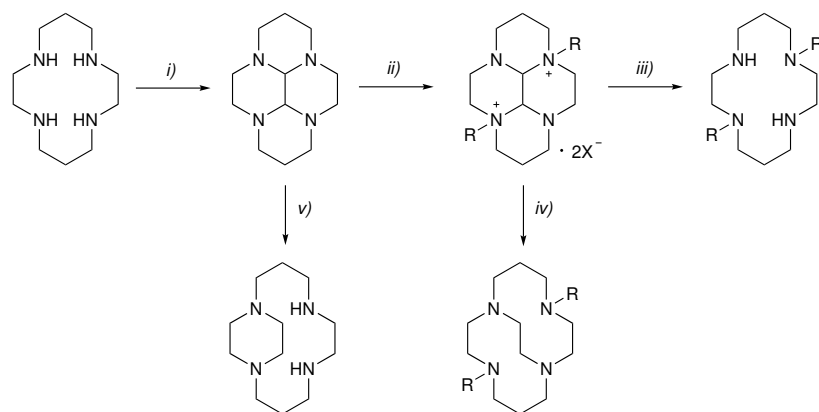


Schéma 1.2: Znázorněné syntetické možnosti vyplývající z glyoxalového chránění: *i)*  $(\text{CHO})_2$ ; *ii)*  $\text{RX}$ ; *iii)*  $\text{NaOH}$ ; *iv)*  $\text{NaBH}_4$ ; *v)*  $\text{DIBAL-H}$ .

tuované cyklamy podle toho, jaký je použit reaktant.

Disubstituované sloučeniny vznikají po bazické hydrolyze bis(amoniové) soli vodným roztokem  $\text{NaOH}$  při laboratorní teplotě, zatímco redukce pomocí  $\text{NaBH}_4$  poskytuje plně substituované makrocykly (se dvěma methylovými skupinami v pozicích 4 a 11). Tato metoda je účinná a použitelná pro syntézu různých *trans* disubstituovaných cyklamů. Již v 90. letech bylo rovněž zjištěno, že při redukci formaldehydového bisaminálu cyklamu pomocí  $\text{NaBH}_4$  nebo Raneyova niklu vzniká směs 1,8- a 1,4-dimethylcyclamu v poměru téměř 1:1.[52]

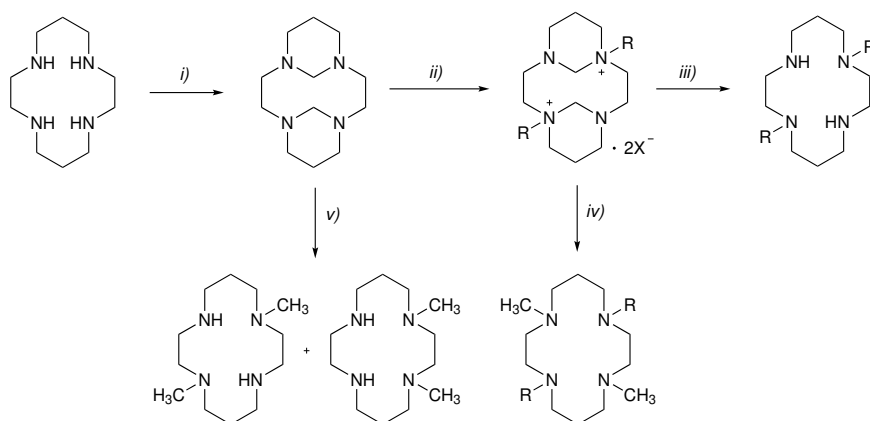


Schéma 1.3: Znázorněné syntetické možnosti vyplývající z bisaminalového chránění pomocí formaldehydu: *i)*  $\text{CH}_2\text{O}$ ; *ii)*  $\text{RX}$ ; *iii)*  $\text{NaOH}$ ; *iv)*  $\text{NaBH}_4$ ; *v)*  $\text{NaBH}_4$  nebo  $\text{H}_2/\text{Ra-Ni}$ .

### 1.4.4 Orthogonální chránění cyklamů

Orthogonálním chráněním se obecně rozumí chránění funkčních skupin různými chránícími skupinami tak, aby bylo možné specificky odštěpit jednu chránící skupinu, aniž by byly ovlivněny ostatní chránící skupiny. V případě snahy o přípravu 1,8-nesymetricky substituovaných cyklamů by bylo výhodné připravit třikrát chráněný cyklam substituovaný stejnou chránící skupinou v polohách 1 a 8 a odlišnou chránící skupinou v poloze 4. Takto chráněný cyklam by umožňoval zavedení pendantní skupiny na sekundární amin (poloha 11) a následně po odstranění chránící skupiny v poloze 4 zavést jinou pendantní skupinu.

Jedni z prvních zabývajících se orthogonálním chráněním byli Lachkar et al.,[53] kteří připravili z cyklamů ve dvou krocích 1,8-(*p*-tolylsulfonyl)-4-(*t*-butyloxykarbonyl)cyklam, a následně Chartres,[54] který ve třech krocích převedl 1,8-dibenzylcyklam na 1,8-di(Boc)-4-(Troc)cyklam (Troc = 2,2,2-trichlorethoxykarbonyl, Schéma 1.4). Tímto publikovaným postupem lze získat chráněný cyklam v poměrně uspokojivém výtěžku, selektivita triacylace je přikládána velkému energetickému rozdílu cyklamů s třemi amidovými dusíky oproti cyklamům se čtyřmi amidovými dusíky. To lze demonstrovat i reakcí cyklamů s 10 ekv. ethyltrifluoracetátu v MeOH s přidavkem triethylaminu.[55] Majoritním produktem je v tomto případě třikrát chráněný cyklam s výtěžkem > 92 %.

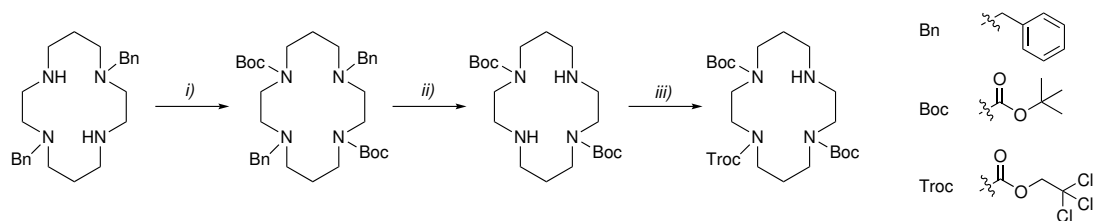


Schéma 1.4: Příprava 1,8-di(Boc)-4-(Troc)cyklamů[54]: *i*) (Boc)<sub>2</sub>O, DCM; *ii*) H<sub>2</sub>, Pd/C, MeOH; *iii*) TrocCl, Et<sub>3</sub>N, DCM.

Problémem těchto konkrétních acylovaných cyklamů může být deprotektace. Zatímco Boc skupina lze za mírných podmínek odstranit kyselou hydrolyzou, v případě Troc skupiny, která je odolná vůči hydrolyze, silně kyselým, nukleofilním i mírně reduktivním podmínkám, je potřeba odstranit chránění inzercí zinku.[54] Za takových podmínek ale mohou některá pendantní ramena zavedená na cyklus podléhat nežádoucím reakcím. Ještě drsnější podmínky vyžaduje od-

chránění tosylových (Ts) skupin, k němuž většinou dochází např. reakcí v konc.  $\text{H}_2\text{SO}_4$  při  $100\text{ }^\circ\text{C}$  nebo v 48% vodném roztoku  $\text{HBr}$  v kyselině octové zahříváním k varu pod zpětným chladičem[41] (v publikaci Lachkara et al.[53] ani není žádný způsob odchránění tosylových skupin uveden).

Selektivní triacylací[54] se inspirovala práce Blahuta,[56] který úspěšně připravil 1,8-dibenzoyl-4-trifluoracetylcyklam (Schéma 1.5). Výhodou tohoto chránění je, že trifluoracetylovou skupinu lze za mírných podmínek odstranit amonolýzou. Odstranění benzoylových chránících skupin však vyžaduje tvrdší podmínky (zahřívání k varu s 15%  $\text{HCl}$ , příp.  $\text{HBr}$  v bezv.  $\text{AcOH}$ ), vůči nimž nemusí být pendantní skupiny odolné.

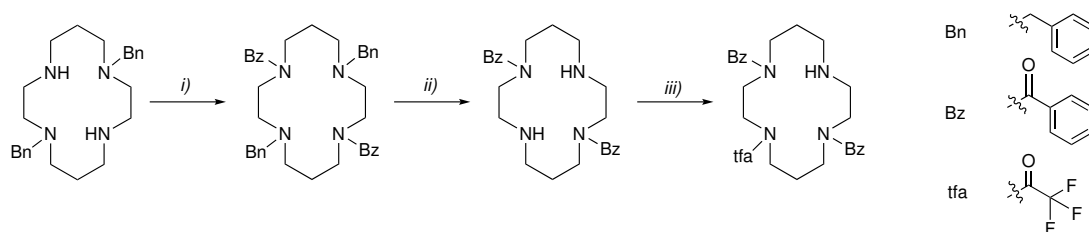


Schéma 1.5: Příprava 1,8-dibenzoyl-4-trifluoracetylcyklamu[56]: *i*)  $\text{BzCl}$ ,  $\text{Et}_3\text{N}$ ,  $\text{CHCl}_3$ ,  $0\text{ }^\circ\text{C} \rightarrow \text{RT}$ , 1 d; *ii*)  $\text{H}_2$ ,  $\text{Pd/C}$ ,  $\text{EtOH}/\text{AcOH}/\text{H}_2\text{O} = 5/1/4$ ,  $50\text{ }^\circ\text{C}$ , 3 d; *iii*)  $\text{CF}_3\text{COOEt}$ ,  $\text{Et}_3\text{N}$ , bezv.  $\text{MeOH}$ ,  $55\text{ }^\circ\text{C}$ , 2 d.

Blahut posléze, co na takto chráněný cyklam postupně zaváděl pendantní skupiny, zjistil, že povaha benzoylových skupin snižuje rozpustnost derivátů ve vodném prostředí, což velmi komplikuje zavádění pendantů i případnou izolaci látek pomocí kationtového iontoměniče.[56]

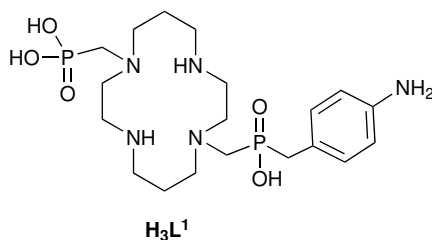
## 2. Cíle práce

Cílem této diplomové práce je příprava nesymetricky *trans*-disubstituovaných derivátů cyklamu (vyhovujících požadavkům nastíněných v teoretické části) vhodných pro koordinaci dvojmocné mědi a následnou biokonjugaci.

Konkrétním cílovým ligandem je látka  $H_3L^1$  (Obr. 2.1) s jednou methylenfosfonátovou pendentní skupinou (předpoklad urychlení tvorby komplexu) a jednou methylen(*p*-aminobenzyl)fosfinátovou skupinou s bifunkčními vlastnostmi (aminoskupina lze snadno modifikovat a následně konjugovat např. isothiokyanátovým kaplinkem).[57]

Tento ligand již byl připraven, avšak ve velmi malém množství 4 mg (pouze charakterizace pomocí NMR a MS).[56] Ve snaze připravit tento ligand ve větším množství bylo mnoho syntetických přístupů zkoumáno již v rámci předchozí bakalářské práce,[58] avšak ani alternativní cesty ani reprodukce a snaha o optimalizaci popsané několikakrokové syntézy [56] nebyly úspěšné.

Tato práce si klade za cíl připravit ligand  $H_3L^1$  ve větším množství (stovky miligramů), připravit s tímto ligandem mědnaté komplexy a studovat izomerii a vlastnosti těchto komplexů.



Obrázek 2.1: Cílový ligand.

# 3. Experimentální část

## 3.1 Obecné poznámky

Všechny použité chemikálie a rozpouštědla jsou komerčně dostupné (Sigma Aldrich, Lachema, Fluka, Acros) a byly použity bez další purifikace. Kyselina *p*-nitrobenzylfosfinová (NBPIn) je v naší skupině připravována zavedeným postupem znázorněným na Schématu 3.1.[59]

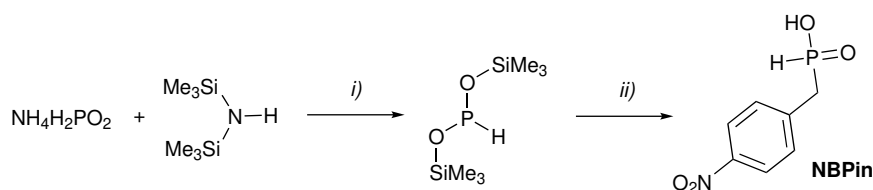


Schéma 3.1: Příprava kyseliny *p*-nitrobenzylfosfinové [59]: *i*) Ar, 110 °C, 12 hod; *ii*) 1.  $p\text{-NO}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{CH}_2\text{Br}$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $-40\text{ °C} \rightarrow \text{RT}$ , 2. EtOH, RT

Spektra nukleární magnetické rezonance (NMR) připravených látek byla změřena na přístrojích Varian VNMRs 300 a Varian INOVA 400 vybavených čtyřjádrovou automaticky přepínatelnou sondou, příp. na spektrometru Bruker Avance III 600 vybaveném kryosondou. Spektra byla referencována na tetramethylsilan (TMS) ( $\delta_{\text{H}} = 0,00$  ppm,  $\delta_{\text{C}} = 0,0$  ppm v  $\text{CDCl}_3$ ), *t*-BuOH ( $\delta_{\text{H}} = 1,24$  ppm,  $\delta_{\text{C}} = 30,3$  ppm v  $\text{D}_2\text{O}$ ) nebo 85%  $\text{H}_3\text{PO}_4$  (vnější standard,  $\delta_{\text{P}} = 0$  ppm) a zpracována v programu MestReNova.[60] Všechna měření byla provedena při 25 °C, pokud není uvedeno jinak. Spektra změřená na spektrometru Varian INOVA 400 a Bruker Avance III 600 byla změřena Mgr. Filipem Kouckým.

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) a hmotnostní spektrometrie (MS) byly provedeny na přístroji Waters Acquity QDA vybaveném 2998 PDA detektorem (rozsah 210–800 nm), ionizací elektrosprejem a kvadrupólovým detektorem. K HPLC eluci na analytické koloně s reverzní fází Cortecs C18 (2,7  $\mu\text{m}$ , 4,6×50 mm) byly použity deionizovaná voda (Millipore) a acetonitril (HPLC grade) s přidavkem kyseliny trifluoroctové (0,1 % TFA) nebo bez přidavku (použité gradienty jsou uvedeny v Tab. 3.1, rychlost průtoku byla 1,2 ml/min).

Tabulka 3.1: HPLC – použité eluční gradienty (mobilní fáze – A: H<sub>2</sub>O + 0,1 % TFA, B: MeCN + 0,1 % TFA, C: H<sub>2</sub>O, D: MeCN)

MI			MII		
<i>t</i> (min)	A (%)	B (%)	<i>t</i> (min)	C (%)	D (%)
0	100	0	0	95	5
2	100	0	8,5	0	100
8	0	100	9	0	100
11	0	100	10	95	5
13	100	0			

Tenkvrstevná chromatografie (TLC) byla provedena na chromatografických destičkách Silica gel 60 F<sub>254</sub> (VWR). Skvrny na destičce byly vizualizovány pomocí UV detekce (látky obsahující aromatický kruh), 5% vodného roztoku modré skalice (látky koordinující měď) nebo Dragendorffova činidla (detekce makrocyclických látek, vodný roztok Bi(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> a KI v kyselině octové).

K izolaci látek pomocí sloupcové chromatografie byl jako stacionární fáze použit Silica gel (0,035-0,070 mm, 60 Å, Acros).

Chromatografická dělení pomocí automatizované preparativní flash chromatografie byla prováděna na systému Sepacore Büchi sestávajícího z kontrolní jednotky C-620, kolektoru frakcí C-660, dvou pump C-605 a UV detektoru C-640. Separace byly prováděny na koloně s reverzní fází C18-AQ-HG (120 g, průtok 60 ml/min). K eluci byly použity gradienty dvou mobilních fází (deionizovaná voda + 0,1 % TFA a acetonitril + 0,1 % TFA). Konkrétní použité gradienty jsou uvedeny v Tab. 3.2.

K měření pH byl použit pH-meter Jenway 3505 vybavený H-pH-1 elektrodou (kalibrační pufrы o pH = 7,00 a 4,00). Hodnota pD NMR vzorků v D<sub>2</sub>O byla získána přičtením faktoru +0,41 k naměřené hodnotě pH.

Elementární analýza byla provedena na Ústavu organické chemie a biochemie AV ČR pracovníky tohoto ústavu. Zastoupení uhlíku, vodíku a dusíku ve vzorku bylo stanovené na přístroji PE 2400 II spalovací analýzou. Zastoupení fosforu ve vzorku bylo stanovené na přístroji SPECTRO iQ II rentgenovou fluorescenční analýzou.

Tabulka 3.2: Flash chromatografie – použité eluční gradienty (mobilní fáze – A: H<sub>2</sub>O + 0,1 % TFA a B: MeCN + 0,1 % TFA)

M1			M2			M3		
<i>t</i> (min)	A (%)	B (%)	<i>t</i> (min)	A (%)	B (%)	<i>t</i> (min)	A (%)	B (%)
0	100	0	0	100	0	0	100	0
1	100	0	2	100	0	2	100	0
2	70	30	6	70	30	18	80	20
25	60	40	20	20	80	22	30	70
27	0	100	21	0	100	23	0	100
33	0	100	25	0	100	30	0	100

## 3.2 Syntetická část

### 3.2.1 Příprava makrocyclických prekurzorů

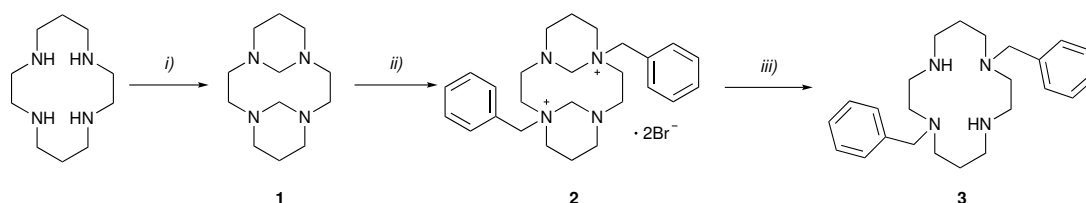


Schéma 3.2: Příprava makrocyclických prekurzorů: *i*) H<sub>2</sub>CO, H<sub>2</sub>O, 0 °C → RT, 12 hod; *ii*) BnBr, MeCN (bezv.), RT, 48 hod; *iii*) 5% NaOH (aq.).

Deriváty cyklamu **1**, **2** a **3** byly připraveny podle v naší skupině zavedeného postupu (Schéma 3.2) a charakterizační data byla v souladu s literaturou.[50]

### 3.2.2 Příprava látky 5 – syntetická cesta A

#### Příprava látky 4

Zavedení fosfonátové skupiny bylo provedeno rozkladem kvartérní soli **2** sodnou solí diethyl-fosfitu v 1,4-dioxanu s malým přídavkem vody (Schéma 3.3). Bylo vyzkoušeno několik reakcí v malé škále s různě velkými definovanými přídavky vody. Snahou bylo nalézt takové reakční podmínky, které by preferenčně poskytovaly žádaný produkt **4** oproti látce **3** a ideálně byl potlačen vznik 4,11-disubstituovaného 1,8-dibenzylcyklamu **4-x**.

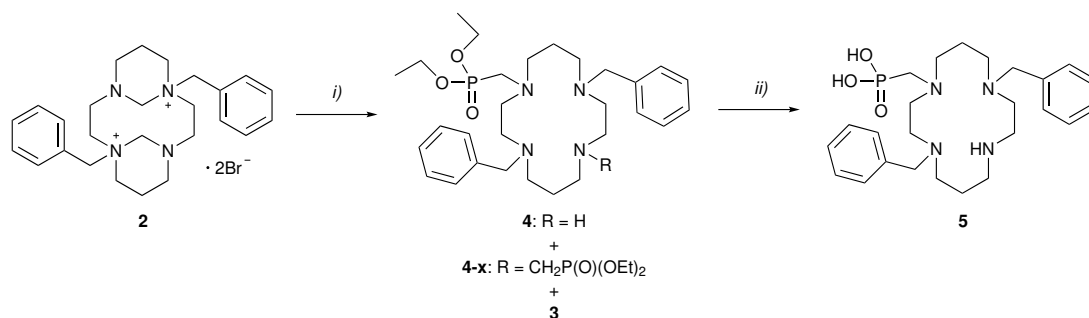


Schéma 3.3: Syntetická cesta A: *i)*  $(EtO)_2(O)P^-Na^+$ ,  $H_2O$ , dioxan, RT, 10 d; *ii)* 6M HCl, reflux, 2 d.

Níže je podrobně popsána reakce ve větší škále s nejlepším výtěžkem (přídavek 0,002 ekv. vody).

Do 100ml kulaté baňky obsahující diethyl-fosfit (22,2 ml; 172,3 mmol; 35 ekv.) a destilovanou vodu (163  $\mu$ l; 9  $\mu$ mol; 0,002 ekv.) byl přidán sodík (520 mg; 22,6 mmol; 5 ekv.) a po probublání argonem následně 50 ml 1,4-dioxanu. Poté byla přidána kvartérní sůl **2** (2,57 g; 4,5 mmol; 1 ekv.). Směs byla intenzivně míchána 10 dní při laboratorní teplotě. Reakční směs byla poté odpařena na rotační vakuové odparce (RVO) a odparek byl rozpuštěn v 50 ml 5% roztoku NaOH a extrahován  $3 \times 50$  ml  $CH_2Cl_2$ . Organické fáze byly spojeny a odpařeny na RVO. Odparek (2,0 g) byl dělen pomocí sloupcové chromatografie na silikagelu (150 g  $SiO_2$ , mobilní fáze:  $NH_3$ (konc.)/EtOH = 1/50). Produkt byl izolován jako bezbarvý viskózní olej (350 mg, výtěžek 15 %).

**$^1H$  NMR (600 MHz,  $CDCl_3$ ):** 7,35–7,27 (m, 8H, arom.); 7,24–7,20 (m, 2H, arom.); 3,99 (p,  $^3J_{HH} = ^3J_{PH} = 7,2$  Hz, 4H,  $OCH_2CH_3$ ); 3,60 (s, 2H,  $NCH_2Ph$ ); 3,59 (s, 2H,  $NCH_2Ph$ ); 2,85 (t,  $^3J_{HH} = 5,4$  Hz, 2H,  $NCH_2CH_2$ ); 2,83 (d,  $^2J_{PH} = 9,0$  Hz, 2H,  $NCH_2P$ ); 2,80 (t,  $^3J_{HH} = 6,6$  Hz, 2H,  $NCH_2CH_2$ ); 2,71 (t,  $^3J_{HH} = 5,4$  Hz, 2H,  $NCH_2CH_2$ ); 2,66–2,61 (m, 2H,  $NCH_2CH_2$ ); 2,58–2,53 (m, 4H,  $NCH_2CH_2$ ); 2,49 (t,  $^3J_{HH} = 5,8$  Hz, 2H,  $NCH_2CH_2$ ); 2,46 (t,  $^3J_{HH} = 6,0$  Hz, 2H,  $NCH_2CH_2$ ); 1,76 (p,  $^3J_{HH} = 5,7$  Hz, 2H,  $CH_2CH_2CH_2$ ); 1,69 (p,  $^3J_{HH} = 6,6$  Hz, 2H,  $CH_2CH_2CH_2$ ); 1,24 (t,  $^3J_{HH} = 7,1$  Hz, 6H,  $OCH_2CH_3$ ).

**$^{13}C\{^1H\}$  NMR (151 MHz,  $CDCl_3$ ):** 138,9 a 138,7 ( $C^{ipso}$ ); 129,5 (2C), 129,2 (2C), 128,2 (2C), 128,1 (2C), 126,9 a 126,8 (všechny arom.); 61,5 (d,  $^2J_{PC} = 7,2$  Hz, 2C,  $OCH_2CH_3$ ); 59,1 a 58,3 ( $NCH_2Ph$ ); 53,2, 52,6 (d,  $^3J_{PC} = 9,2$  Hz),

52,5 (d,  $^3J_{PC} = 3,5$  Hz), 52,4, 51,1, 49,4, 47,6 a 47,0 (všechny  $NCH_2CH_2$ ); 48,2 (d,  $^1J_{PC} = 150,2$  Hz,  $NCH_2P$ ); 25,9 a 25,2 ( $CH_2CH_2CH_2$ ); 16,5 (d,  $^3J_{PC} = 6,1$  Hz, 2C,  $OCH_2CH_3$ ).

**$^{31}P\{^1H\}$  NMR (121 MHz,  $CDCl_3$ ):** 26,6 (s, 1P,  $NCH_2P$ ).

**$^{31}P$  NMR (121 MHz,  $CDCl_3$ ):** 26,7 (p,  $^2J_{PH} = ^3J_{PH} = 8,4$  Hz, 1P,  $NCH_2P$ ).

**MS (ESI):** (+) 531,44 [M + H]<sup>+</sup>.

**TLC:** ( $SiO_2/NH_3$ (konc.):EtOH = 1:50)  $R_f = 0,25$ .

**HPLC(UV):** (Cortecs C18/MI)  $t = 4,64$  min.

### Hydrolyza esterových skupin

Výchozí látka **4** (340 mg; 0,6 mmol) byla rozpuštěna v 15 ml 6M HCl a roztok byl zahříván pod zpětným chladičem k varu 2 dny. Poté byla směs odpařena na RVO a následně ještě 3× s destilovanou vodou. Podle  $^{31}P$  NMR reakce proběhla kvantitativně.

**$^1H$  NMR (600 MHz,  $D_2O$ , pD = 5,3):** 7,54–7,46 (m, 10H, arom.); 4,23 (s, 2H,  $NCH_2Ph$ ); 4,22 (s, 2H,  $NCH_2Ph$ ); 3,35–3,31 (m, 2H,  $NCH_2CH_2$ ); 3,28 (bs, 2H,  $NCH_2CH_2$ ); 3,24–3,19 (m, 4H,  $NCH_2CH_2$ ); 3,18–3,13 (m, 4H,  $NCH_2CH_2$ ); 3,03 (bs, 2H,  $NCH_2CH_2$ ); 2,87 (bs, 2H,  $NCH_2CH_2$ ); 2,77 (d,  $^2J_{PH} = 11,4$  Hz, 2H,  $NCH_2P$ ); 2,24 (p,  $^3J_{HH} = 6,2$  Hz, 2H,  $CH_2CH_2CH_2$ ); 2,03 (p,  $^3J_{HH} = 6,0$  Hz, 2H,  $CH_2CH_2CH_2$ ).

**$^{31}P\{^1H\}$  NMR (121 MHz,  $D_2O$ , pD = 5,3):** 16,2 (s,  $CH_2P(O)(OH)_2$ ).

**MS (ESI):** (+) 475,42 [M + H]<sup>+</sup>.

**HPLC(UV):** (Cortecs C18/MI)  $t = 4,23$  min.

Bílé krystaly o složení **5** · 3HCl · 3H<sub>2</sub>O pro rentgenostrukturní analýzu byly získány rozpuštěním ~ 20 mg látky **5** ve vodě, přidáním několika kapek 6M HCl a do roztoku byl přes plynnou fázi ponechán difundovat aceton.

### 3.2.3 Příprava látky 5 – syntetická cesta B

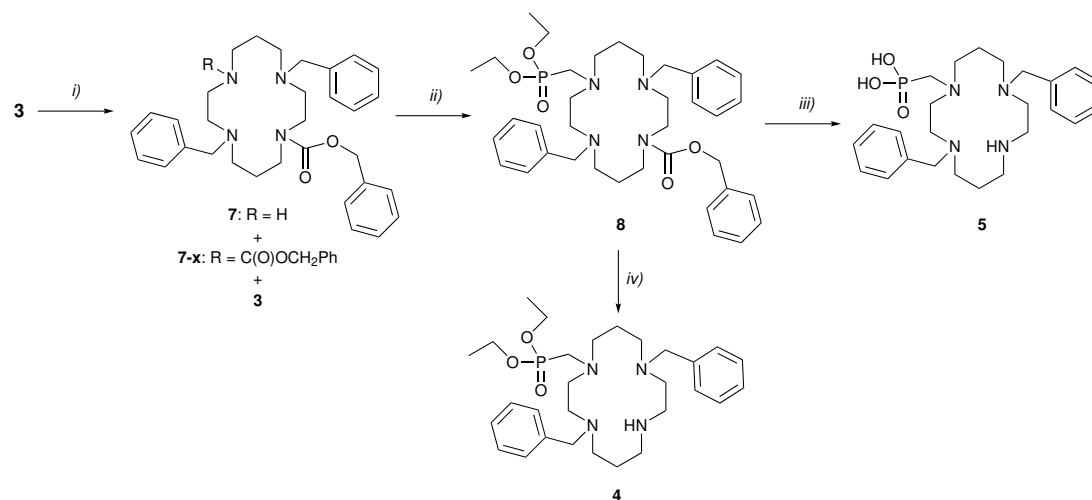


Schéma 3.4: Syntetická cesta B: *i*) CbzCl, H<sub>2</sub>O/dioxan = 1/1, RT, 3 d; *ii*) (H<sub>2</sub>CO)<sub>n</sub>, (EtO)<sub>3</sub>P, 50 °C, 2 d; *iii*) 6M HCl, reflux, 2 d; *iv*) H<sub>2</sub>, Pd/C, EtOH (bezv.), 2 h.

#### Benzyloxykarbonylové chránění 1,8-dibenzylcyklamu

Ve snaze optimalizovat selektivní zavádění pouze jedné chránící Cbz skupiny byla provedena série reakcí (7a – 7j) v různě kyselém prostředí (Schéma 3.4, Tab. 3.3).

Obecně bylo postupováno tak, že 1 ekvivalent výchozího 1,8-Bn<sub>2</sub>CAM (kromě reakce 7a, kdy byl výchozí formou 1,8-Bn<sub>2</sub>CAM · 4HCl · 4H<sub>2</sub>O) byl rozpuštěn ve směsi voda/1,4-dioxan = 1/1. K této směsi byl přidán na špičku kopistky indikátor a případně bylo pomocí roztoku kyseliny upraveno „pH“ na požadovanou hodnotu („pH“ je hodnota odečtená na pH-metru). K této směsi byl pomocí přikapávací nálevky pomalu přikapán roztok CbzCl (1 ekv.) v 1,4-dioxanu (přibližně rychlostí 10 ml/20 min). Během reakce byl postupnými přídávky roztoku 5% NaOH udržován stejný barevný odstín směsi (reakce 7a – 7f, u reakcí 7g – 7j s nižším „pH“ nebyla úprava potřeba). Reakční směs byla po třech dnech odpařena (výjimkou byla reakce 7j, která probíhala 10 dní, během nichž bylo přidáno dalších 1,7 ekv. CbzCl). Odparek byl extrahován mezi 5% NaOH a DCM, organické fáze byly spojeny a odpařeny. Odparek byl dále dělen pomocí automatizované flash chromatografie na koloně s reverzní fází C18-AQ metodou M1.

Volný amin byl získán extrakcí mezi 5% roztokem NaHCO<sub>3</sub> a CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>.

Tabulka 3.3: Různé podmínky reakce 1,8-Bn<sub>2</sub>CAM (1 ekv.) s CbzCl (1 ekv.)

	kys.	„pH“ <sup>a</sup>	indikátor	HPLC int. intenz.			výtěžek	
				<b>3</b>	<b>7</b>	<b>7-x</b>	HPLC	izol.
7a <sup>b</sup>	–	2,8	methylovanž	N/A	N/A	N/A	–	17 %
7b	HCl	2,6	methylovanž	14	33	53	35 %	24 %
7c <sup>c</sup>	HCl	2,6	methylovanž	68	18	14	14 %	5 %
7d	TFA	3,6	bromfenol. modř	63	2	35	1,6 %	–
7e	TFA	3,1	methylovanž	42	2	56	1,9 %	–
7f	TFA	2,6	thymol. modř	30	21	49	20 %	17 %
7g	TFA	1,6	thymol. modř	17	45	38	45 %	36 %
7h	TFA	1,5	– <sup>d</sup>	18	45	37	45 %	36 %
7i	TFA	1,3	thymol. modř	17	51	32	50 %	43 %
7j <sup>e</sup>	TFA	0,7	krystal. violet	7	48	45	52 %	41 %

<sup>a</sup>Směs voda:1,4-dioxan = 1:1. <sup>b</sup>Výchozí látkou byl **3** · 4HCl · 4H<sub>2</sub>O (1,8-Bn<sub>2</sub>CAM · 4HCl · 4H<sub>2</sub>O). <sup>c</sup>Došlo k vysrážení hydrochloridu vých. látky **3**. <sup>d</sup>pH udržováno pomocí elektrody. <sup>e</sup>Během 10 dní bylo postupně přidáno 2,7 ekv. CbzCl (vzhledem k výchozímu 1,8-Bn<sub>2</sub>CAM).

V Tab. 3.3 jsou popsány podmínky jednotlivých reakcí 7a – 7j: jaká kyselina byla použita pro okyselení směsi, změřené „pH“ (směs voda/1,4-dioxan) pomocí pH-metru před přidáním roztoku benzyl-chloroformiátu, použitý indikátor a integrální intenzita HPLC píků (plocha pod křivkou) jednotlivých složek směsi po extrakci (výchozí 1,8-Bn<sub>2</sub>CAM **3**, žádaný produkt **7** a 1,8-dibenzyl-4,11-bis(benzyl-oxykarbonyl)cyklam **7-x**). Na základě těchto integrálních intenzit byla odhadnuta konverze – v tabulce označena „HPLC“. Výpočet vycházel z předpokladu, že intenzita píků při 254 nm odpovídá počtu aromatických skupin, tj. poměr látek **3** : **7** : **7-x** odpovídá poměru intenzit 2 : 3 : 4. Tabulka rovněž uvádí skutečný izolovaný výtěžek reakcí (v některých případech nebyla látka **7** vzhledem k nízké konverzi izolována).

Níže je podrobněji popsána reakce 7i s nejlepším výtěžkem a příslušející charakterizační data látky **7**.

Ve 100ml kulaté baňce byl ve 30 ml směsi voda/1,4-dioxan (1/1) rozpuštěn 1,8-dibenzylcyklam **3** (1,03 g; 2,7 mmol; 1 ekv.) a bylo přidáno na špičku kopistky thymolové modře. Roztok byl okyselen pomocí 5% vodného roztoku kyseliny trifluoroctové (TFA) na pH ~ 1,3 (odečet elektrody nekorigován na nestandardní

rozpuštědlo). Poté byl přidán 1,4-dioxan tak, aby byl poměr voda/1,4-dioxan přibližně 1/1. Následně byl pomocí přikapávací nálevky pomalu přikapán roztok benzyl-chloroformiátu (CbzCl; 386  $\mu$ l; 2,7 mmol; 1 ekv.) v 10 ml 1,4-dioxanu. Poté byla směs ponechána míchat při laboratorní teplotě tři dny. Reakční směs (pH  $\sim$  1,2) byla odpařena na RVO. Odparek byl rozpuštěn v 50 ml 5% vodného roztoku NaOH a směs byla extrahována 3 $\times$  50 ml CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Organické fáze byly spojeny a odpařeny na RVO. Odparek (1,4 g) byl následně dělen pomocí flash chromatografie na reverzní fázi (120 g, C18-AQ) metodou M1. Bylo získáno 1,00 g produktu ve formě trifluoracetátu. Volný amin byl získán extrakcí mezi 5% roztokem NaHCO<sub>3</sub> a CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Výtěžek činil 0,60 g (43%).

**<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** 7,43–7,10 (m, 15H, arom.); 4,93 (bs, 2H, OCH<sub>2</sub>Ph); 3,65 (s, 2H, NCH<sub>2</sub>Ph); 3,58 (s, 2H, NCH<sub>2</sub>Ph); 3,49–3,40 (m, 2H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>); 3,37 (s, 2H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>); 2,82–2,76 (m, 2H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>); 2,68 (s, 4H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>); 2,65–2,55 (m, 4H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>); 2,45 (s, 2H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>); 1,84 (s, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>); 1,67 (s, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>).

**<sup>13</sup>C{<sup>1</sup>H} NMR (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** 155,9 (C=O); 138,8, 138,6 a 136,9 (C<sup>ipso</sup>); 129,3 (2C), 129,0 (2C), 128,4 (2C), 128,3 (2C), 128,2 (2C), 127,8, 127,7 (2C), 127,3 a 127,0 (všechny arom.); 66,7 (OCH<sub>2</sub>Ph), 60,0 (NCH<sub>2</sub>Ph); 59,9 (NCH<sub>2</sub>Ph); 53,7, 53,5, 53,1 (bs), 51,4, 50,7 (bs), 47,4, 46,9 (bs) a 45,8 (bs, všechny NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>); 26,8 (bs) a 26,4 (oba CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>).

**MS (ESI):** (+) 515,40 [M + H]<sup>+</sup>.

**HPLC(UV):** (Cortecs C18/MI) *t* = 5,12 min.

Látka **7** (5 mg) byla rozpuštěna v 0,5 ml ethanolu (abs.), dále byla přidána 1 kapka konc. HCl a do směsi byl přes plynnou fázi ponechán difundovat aceton. Byly získány bílé krystaly o složení **7** · 3HCl · 2H<sub>2</sub>O vhodné pro rentgenostrukturní analýzu.

### Zavedení fosfonátové skupiny Mannichovou reakcí

Do 100ml kulaté baňky byla odvážena látka **7** (1,4 g; 2,7 mmol; 1 ekv.) a bylo přidáno 30 ml triethyl-fosfitu. Poté byl přidán paraformaldehyd (164 mg; 5,5 mmol; 2 ekv.) a směs byla probublána argonem, baňka byla zazátkována a směs byla ponechána míchat při 50 °C 2 dny. Reakční směs byla následně odpařena na RVO a poté ještě 3 $\times$  s toluenem. Byla získána směs, která (podle

HPLC/MS) obsahovala žádaný produkt **8**, ale rovněž triethyl-fosfát a diethyl-hydroxymethylfosfonát. Extrakcí mezi 5% vodný roztok NaOH a dichlormethan (DCM) se podařilo oddělit diethyl-hydroxymethylfosfonát, který zůstal ve vodné fázi. Jelikož se nepodařilo oddělit triethyl-fosfát, nebyl stanoven výtěžek.

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** 7,40–7,09 (m, 15H, arom.); 4,96 (d, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> = 25,8 Hz, 2H, OCH<sub>2</sub>Ph); 4,14 (p, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7,0 Hz, (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>3</sub>PO); 4,07 (q, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7,2 Hz, 4H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); 3,63–3,52 (m, 4H, NCH<sub>2</sub>Ph); 3,50–3,27 (m, 4H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>); 2,91–2,75 (m, 4H NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub> + 2H NCH<sub>2</sub>P); 2,70–2,51 (m, 6H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>); 2,47–2,33 (m, 2H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>); 1,72 (p, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6,4 Hz, 4H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>); 1,36 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7,0 Hz, (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>3</sub>PO); 1,30 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7,2 Hz, 6H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>).

**<sup>31</sup>P{<sup>1</sup>H} NMR (121 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** 26,3 (s, CH<sub>2</sub>P(O)(OEt)<sub>2</sub>, I<sub>int.</sub> = 1,0); –0,5 (s, (EtO)<sub>3</sub>P(O), I<sub>int.</sub> = 0,5).

**MS (ESI):** (+) 665,58 [M + H]<sup>+</sup>; 183,15 [(EtO)<sub>3</sub>P(O) + H]<sup>+</sup>.

**HPLC(UV):** (Cortecs C18/MI) *t* = 5,47 min (**8**).

### Hydrolyza esterových skupin a odstranění chránicí benzyloxykarbonylové skupiny

V 25ml baňce bylo v 5 ml 6M HCl rozpuštěno 180 mg látky **8** (minoritně obsahující triethyl-fosfát) a směs byla zahřívána k varu pod zpětným chladičem 2 dny. Následně byla reakční směs odpařena na RVO a poté ještě 2× s vodou. Bylo získáno 157 mg směsi látky **5** a H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (minoritně). Charakterizační data odpovídala již dříve získaným datům pro látku **5** připravenou syntetickou cestou A (viz odstavce 3.2.2), v <sup>31</sup>P{<sup>1</sup>H} NMR spektru navíc se signálem H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (δ = 0,5 ppm).

### Odstranění chránicí skupiny Cbz za zachování esterů

V 25ml hruškovité baňce bylo v 15 ml bezv. EtOH rozpuštěno 350 mg směsi látky **8** a triethyl-fosfátu a následně bylo přidáno 30 mg 10% Pd/C. Baňka byla sekurována, připojena na balónek s vodíkem a směs byla ponechána intenzivně míchat při laboratorní teplotě 2 hodiny. Směs byla přefiltrována přes skládaný filtrační papír a filtrát byl odpařen na RVO. Odparek (260 mg) měl formu bezbarvého viskózního oleje. Podle NMR a HPLC/MS se jednalo o směs látky **4**

a triethyl-fosfátu. Tyto látky se však nepodařilo oddělit.

### 3.2.4 Zavedení *p*-nitrobenzylfosfinátové skupiny

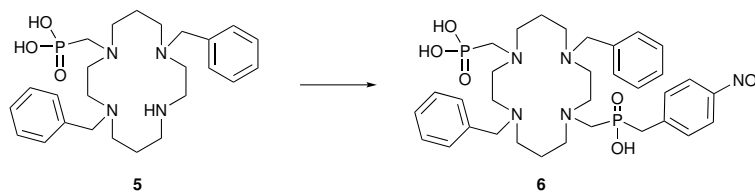


Schéma 3.5: Zavádění NBPIn skupiny:  $p\text{-NO}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{PH}(\text{O})(\text{OH})$ ,  $(\text{H}_2\text{CO})_n$ , 99% AcOH, 65 °C, 3 d.

Do 25ml slzovité baňky byla odvážena látka **5** (360 mg; 0,76 mmol; 1 ekv.) a přidáno 15 ml 99% AcOH. Dále byla přidána kyselina *p*-nitrobenzylfosfinová (190,7 mg; 0,95 mmol; 1,25 ekv.) a paraformaldehyd (46 mg; 1,5 mmol; 2 ekv.). Směs byla probublána argonem, baňka byla zazátkována a směs byla ponechána míchat při 65 °C. Druhý den byla reakční směs kontrolována pomocí HPLC/MS a  $^{31}\text{P}$  NMR, ve směsi byla stále přítomná výchozí látka **5** i nezreagovaná NB-Pin (charakteristický dublet v  $^{31}\text{P}$  NMR). Proto byl přidán další ekvivalent paraformaldehydu a směs byla míchána při stejné teplotě další dva dny. Poté byla směs odpařena na RVO a následně ještě 2× s vodou. Odparek (0,5 g) byl dělen pomocí flash chromatografie na reverzní fázi (40 g, C18-AQ) metodou M2. Bylo získáno 352 mg produktu (výtěžek 55 % pro předpokládané složení  $\mathbf{6} \cdot 0,5 \text{ TFA} \cdot 5,5 \text{ H}_2\text{O}$  určené z rentgenostrukturní analýzy). Špatná rozpustnost produktu v běžných deuterovaných rozpouštědlech znemožňovala změření reprezentativních NMR spekter. Látka **6** byla převedena na hydrochlorid – po rozpuštění látky v 6M HCl došlo během dvou dnů k vysrážení světle žlutého prášku. Ani v této formě však látka není dobře rozpustná, byla tedy změřena NMR spektra v  $\text{D}_2\text{O}$  s přídavkem NaOD.

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ , pD = 13,6): 8,13 (d,  $J = 8,3$  Hz, 2H, arom.); 7,45–7,28 (m, 12H, arom.); 3,70 (s, 2H,  $\text{NCH}_2\text{Ph}$ ); 3,61 (s, 2H,  $\text{NCH}_2\text{Ph}$ ); 3,04 (dd,  $^2J_{\text{PH}} = 16,5$  Hz,  $J = 5,9$  Hz, 2H,  $\text{PCH}_2\text{C}$ ); 2,94–2,41 (m, 16H  $\text{NCH}_2\text{CH}_2$  + 4H  $\text{NCH}_2\text{P}$ ); 1,68 (bs, 4H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ ).

$^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  NMR (121 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ , pD = 13,6): 35,8 (s, 1P,  $\text{CH}_2\text{P}(\text{O})(\text{OH})\text{CH}_2$ );

15,7 (s, 1P,  $\text{CH}_2\text{P}(\text{O})(\text{OH})_2$ ).

$^{31}\text{P}$  NMR (121 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ , pD = 13,6): 35,3 (m, 1P,  $\text{CH}_2\text{P}(\text{O})(\text{OH})\text{CH}_2$ );  
15,7 (t,  $^2J_{\text{PH}} = 11,7$  Hz, 1P,  $\text{CH}_2\text{P}(\text{O})(\text{OH})_2$ ).

MS (ESI): (+) 688,53  $[\text{M} + \text{H}]^+$ .

HPLC(UV): (Cortecs C18/MI)  $t = 5,07$  min.

EA: pro  $\text{C}_{33}\text{H}_{47}\text{N}_5\text{O}_7\text{P}_2 \cdot 3,7\text{HCl} \cdot 3,5\text{H}_2\text{O}$  vypočteno C (44,75 %), H (6,57 %), N (7,91 %), P (6,99 %), Cl (14,81 %); nalezeno C (44,84 %), H (6,16 %), N (7,55 %), P (6,49 %), Cl (14,17 %).

Látka **6** byla rekrystalizována z horké vody a získané oranžové krystalky o složení  $6 \cdot 0,5\text{TFA} \cdot 5,5\text{H}_2\text{O}$  byly podrobeny rentgenostrukturní analýze.

### 3.2.5 Odchránění benzylových skupin a redukce nitroskupiny

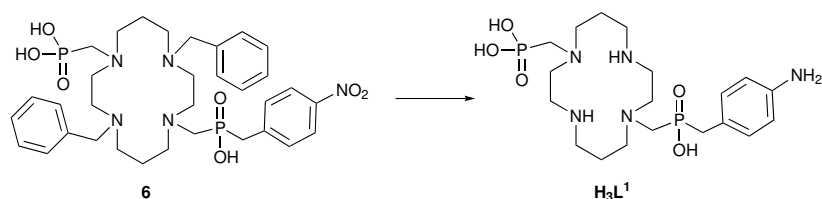


Schéma 3.6: Hydrogenace:  $\text{H}_2$ , Pd/C, 50% AcOH, 4 d.

Do 50ml hruškovité baňky s látkou  $6 \cdot 0,5\text{TFA} \cdot 5,5\text{H}_2\text{O}$  (846 mg; 1,00 mmol) bylo přidáno 25 ml 50% AcOH a směs byla míchána 30 minut (úplné rozpuštění látky **6**). Následně bylo přidáno 70 mg 10% Pd/C, baňka byla sekurována, připojena na balónek s vodíkem a směs byla ponechána míchat při RT po dobu 2 dní. Reakce byla zkontrolována pomocí HPLC, výchozí látka **6** však nebyla zcela zreagovaná, proto bylo přidáno dalších 70 mg 10% Pd/C a směs byla hydrogenována při RT další dva dny. Katalyzátor byl odfiltrován přes skládaný filtrační papír. Filtrát byl poté odpařen na RVO a ještě  $3 \times$  s vodou. Odparek (600 mg) byl dělen pomocí flash chromatografie na reverzní fázi (120 g, C18-AQ) metodou M3. Dočištění ligandu od kyseliny trifluoroctové bylo provedeno nanesením získané látky (510 mg) na silný kationtový iontoměnič Dowex  $50 \times 8$  (50 ml) v  $\text{H}^+$ -cyklu. Kolona poté byla promývána vodou (cca 250 ml) a následně byl produkt eluován směsí

$\text{NH}_3(\text{konc.})/\text{H}_2\text{O} = 1/4$  (cca 400 ml) a eluát odpařen na RVO. Bylo izolováno 309 mg ligandu  $\text{H}_3\text{L}^1$  (výtěžek 65 %).

**$^1\text{H}$  NMR (600 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ , pD = 5,9):** 7,21 (d,  $J = 7,9$  Hz, 2H, arom.); 6,95 (d,  $J = 7,9$  Hz, 2H, arom.); 3,27–3,01 (m, 7H); 2,98 (d,  $^2J_{\text{PH}} = 16,8$  Hz, 2H,  $\text{PCH}_2\text{C}$ ); 2,94 (m, 7H); 2,69 (bs, 3H); 2,63 (d,  $^2J_{\text{PH}} = 10,6$  Hz, 2H,  $\text{NCH}_2\text{PO}_3\text{H}_2$ ); 2,57 (bs, 1H); 2,00–1,71 (m, 4H).

**$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$  NMR (151 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ , pD = 5,9):** 142,8 ( $C^{\text{ipso}}\text{NH}_2$ ); 131,4 (2C, CH); 128,0 (d,  $^2J_{\text{PC}} = 7,2$  Hz,  $C^{\text{ipso}}$ ); 118,8 (2C, CH); 58,9 (d,  $^3J_{\text{PC}} = 5,0$  Hz,  $\text{NCH}_2\text{CH}_2$ ); 58,6 (d,  $^3J_{\text{PC}} = 4,8$  Hz,  $\text{NCH}_2\text{CH}_2$ ); 54,7 (d,  $^3J_{\text{PC}} = 6,3$  Hz,  $\text{NCH}_2\text{CH}_2$ ); 54,1 (d,  $^3J_{\text{PC}} = 8,5$  Hz,  $\text{NCH}_2\text{CH}_2$ ); 52,6 (d,  $^1J_{\text{PC}} = 157,5$  Hz,  $\text{NCH}_2\text{PO}_3\text{H}_2$ ); 52,2 (d,  $^1J_{\text{PC}} = 108,0$  Hz,  $\text{NCH}_2\text{PO}_3\text{H}_2$ ); 48,6 (2C,  $\text{NCH}_2\text{CH}_2$ ); 46,2 a 45,9 ( $\text{NCH}_2\text{CH}_2$ ); 37,3 (d,  $^1J_{\text{PC}} = 83,5$  Hz,  $\text{PCH}_2\text{C}$ ); 24,0 a 23,9 ( $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$ ).

**$^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$  NMR (121 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ , pD = 5,9):** 38,5 (s, 1P,  $\text{CH}_2\text{P}(\text{O})(\text{OH})\text{CH}_2$ ); 21,6 (s, 1P,  $\text{CH}_2\text{PO}_3\text{H}_2$ ).

**$^{31}\text{P}$  NMR (121 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ , pD = 5,9):** 38,5 (t,  $^2J_{\text{PH}} = 16,6$  Hz, 1P,  $\text{CH}_2\text{P}(\text{O})(\text{OH})\text{CH}_2$ ); 21,4 (t,  $^2J_{\text{PH}} = 10,6$  Hz, 1P,  $\text{CH}_2\text{PO}_3\text{H}_2$ ).

**MS (ESI):** (+) 478,37 [M + H]<sup>+</sup>.

**HPLC(UV):** (Cortecs C18/MI)  $t = 3,47$  min; (Cortecs C18/MII)  $t = 1,50$  min.

Část ligandu (5 mg) byla rozpuštěna v 0,4 ml ethanolu (abs.), dále bylo přikapáno 0,05 ml vody a do směsi byl přes plynnou fázi ponechán difundovat ethylacetát. Byly tak získány malé světle žluté krystaly o složení  $\text{H}_3\text{L}^1 \cdot \text{EtOH} \cdot \text{H}_2\text{O}$  vhodné pro rentgenostrukturní analýzu.

### 3.2.6 Příprava měďnatých komplexů

#### Příprava pentakoordinovaného komplexu

Ligand  $\text{H}_3\text{L}^1$  (32,7 mg; 68,5 nmol) byl rozpuštěn v 1 ml vody. Do tohoto roztoku byl přikapán 1 ml roztoku měďnaté soli (11,7 mg  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ; 68,8 nmol). Vznikl tmavě modrý roztok (pH  $\sim 2,2$ ) komplexu.

**MS (ESI):** (+) 539,33 [M + H]<sup>+</sup>.

**HPLC(UV):** (Cortecs C18/MI)  $t = 1,08$  min.

**UV-Vis:**  $\lambda_{\max} = 315$  nm (CT,  $\varepsilon = 4455$  mol<sup>-1</sup>dm<sup>3</sup>cm<sup>-1</sup>);  $\lambda_{\max} = 590$  nm (d-d,  $\varepsilon = 165$  mol<sup>-1</sup>dm<sup>3</sup>cm<sup>-1</sup>).

### **Příprava hexakoordinovaného komplexu**

Ve 4ml vialce byly po dobu 15 dnů zahřívány (60 °C) 2 ml 2mM roztoku pentakoordinovaného komplexu. Pomalá změna izomerie byla během této doby pozorována pomocí HPLC a UV-Vis. Roztok rovněž změnil barvu na fialovou.

**MS (ESI):** (+) 539,14 [M + H]<sup>+</sup>.

**HPLC(UV):** (Cortecs C18/MI)  $t = 2,85$  min.

**UV-Vis:**  $\lambda_{\max} = 278$  nm (CT,  $\varepsilon = 6960$  mol<sup>-1</sup>dm<sup>3</sup>cm<sup>-1</sup>);  $\lambda_{\max} = 557$  nm (d-d,  $\varepsilon = 122$  mol<sup>-1</sup>dm<sup>3</sup>cm<sup>-1</sup>).

## **3.3 UV-Vis spektroskopie**

UV-Vis spektra byla získána na přístroji Specord 50 Plus (Analytic Jena AG) v rozmezí vlnových délek 190 až 1100 nm (v rozmezí 190–320 nm byla použita deuteriová lampa a v rozmezí 320–1100 nm halogenová lampa). Teplota byla udržována při  $25,0 \pm 0,1$  °C pomocí bloku typu Peltier.

### **Disociační kinetika**

Experimenty byly provedené při různé koncentraci kyseliny chloristé (0,001–5,0 M) při teplotě  $25,0 \pm 0,1$  °C. Zásobní roztok HClO<sub>4</sub> byl faktorizován na NaOH (ten byl standardizován pomocí kyseliny šťavelové). Během měření byla udržována konstantní iontová síla ( $I[(H,Na)ClO_4] = 5$  M) pomocí směsi HClO<sub>4</sub> a NaClO<sub>4</sub>. Do křemenné kyvety (o optické délce 1,000 cm) byla odpipetována voda (53  $\mu$ l), vypočítaný objem 5,905M roztoku HClO<sub>4</sub> a vodný 5,905M roztok NaClO<sub>4</sub> (takový objem, aby po přidání roztoku komplexu celkový objem v kyvetě činil 1,000 ml, viz Tab. 3.4). Tento roztok byl vytemperován na teplotu  $25,0 \pm 0,1$  °C alespoň 5 minut. Poté byla reakce zahájena přidávkem roztoku 2mM komplexu (100  $\mu$ l) a byla pozorována absorbance při 307 nm po dobu alespoň 5 poločasů.

Tabulka 3.4: Složení roztoků pro měření disociačních kinetik

$c_{\text{HClO}_4}$ (M)	$V_{\text{HClO}_4}$ ( $\mu\text{l}$ )	$V_{\text{NaClO}_4}$ ( $\mu\text{l}$ )	$V_{\text{H}_2\text{O}}$ ( $\mu\text{l}$ )	$V_{\text{CuL}}$ ( $\mu\text{l}$ )
5,0	847	0	53	100
4,0	678	169	53	100
3,0	508	339	53	100
2,0	339	508	53	100
1,0	169	678	53	100
0,50	84	763	53	100
0,10	17	830	53	100
0,05	9	838	53	100
0,01	2	845	53	100
0,001	847 $\mu\text{l}$ roztoku*		53	100

\*Roztok byl připraven odpipetováním 2,0  $\mu\text{l}$  5,905M roztoku  $\text{HClO}_4$  do 10ml odměrné baňky a doplněním po rysku 5,905M roztokem  $\text{NaClO}_4$ .

### 3.4 Rentgenostrukturní analýza

Difrakční data (Tab. 3.5) byla získána při 120 K (Cryostream Cooler, Oxford Cryosystem). K měření byl použit čtyřkruhový difraktometr Bruker D8 VENTURE Kappa Duo s plošným detektorem PHOTONIII CMOS. Zdrojem rtg. záření byla vzduchem chlazená mikrofokusní lampa IpS (firma Incoatec) se zdrojem 50 kV a 1 mA poskytující vlnovou délku  $\text{Mo-}K\alpha$  ( $\lambda = 0,71973 \text{ \AA}$ ) nebo  $\text{Cu-}K\alpha$  ( $\lambda = 1,54178 \text{ \AA}$ ). Monochromatizace byla zajišťována vrstevnatou rentgenovou optikou. Difrakční snímky byly integrovány pomocí softwaru Bruker SAINT (narrow-frame algoritmus). Nasbíraná data byla podrobena korekci na absorpci použitím metody Multi-Scan (SADABS). Struktury byly vyřešeny a upřesněny pomocí softwaru Bruker SHELXTL. Všechna rentgenostrukturní data byla změřena RNDr. Ivanou Císařovou, CSc. a vypřesněna prof. RNDr. Janem Kotkem, PhD.

Těžké atomy (tedy všechny kromě vodíkových atomů) byly vypřesněny anizotropně. Vodíkové atomy na atomech uhlíku byly dopočítány v teoretických polohách. Vodíkové atomy na atomech dusíku byly vypřesněny izotropně a vodíkové atomy na atomech kyslíku byly fixovány v původních pozicích elektronových maxim diferenční mapy (výjimkou je pouze struktura  $\mathbf{6} \cdot 0,5 \text{ TFA} \cdot 5,5 \text{ H}_2\text{O}$ , kde byly všechny vodíkové atomy fixovány).

Tabulka 3.5: Experimentální krystalografická data připravených krystalů

látka	<b>7</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>H<sub>3</sub>L<sup>1</sup></b>
	· 3 HCl · 2 H <sub>2</sub> O	· 3 HCl · 3 H <sub>2</sub> O	· 0,5 TFA · 5,5 H <sub>2</sub> O	· EtOH · H <sub>2</sub> O
vzorec	C <sub>32</sub> H <sub>42</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub> · 3 HCl · 2 H <sub>2</sub> O	C <sub>25</sub> H <sub>39</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub> P · 3 HCl · 3 H <sub>2</sub> O	C <sub>33</sub> H <sub>47</sub> N <sub>5</sub> O <sub>7</sub> P <sub>2</sub> · 0,5 TFA · 5,5 H <sub>2</sub> O	C <sub>19</sub> H <sub>37</sub> N <sub>5</sub> O <sub>5</sub> P <sub>2</sub> · EtOH · H <sub>2</sub> O
$M_r$	660,10	637,99	843,79	541,56
$T$ (K)	120	120	120	120
soustava	triklinická	triklinická	triklinická	triklinická
prostorová grupa	$P\bar{1}$	$P\bar{1}$	$P\bar{1}$	$P\bar{1}$
$a$ (Å)	7,2380(4)	11,6081(4)	15,3250(5)	8,1763(2)
$b$ (Å)	14,9461(8)	14,4252(5)	15,7200(5)	11,7360(3)
$c$ (Å)	17,9557(10)	20,3631(8)	19,5850(6)	14,1890(3)
$\alpha$ (°)	112,465(2)	72,306(2)	83,485(2)	89,375(1)
$\beta$ (°)	94,296(2)	88,819(2)	71,691(2)	75,439(1)
$\gamma$ (°)	97,335(2)	79,011(2)	66,118(2)	87,141(1)
$V$ (Å <sup>3</sup> )	1764,06(17)	3186,4(2)	40953(2)	1316,16(5)
$Z$	2	4	4	2
typ záření	Mo- $K\alpha$	Cu- $K\alpha$	Cu- $K\alpha$	Mo- $K\alpha$
velikost kryst. (mm)	0,36×0,06×0,04	0,24×0,07×0,04	0,23×0,18×0,03	0,19×0,15×0,06
$\mu$ (mm <sup>-1</sup> )	0,30	3,44	1,62	0,22
difrakce nezávislé	8092	12564	16121	6036
difrakce pozorované	6911	8395	12418	5361
GoF	1,05	1,05	1,03	1,05
$R_1$	0,034	0,056	0,077	0,030
$wR_2$	0,092	0,170	0,220	0,087
parametry	420	756	1050	357
$\Delta\rho_{\max}/\Delta\rho_{\min}$ (e · Å <sup>-3</sup> )	0,38/−0,24	0,79/−0,55	2,30/−0,85	0,39/−0,34

# 4. Výsledky a diskuze

## 4.1 Syntéza cílového ligandu

### 4.1.1 Příprava ((4,11-dibenzyl-1,4,8,11-tetraazacyklotetra-dekan-1-yl)methyl)fosfonové kyseliny, **5**

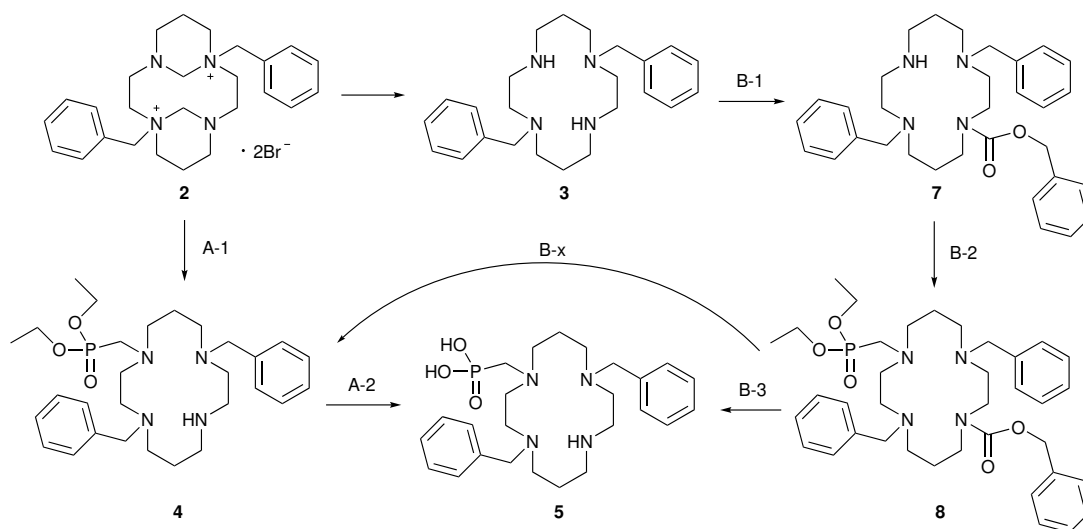


Schéma 4.1: Příprava látky **5** – syntetické cesty A a B

#### Syntetická cesta A

Příprava látky **4** je popsána pouze v jediné publikaci [27] reakcí 1,8-dibenzylcyklamu **3** s paraformaldehydem a diethyl-fosfitem v benzenu s uspokojivým výtěžkem 43 %. Autoři však sami zdůrazňují, že úspěch této reakce závisí kruciólně na kvalitě použitého paraformaldehydu. To je pravděpodobně hlavním důvodem, proč se nepodařilo (osobní zkušenost a zkušenost starších kolegů v naší skupině) tyto výsledky reprodukovat.

Možnosti selektivního zavádění methylfosfonátového diesteru na 1,8-dibenzylcyklam **3** za různých podmínek byly zkoumány v rámci bakalářské práce,[58] tyto syntetické cesty však neposkytovaly dostatečnou selektivitu a výtěžky se pohybovaly pouze v jednotkách procent.

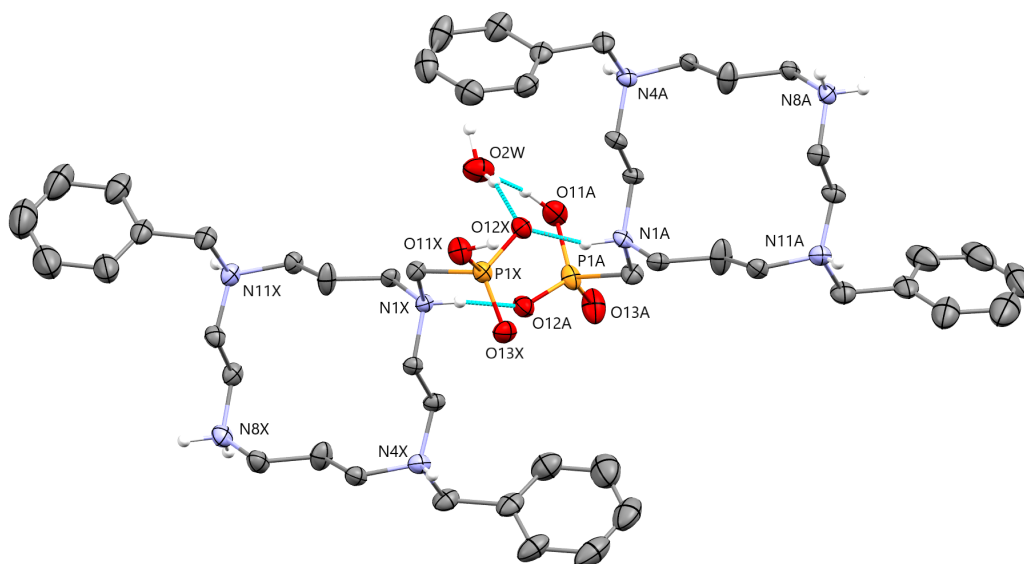
Ve snaze o přípravu látky **4** se nám další inspirací stala reakce rozkladu kvarterní soli **X** (dimethyl analog látky **2**) pomocí sodné soli diethyl-fosfitu,[18] kdy

fosfitový anion selektivně otevírá slabou C–N vazbu kvartenizovaného aminu. V této publikaci [18] se autoři snažili o disubstituci v *trans*-polohách a konstatují, že výběr rozpouštědla byl pro jejich práci zásadní (tj. striktně bezvodé podmínky a rozpustnost výchozí látky v dimethylformamidu). Tato informace společně se znalostí, že působením NaOH na kvartérní sůl **2** vzniká 1,8-dibenzylcyklam **3**, [50] nás přivedla k myšlence, že malé definované množství vody by mohlo zapříčinit určitou selektivitu vzniku žádané látky **4** oproti plně substituovanému cyklamů **4-x** a 1,8-dibenzylcyklamů **3**.

Byla provedena zkušební série reakcí (Schéma 4.1, A-1) kvartérní soli **2** se sodnou solí diethyl-fosfitu v 1,4-dioxanu s různým přídávkem vody (0,001 až 0,005 ekv. vůči **2**). Přestože prvotní reakce v malé škále naznačovaly, že by tento směr mohl být úspěšný, při opakovaných snahách o naškálování reakce jsme se setkali s několika nepřekonatelnými problémy. Kvůli heterogenitě probíhala reakce velice pomalu, nebylo možné sledovat žádnou metodou její průběh a při opakování reakcí za stejných podmínek nebyly získány reprodukovatelné výtěžky. Látka **4** byla pouze minoritním produktem, po zpracování reakce extrakcí mezi 5% NaOH a DCM byl nejvíce přítomem 1,8-dibenzylcyklam. To je rovněž nejspíše způsobeno heterogenní povahou reakce – reakční směs obsahovala nezreagovanou výchozí kvartérní sůl **2**, ze které po zpracování extrakcí vznikl 1,8-dibenzylcyklam **3**. Po izolaci látky **4** bylo dále zjištěno, že dochází k degradaci v řádu dnů (nutno uchovávat v baňce v atmosféře argonu v lednici). Byl získán dostatek látky **4** pro další syntetické záměry, avšak tento reakční krok (A-1) je špatně reprodukovatelný a neposkytuje látku **4** v dostatečné konverzi.

Kyselá hydrolyza (Schéma 4.1, A-2) esterových skupin látky **4** v 6M HCl poskytovala kvantitativně látku **5**. Krystaly o složení  $5 \cdot 3 \text{HCl} \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$  vhodné pro rentgenostrukturní analýzu byly získány difuzí acetonu do vodného roztoku látky **5** s několika kapkami 6M HCl (Obr. 4.1). Strukturně nezávislá část odpovídá dvěma vzorčovým jednotkám, tj. dvěma molekulám makrocyclu, šesti chloridovým aniontům a šesti molekulám vody. Benzylová skupina na dusíkovém atomu N11X zaujímá dvě možné pozice („disorder“), na Obrázku 4.1 je však zobrazena pouze pozice s vyšší okupací (80 %). Cyklamový cyklus zaujímá konformaci (3,4,3,4)-A (konvence dle Dalea). [61] Dusíkové atomy aminových skupin makro-

cyklu jsou protonizovány a tyto vodíky jsou součástí vodíkových vazeb s kyslíkovými atomy fosfonátu ( $\text{N1A-H1A}\cdots\text{O12X}$  a  $\text{N1X-H1X}\cdots\text{O12A}$ ), příp. vody. Délky vodíkových vazeb mezi fosfinátovou skupinou a aminoskupinou sousední molekuly se příliš neliší ( $d(\text{N1A}\cdots\text{O12X}) = 2,616 \text{ \AA}$ ;  $d(\text{N1X}\cdots\text{O12A}) = 2,569 \text{ \AA}$ ) a odpovídají silné vodíkové vazbě.



Obrázek 4.1: Část krystalové struktury látky  $\mathbf{5} \cdot 3 \text{ HCl} \cdot 3 \text{ H}_2\text{O}$ . Chloridové anionty a molekuly vody – kromě jedné – nejsou pro lepší přehlednost zobrazeny (stejně jako vodíkové atomy vázané na atomech uhlíku). Tyrkysově jsou vyznačeny vodíkové vazby.

### Syntetická cesta B

Po neúspěchu syntetické cesty A (malé výtěžky a špatná reprodukovatelnost prvního kroku A-1) jsme obrátili pozornost k selektivnímu chránění jednoho sekundárního aminu 1,8-dibenzylcyklamu. Některé možnosti chránění 1,8-dibenzylcyklamu byly již prozkoumány v rámci bakalářské práce,[58] avšak za testovaných podmínek nedocházelo k selektivnímu chránění. Z vyzkoušených chránících skupin se jako vhodná jevila benzyloxykarbonylová skupina, kterou lze i snadno za mírných podmínek odstranit.

Inspirací pro benzyloxykarbonylové chránění byla reakce  $\text{CbzCl}$  s cyklenem,[45] kterou jsou za kyselých podmínek ( $\text{pH} \sim 2-3$ ) na cyklen selektivně zavedeny dvě

benzyloxykarbonylové skupiny do *trans* poloh 1 a 7. Tato reakce využívá velkého rozdílu v  $pK_a$  hodnotách – cyklen má dvě hodnoty  $pK_a$  vysoké ( $> 9$ ) a dvě hodnoty nízké ( $< 2$ ), *trans*-diprotonizovaný cyklen je tak v podstatě jedinou formou přítomnou v oblasti neutrálního pH.[41] Protonizace sekundárního aminu inhibuje jeho reaktivitu vůči elektrofilům a pouze dusíkové atomy, které nejsou protonizované, jsou dostupné pro další funkcionalizaci. Obdobně jsme se chtěli pomocí protonizace dusíku (*de facto* chránění sekundárního aminu protonizací) pokusit selektivně zavést pouze jednu chránící skupinu na 1,8-dibenzylcyklam **3**.

Reakce (Schéma 4.1, B-1) podle očekávání poskytuje směs výchozího 1,8-dibenzylcyklamu **3** (který za kyselých podmínek neodreaguje úplně), selektivně chráněného dibenzylcyklamu **7** a dvakrát acylovaného dibenzylcyklamu **7-x**. Výhodou je zpětná regenerace **7-x** kyselou hydrolyzou na výchozí látku **3**. Ve snaze naleznout takové podmínky, za kterých by preferenčně vznikala látka **7**, byla provedena série reakcí (Tab. 4.1) v různě kyselém prostředí.

Nejprve byla výchozí směs okyselována pomocí vodného roztoku HCl (reakce 7b a 7c), ukázalo se ovšem, že může dojít k vysrážení výchozí látky **3** ve formě hydrochloridu (jako se tomu stalo v případě reakce 7c). V kyselém prostředí se hydrolyzuje acylační činidlo a generuje se malé množství HCl. Navíc HCl vzniká i při reakci, je tedy lepší, když je na začátku reakce  $Cl^-$  co nejméně, aby v průběhu reakce nedošlo k vysrážení látky **3**. Okyselování pomocí vodného roztoku TFA umožnilo dosáhnout libovolně nízkého „pH“, aniž by došlo k vysrážení. U reakcí s „pH“ nad 2 bylo průběžně upravováno „pH“ přidavky 5% roztoku NaOH na základě odstínu vhodně zvoleného acidobazického indikátoru. U reakcí s nižším „pH“ nebyly přidavky hydroxidu potřeba, hodnota „pH“ výchozí směsi a směsi před zpracováním se lišila maximálně o 0,1 a lze tyto reakce provádět bez indikátoru (viz reakce 7h).

Podle provedených reakcí můžeme usuzovat, že čím kyselejší prostředí, tím je pravděpodobně protonizací více bráněna zbývající aminoskupina a zpomaluje se reakce do druhého stupně. Při velmi nízkém „pH“ (menší než 1) však reakce probíhá velmi pomalu i do prvního stupně, acylační činidlo je velmi rychle hydrolyzováno a je potřeba přidat nadbytek CbzCl (jako v případě reakce 7j).

Při izolaci pomocí flash chromatografie může být problematické oddělení 1,4,8-

Tabulka 4.1: Různé podmínky reakce 1,8-Bn<sub>2</sub>CAM (1 ekv.) s CbzCl (1 ekv.)

	kys.	„pH“ <sup>a</sup>	indikátor	HPLC int. intenz.			výtěžek	
				<b>3</b>	<b>7</b>	<b>7-x</b>	HPLC <sup>f</sup>	izol.
7a <sup>b</sup>	–	2,8	methylořanž	N/A	N/A	N/A	–	17 %
7b	HCl	2,6	methylořanž	14	33	53	35 %	24 %
7c <sup>c</sup>	HCl	2,6	methylořanž	68	18	14	14 %	5 %
7d	TFA	3,6	bromfenol. modř	63	2	35	1,6 %	–
7e	TFA	3,1	methylořanž	42	2	56	1,9 %	–
7f	TFA	2,6	thymol. modř	30	21	49	20 %	17 %
7g	TFA	1,6	thymol. modř	17	45	38	45 %	36 %
7h	TFA	1,5	– <sup>d</sup>	18	45	37	45 %	36 %
7i	TFA	1,3	thymol. modř	17	51	32	50 %	43 %
7j <sup>e</sup>	TFA	0,7	krystal. violet	7	48	45	52 %	41 %

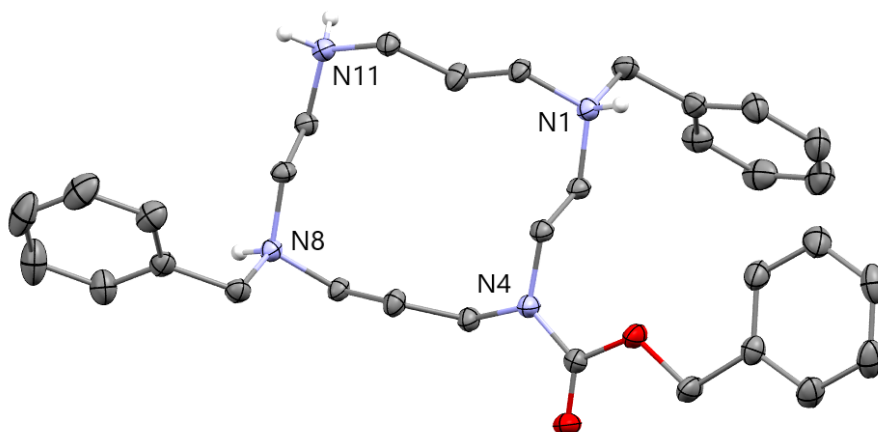
<sup>a</sup>Směs voda:1,4-dioxan = 1:1. <sup>b</sup>Výchozí látkou byl **3** · 4 HCl · 4 H<sub>2</sub>O (1,8-Bn<sub>2</sub>CAM · 4HCl · 4H<sub>2</sub>O). <sup>c</sup>Došlo k vysrážení hydrochloridu vých. látky **3**. <sup>d</sup>pH udržováno pomocí elektrody. <sup>e</sup>Během 10 dní bylo postupně přidáno 2,7 ekv. CbzCl (vzhledem k výchozímu 1,8-Bn<sub>2</sub>CAM). <sup>f</sup>Konverze vypočtená na základě integrální intenzity HPLC píků – viz 3.2.3.

tribenzylcyklam, který ve směsi může být přítomen buď od začátku (minoritní nečistota v **3**), nebo může vzniknout v průběhu reakce, pokud je v CbzCl přítomno nějaké množství BnCl (běžné v případě staršího CbzCl). Látka **7** a 1,4,8-tribenzylcyklam mají velmi podobnou afinitu ke stacionární fázi a nemusí se podařit je oddělit.

Z testovaných podmínek se jako nejvhodnější jeví reakce prováděné ve směsi voda/1,4-dioxan (dioxan je potřeba kvůli rozpustnosti reaktantů) při „pH“ ~ 1,3 až 1,5. V těchto případech se látku podařilo připravit opakovaně ve výtěžku kolem 40 %, reakce probíhá s rozumnou rychlostí a z reakční směsi lze regenerovat výchozí látku **3**. Byly rovněž vyzkoušeny další reakční podmínky, např. reakce v 70% kyselině octové nebo reakce za bazických podmínek, které ale vykazovaly nižší konverzi.

Látku **7** se podařilo vykrystalizovat v podobě **7** · 3 HCl · 2 H<sub>2</sub>O a krystaly byly charakterizovány pomocí rentgenové difrakce (Obr. 4.2). Strukturně nezávislá část odpovídá jedné vzorcové jednotce, tedy jedné molekule makrocyclu, třem chloridovým aniontům a dvěma molekulám vody. Konformace cyklamového kruhu je dle konvence podle Dalea (3,4,3,4)-A.[61] Všechny tři aminové skupiny makro-

cyklu jsou protonizovány a zapojují se do intermolekulárních vodíkových vazeb (s molekulami vody a chloridovými anionty).



Obrázek 4.2: Molekulová struktura kationtu  $H_37^{3+}$  z krystalové struktury látky  $7 \cdot 3 HCl \cdot 2 H_2O$ . Chloridové anionty a molekuly vody nejsou pro přehlednost zobrazeny (stejně jako vodíkové atomy vázané na atomech uhlíku).

Zavedení fosfonátového pendentního ramena (Schéma 4.1, B-2) bylo provedeno reakcí Mannichova typu látky **7** s paraformaldehydem v triethyl-fosfitu (použit v nadbytku jako rozpouštědlo). Pro rychlý průběh reakce je potřeba, aby výchozí látka **7** byla ve formě volného aminu, poté výchozí látka odreaguje během 2 až 3 dní. Pokud ale byla látka **7** použita ve formě trifluoracetátu (obsah TFA díky použité mobilní fázi při chromatografické separaci), reakce probíhala více než 14 dní. Odstranění triethyl-fosfitu bylo provedeno odpařením na RVO, avšak vzhledem k vysokému bodu varu ( $156\text{ }^\circ\text{C}$ ) je zapotřebí poměrně kvalitní vakuum (bylo zajištěno dvěma membránovými pumpami zapojenými v sérii). Odparek obsahoval látku **8**, diethyl-hydroxymethylfosfonát (přechází při extrakci do vodné fáze) a triethyl-fosfát, jenž se nepodařilo extrakcí ani chromatograficky oddělit. Rovněž byl učiněn pokus vysrážet makrocyclický produkt **8** (zavádění plynného HCl do ethanického roztoku) a oddělit látky tímto způsobem, avšak ani tento přístup nebyl úspěšný. Triethyl-fosfát lze snadno identifikovat v  $^{31}\text{P}$  i  $^1\text{H}$  NMR spektrech, při různých syntézách látky **8** byl v produktu přítomen v různém množství (50 % až 150 % vůči látce **8** dle integrální intenzity signálů v  $^{31}\text{P}$  NMR

spektrech).

Odstranění chránící benzyloxykarbonylové skupiny a současná hydrolyza esterových skupin (Schéma 4.1, B-3) zahříváním v 6M HCl pod zpětným chladičem poskytuje látku **5**. Chránící Cbz skupina je odstraněna během jednoho dne, avšak esterové skupiny jsou hydrolyzovány postupně a obě jsou odstraněny až po dvou dnech. Za těchto podmínek nelze docílit toho, aby byla odstraněna pouze chránící Cbz skupina (tj. vznikla látka **4**). Vstupní nečistota v této reakci – triethyl-fosfát – se hydrolyzuje na kyselinu trihydrogenfosforečnou. Jelikož následné zavádění fosfonátové skupiny na makrocyklus se provádí v kyselém prostředí a posléze je nutné směs chromatograficky čistit, nebyla v tomto kroku  $\text{H}_3\text{PO}_4$  od látky **5** oddělena, neboť pro další reakci nevádí a její odstranění v následném kroku je triviální.

Převedením látky **8** na látku **4** (Schéma 4.1, B-x) jsme se zabývali hlavně z důvodu možnosti potenciálního zavádění dalších pendatních ramen, které by vyžadovalo bezvodé podmínky. Použitím HBr v bezvodé kyselině octové docházelo ke vzniku směsi diesteru **4**, monoesteru a látky **5**, jejichž poměrné zastoupení ve směsi nešlo reprodukovatelně ovlivnit. Další zkoušená alternativa byla hydrogenace v bezvodém EtOH. Za těchto podmínek by neměly být odstraněny benzylové chránící skupiny, které jsou běžně odstraňovány hydrogenačně, avšak v kyselém prostředí. Bylo pozorováno, že benzyly skutečně nejsou ovlivněny a nedochází ani k deesterifikaci, vzniká pouze látka **4**, hydrogenační prostředí však nesmí obsahovat ani stopy kyseliny. Přetrvávajícím problémem je vstupní nečistota triethyl-fosfát, který se nepodařilo úplně chromatograficky oddělit (částečně putuje sloupcem silikagelu společně s látkou **4**).

Při přípravě látek **4** a **5** syntetickou cestou B se jako těžko odstranitelný ukázal vedlejší produkt triethyl-fosfát (vznikající stopovou oxidací triethyl-fosfitu, který se používá jako reagentie a zároveň jako rozpouštědlo při zavádění fosfonátové skupiny reakcí Mannichova typu). Lze ho ale odstranit v dalších reakčních krocích po přeměně na kyselinu trihydrogenfosforečnou. Alternativně by fosfonátová skupina mohla být zaváděna např. reakcí Mannichova typu s diethyl-fosfitem, paraformaldehydem a kyselinou trifluorocetovou (popř. s přísadkou báze), kde by nedocházelo ke vzniku triethyl-fosfátu (z časových důvodů však nebylo vyzkou-

šeno). Výhodou syntetické cesty B je nové orthogonální chránění cyklamů, které umožňuje zavádět různé pendantní skupiny a představuje tak obecný přístup, jak syntetizovat nesymetricky *trans*-disubstituované deriváty cyklamů.

#### 4.1.2 Zavedení druhé pendantní skupiny a odchránění

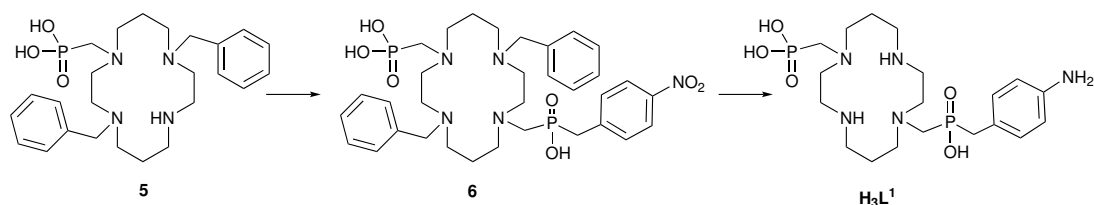
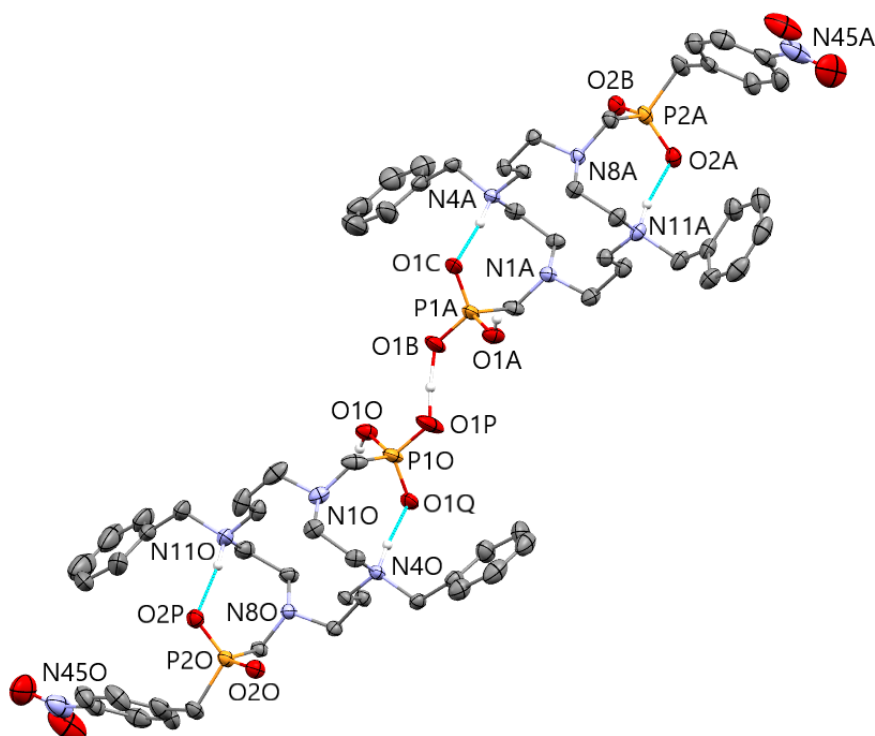


Schéma 4.2: Zavedení druhé pendantní skupiny a odchránění

Zavedení fosfinátové pendantní skupiny (Schéma 4.2) bylo provedeno reakcí Mannichova typu. Reakce látky **5** s paraformaldehydem a kyselinou *p*-nitrobenzylfosfinovou v prostředí kyseliny octové poskytuje látku **6**. Částečně také dochází k *N*-methylaci na látku **6-x** a vedlejším produktem je i kyselina hydroxymethyl-*p*-nitrobenzylfosfinová. Látka **6** byla izolována pomocí flash chromatografie na reverzní fázi. Byla získána látka ve formě trifluoracetátu, jež nebyla rozpustná v žádném rozpouštědle (pouze ve směsi, např. voda/acetonitril, voda/methanol). Látka byla rekrystalizována z horké vody a získané oranžové krystalky o složení  $6 \cdot 0,5 \text{ CF}_3\text{COOH} \cdot 5,5 \text{ H}_2\text{O}$  byly podrobeny rentgenostrukturní analýze (Obr. 4.3).

Strukturně nezávislou část tvoří dvě vzorcové jednotky, tj. dvě molekuly makrocyclu, jedna molekula trifluoracetátu a jedenáct molekul vody. Metylenfosfinátová skupina na dusíkovém atomu N8O je „disorderovaná“ do dvou pozic, z nichž je na Obrázku 4.3 znázorněna pouze varianta s vyšší okupací (79 %). Molekula trifluoracetátu rovněž zaujímá dvě možné pozice (tato molekula však – stejně jako molekuly vody – není na Obr. 4.3 zobrazena z důvodu značné nepřehlednosti). Cyklamový kruh zaujímá dle Daleovy konvence konformaci (3,4,3,4)-B.[61] Dusíkové atomy (N4A, N11A, N4O a N11O) nesoucí benzylové skupiny jsou protonizovány a zapojují se do intramolekulárních vodíkových vazeb. Fosfinátové skupiny jsou deprotonovány. Obě fosfonátové skupiny jsou monoprotionizovány (na kyslíkových atomech O1A a O1P) a další proton (pocházející formálně od kyseliny trifluoroctové) sdílí ve velmi krátké vodíkové vazbě propojující dvě molekuly

makrocyklu ( $d(\text{O1B}\dots\text{O1P}) = 2,413 \text{ \AA}$ ).

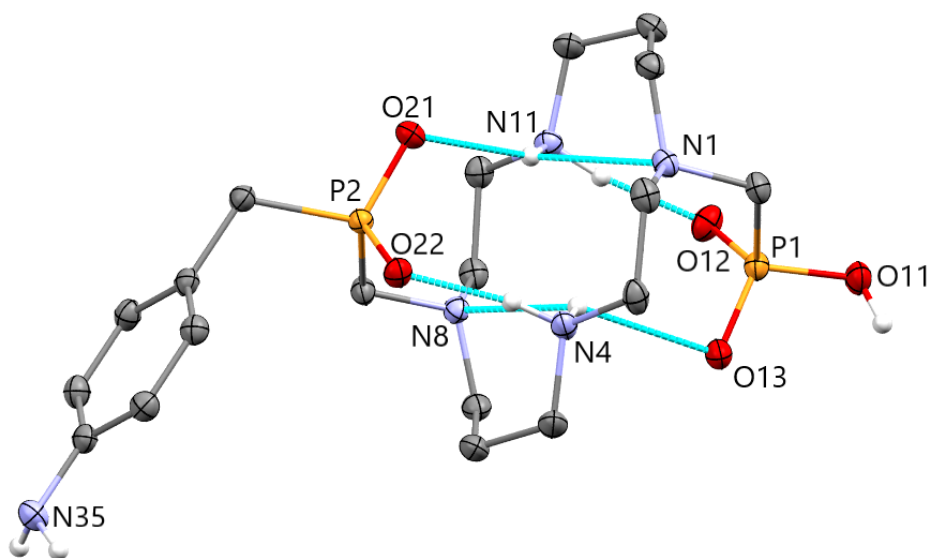


Obrázek 4.3: Část krystalové struktury látky **6** · 0,5 TFA · 5,5 H<sub>2</sub>O. Pro přehlednost nejsou zobrazeny molekuly vody a trifluoracetátový anion (stejně jako vodíkové atomy vázané na atomech uhlíku). Tyrkysově jsou vyznačeny intramolekulární vodíkové vazby.

Špatná rozpustnost látky **6** však komplikovala získání reprezentativních NMR spekter. Látku se sice podařilo převést na hydrochlorid (bílý prášek), ale rozpustnost se významně nezlepšila. NMR spektra musela být změřena v D<sub>2</sub>O se značným přídatkem NaOD (pH = 13,6). Složení látky ve formě hydrochloridu bylo určeno elementární analýzou. Výtěžek reakce (55%) byl určen pouze pro případ, kdy se vycházelo z čisté látky **5** (bez minoritního znečištění H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, tj. připravené syntetickou cestou A).

Hydrogenací v 50% AcOH byly odstraněny benzylové chránicí skupiny a redukována nitroskupina. Pokud je hydrogenována látka **6** · 0,5 TFA · 5,5 H<sub>2</sub>O v surové formě (po izolaci), je hydrogenace přibližně o třetinu delší, než pokud je před reakcí látka rekrystalizována (patrně díky stopovým nečistotám, které způsobují otravu katalyzátoru). Přestože po odstranění katalyzátoru jsme na základě NMR

spekter usuzovali, že se jedná o čistou látku, pomocí HPLC/MS byla odhalena nepatrná nečistota, kterou jsme nebyli schopni identifikovat. Ligand  $\text{H}_3\text{L}^1$  byl proto přečištěn chromatograficky na reverzní fázi a následně byla pomocí silného kationtového iontoměníče odstraněna kyselina trifluoroctová. Po těchto čistících krocích činil izolovaný výtěžek 65 %. Byly rovněž získány krystaly o složení  $\text{H}_3\text{L}^1 \cdot \text{EtOH} \cdot \text{H}_2\text{O}$  vhodné pro rentgenostrukturní analýzu (Obr. 4.4).



Obrázek 4.4: Molekulová struktura  $\text{H}_3\text{L}^1$  z krystalové struktury  $\text{H}_3\text{L}^1 \cdot \text{EtOH} \cdot \text{H}_2\text{O}$ . Molekuly vody a ethanolu nejsou zobrazeny (stejně jako vodíkové atomy vázané na atomech uhlíku). Tyrkysově jsou vyznačeny vodíkové vazby.

Strukturně nezávislá část odpovídá jedné vzorcové jednotce (jedna molekula makrocyclu, jedna molekula ethanolu a jedna molekula vody). Cyklamový kruh zaujímá konformaci (3,4,3,4)-C dle Daleovy konvence.[61] Dusíkové atomy N4 a N11 jsou protonizovány a zapojují se do vodíkových vazeb (Tab. 4.2).

Tabulka 4.2: Vybrané geometrie vodíkových vazeb v krystalové struktuře  $\text{H}_3\text{L}^1 \cdot \text{EtOH} \cdot \text{H}_2\text{O}$ .

D–H...A	$d(\text{D}\cdots\text{A})$ [Å]	$\angle\text{DHA}$ [°]
N4–H41...O22	2,682	170
N4–H42...O13	2,959	119
N11–H111...O21	2,870	138
N11–H112...O12	2,708	172

## 4.2 Měďnaté komplexy

Byly připraveny měďnaté komplexy ligandu  $\text{H}_3\text{L}^1$  s anorganickými solemi  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Cu}(\text{ClO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  a  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ . Po smíchání roztoku ligandu a roztoku vybrané soli kovu se tvoří modrý roztok komplexu s  $\text{pH} \sim 2,2$ . Komplex byl charakterizován pomocí HPLC/MS a UV-Vis spektroskopie. Bylo učiněno mnoho pokusů vykrytalizovat tyto komplexy, ale žádná z těchto snah nebyla úspěšná. Na základě dříve připravených měďnatých komplexů s příbuznými ligandy – tj. s 1,8-bis(methylenfosfonát)cyklamem ( $\text{H}_4\text{te2p}$ ) [17] a 1,8-bis[methylen-(*p*-aminobenzyl)fosfinát]cyklamem ( $\text{H}_2\text{te2pin}^{\text{BnNH}_2}$ ) [62] – lze usuzovat na izomerii připraveného komplexu. U těchto typů komplexů byly strukturně charakterizovány dva typy izomerů – pentakoordinovaný komplex (dále bude označován jako pc) a *trans*-O,O hexakoordinovaný komplex (označován jako hc).

V případě měďnatého komplexu  $\text{H}_4\text{te2p}$  vzniká při laboratorní teplotě modrý pc-komplex. Orientace substituentů na dusíkových atomech cyklu odpovídá konformaci I a jedna fosfonátová skupina není koordinována. U tohoto komplexu byly v oblasti UV pozorovány charge-transfer (CT) pásy při 270 nm a 310–325 nm, což odpovídá rozdílným Cu–O a Cu–N přechodům.[17]

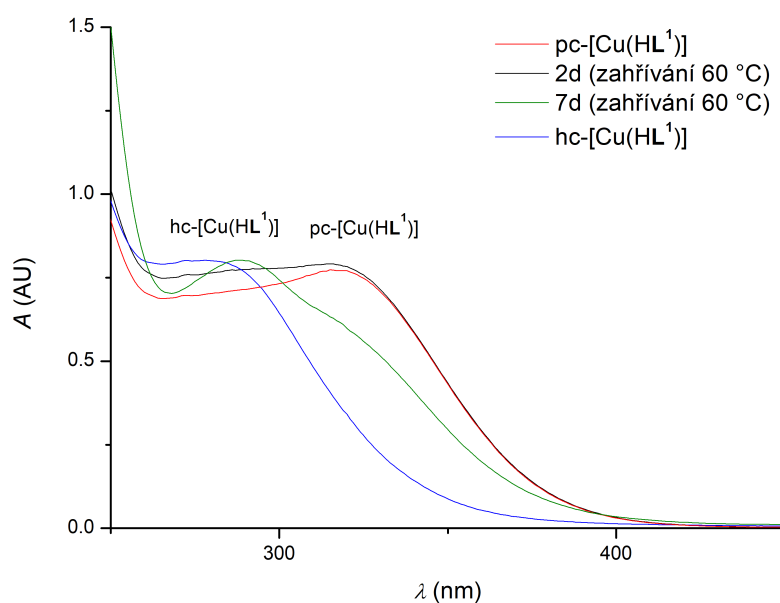
Zahřívání vodného roztoku pc-[Cu( $\text{H}_2\text{te2p}$ )] vede ke vzniku fialového termodynamického produktu *trans*-O,O-[Cu( $\text{H}_2\text{te2p}$ )]. Tato změna izomerie je velmi pomalá, s rozumnou rychlostí probíhá až při teplotách vyšších než 80 °C. Komplex hc-[Cu( $\text{H}_2\text{te2p}$ )] krystalizuje jako centrosymetrická molekula a centrální atom Cu(II) se nachází v oktaedrickém uspořádání s axiálním prodloužením. Čtyři dusíkové atomy jsou ekvatoriálně koordinovány (leží v rovině), zatímco kyslíkové atomy fosfonátových skupin jsou vůči sobě v *trans* pozici. Cyklam zaujímá nej-

běžnější *trans*-III konformaci.[17] V ultrafialové oblasti tento hc-komplex absorbuje při 275 nm.[17] V případě měďnatého komplexu 1,8-bis(*p*-aminobenzylfosfinát)cyklamu bylo pozorováno velmi podobné chování.[62] Fosfinátový ligand rovněž tvoří oba izomery, při laboratorní teplotě vzniká preferenčně pentakoordinovaný komplex, částečně ale také vzniká hc-komplex. Izomery však lze chromatograficky identifikovat a oddělit.[62]

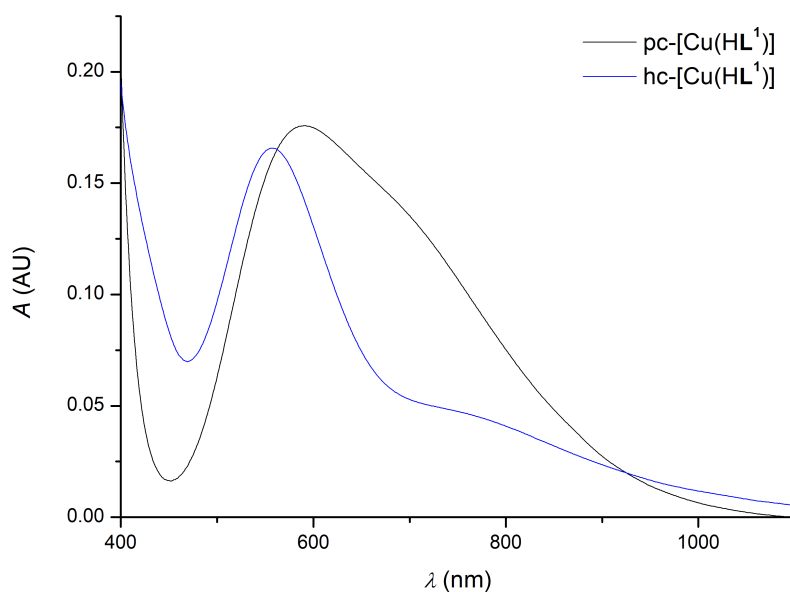
*Per analogiam* lze interpretovat i chování Cu(II) komplexu ligandu  $H_3L^1$ . V následujícím textu a obrázcích bude  $HL^1$  reprezentovat – pro jednoduchost – všechny různě protonizované částice (komplex  $[Cu(HL^1)]$  je neutrální).

Při pokojové teplotě se tvoří modrý pc-komplex, který má široký absorpční CT pás s maximem při 315 nm (Obr. 4.5) a ve velmi kyselém prostředí lze dobře pozorovat dva široké pásy při 270 nm a 305–318 nm (Obr. 4.8). Ve viditelné oblasti se nachází velmi široký pás d-d přechodů s maximem při 590 nm (Obr. 4.6). Zahříváním (60 °C) vodného roztoku pc-komplexu se pomalu mění izomerie komplexu na oktaedrické uspořádání, což lze pozorovat pomocí UV-Vis, kdy postupně narůstá absorpční pás hc-komplexu (278 nm, Obr. 4.5). Široký pás odpovídající d-d přechodům má maximum při 557 nm (Obr. 4.6).

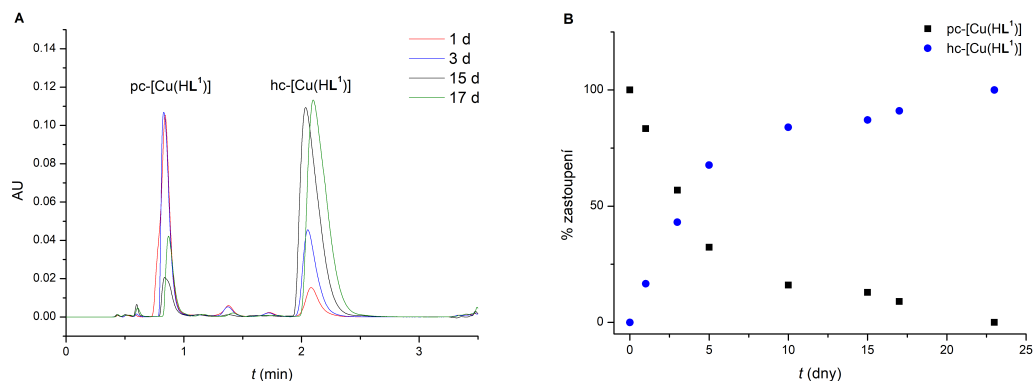
Změnu izomerie lze pozorovat i pomocí HPLC (Obr. 4.7-A). Úplná přeměna pc-komplexu na hc-komplex je relativně dlouhá (až 25 dní), což je vidět na Obr. 4.7-B, kde je znázorněna změna procentuálního zastoupení izomerů na základě intenzity odpovídajících HPLC píků (resp. plochy pod křivkou těchto píků). Pokusy o urychlení této přeměny (zahřívání v bazickém prostředí, pH  $\sim$  8) vedly k degradaci (ligand  $H_3L^1$  obsahuje v tomto ohledu problematickou aromatickou aminoskupinu).



Obrázek 4.5: Pozorování izomerie komplexu  $pc-[Cu(HL^1)]$  na  $hc-[Cu(HL^1)]$  pomocí UV-Vis spektroskopie. Pro ilustraci jsou zobrazena UV-Vis spektra výchozího  $pc$ -komplexu, spektra po 2 a 7 dnech zahřívání na  $60\text{ }^\circ\text{C}$  a spektrum finálního  $hc$ -komplexu (23 dní zahřívání).



Obrázek 4.6: UV-Vis spektra  $pc$ - a  $hc$ -komplexu s jejich d-d přechody.



Obrázek 4.7: Izomerizace pc-komplexu na hc-komplex. Zahřívání roztoku pc-[Cu(HL<sup>1</sup>)] (60 °C, pH ~ 2,2): HPLC záznam (254 nm) průběhu izomerie komplexu (A, vybraná měření) a změna procentuálního zastoupení izomerů s délkou reakce na základě plochy HPLC píků příslušných izomerů (B).

### 4.3 Disociační kinetiky

Studium kysele katalyzované disociace bylo provedeno spektrofotometricky pouze pro pc-komplex (u hc-komplexu lze předpokládat – stejně jako u podobných komplexů – velmi pomalou disociaci (v řádu měsíců), proto nebyl z časových důvodů zkoumán). Kinetika dekomplexace pc-komplexu byla studována při 25 °C, konstantní 5M iontové síle (H,Na)ClO<sub>4</sub> a s různou koncentrací HClO<sub>4</sub>. Ukázkový průběh časové změny spekter reakční směsi je uveden na Obr. 4.8-A,B.

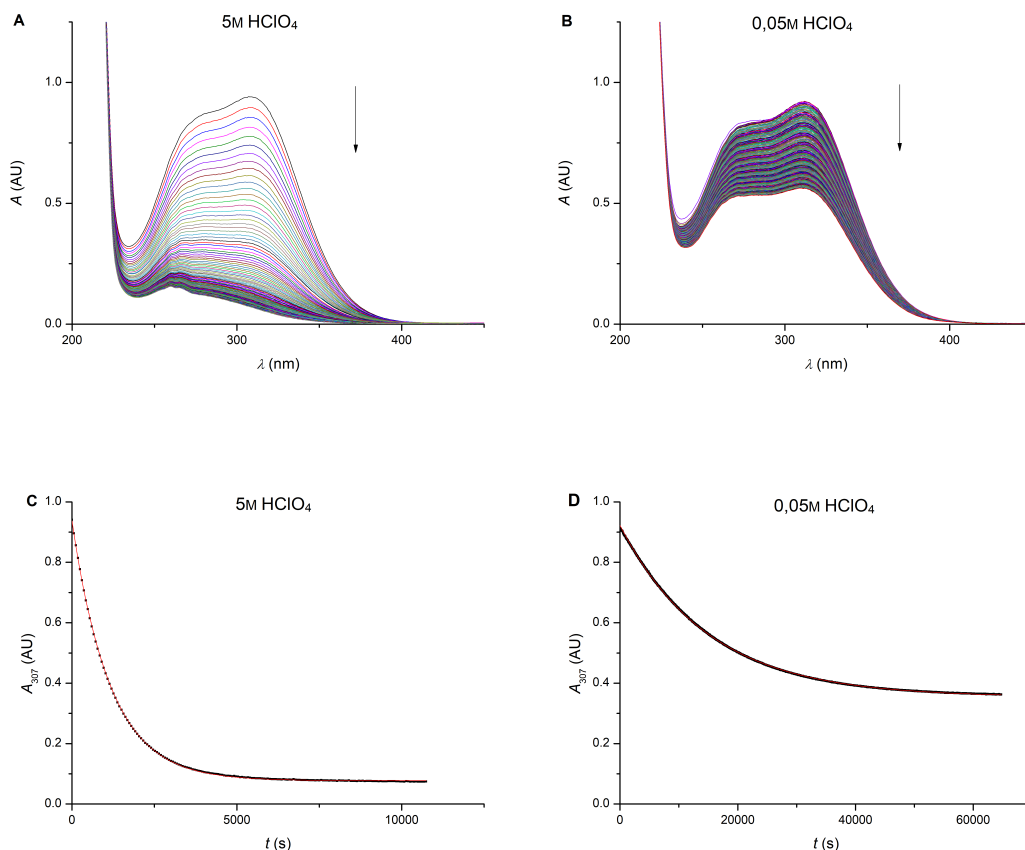
Byla sledována časová závislost absorbance při 307 nm (tj. maximum absorpčního pásu, Obr. 4.8-C,D), která byla následně fitována obecnou exponenciální funkcí (4.1) odpovídající kinetice (pseudo) 1. řádu:

$$A = A_0 e^{-k_{\text{obs}} t} + A_{\infty}, \quad (4.1)$$

kde  $A$  je absorbance,  $A_0$  je počáteční absorbance,  $A_{\infty}$  je konečná absorbance,  $t$  je čas a  $k_{\text{obs}}$  je pozorovaná rychlostní konstanta.

Závislost rychlostní konstanty,  $k_{\text{obs}}$ , na koncentraci HClO<sub>4</sub> byla vynesena do grafu (Obr. 4.9) a tato data byla fitována rovnicí (4.2):

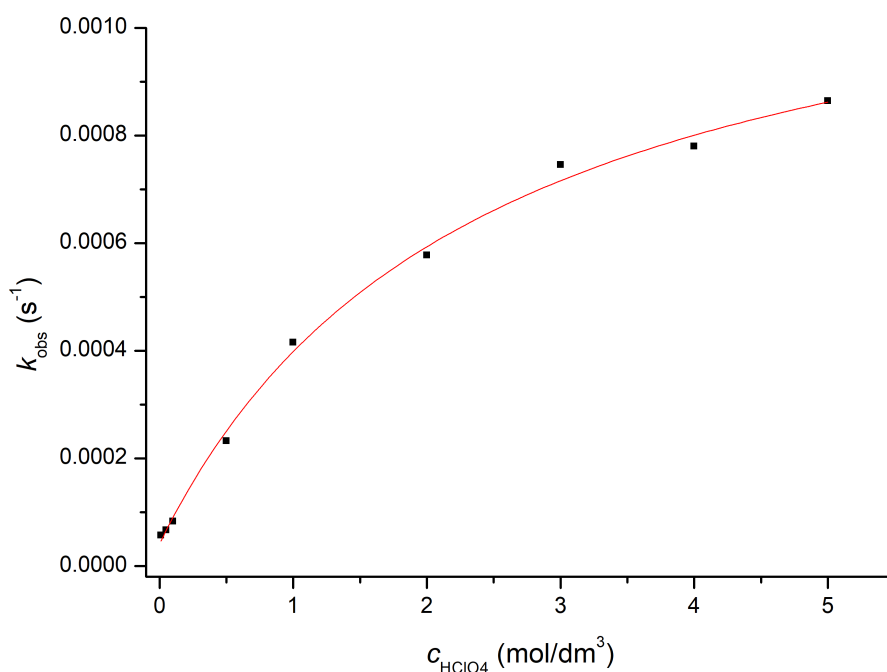
$$k_{\text{obs}} = \frac{k_0 + k_1 K[\text{H}^+]}{1 + K[\text{H}^+]}, \quad (4.2)$$



Obrázek 4.8: Ukázka disociace pc-komplexu v kyselém prostředí (25 °C,  $I[(\text{H},\text{Na})\text{ClO}_4] = 5 \text{ M}$ ,  $c(\text{komplex}) = 0,2 \text{ mM}$ ,  $c(\text{HClO}_4) = 5 \text{ M}$  pro A/C a  $0,005 \text{ M}$  pro B/D): změna spekter v průběhu měření (A, B) a závislost absorbance při 307 nm na čase (C, D). Spektra byla odečítána v intervalech po 60 s.

kteřá je v literatuře běžně používána u podobných disociačních reakcí. Tato rovnice (4.2) obsahuje tři parametry –  $k_0$  je rychlostní konstanta spontánní disociace,  $k_1$  je rychlostní konstanta kyselinou indukované disociace a  $K$  je odpovídající protonizační konstanta. Proměnnou veličinou je koncentrace protonů,  $[\text{H}^+]$ .

Získané parametry jsou uvedeny v Tab. 4.3. Velikost rychlostní konstanty  $k_1$  naznačuje, že komplex pc-[Cu(HL<sup>1</sup>)] je velmi kineticky inertní. V porovnání s výše zmiňovanými komplexy je podobně inertní jako pc-[Cu(te2pin<sup>BnNH2</sup>)] a nepatrně méně inertní než pc-[Cu(H<sub>2</sub>te2p)]. Vzhledem k tomu, že pc-[Cu(H<sub>2</sub>te2p)] patří mezi komplexy s největší inertností, které kdy byly připraveny, by měla být i tato nižší kinetická inertnost pro aplikace v radiomedicíně dostačující.



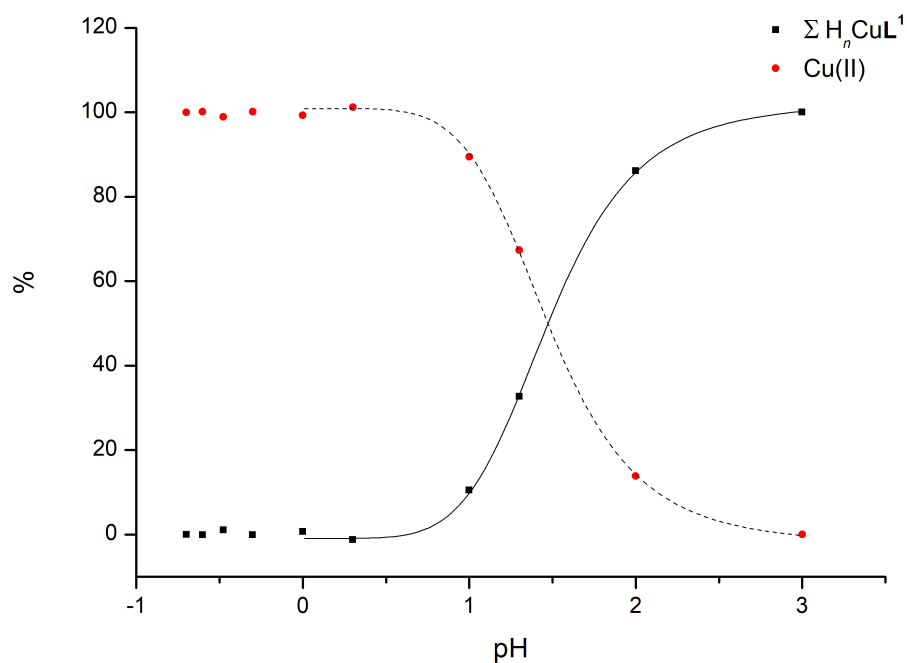
Obrázek 4.9: Závislost rychlostní konstanty pseudo-prvního řádu na koncentraci. Červená křivka je proložení bodů podle rovnice (4.2).

Tabulka 4.3: Kinetické parametry kyselě katalyzované disociace pro pc-[Cu(HL<sup>1</sup>)] a porovnání s literaturou.

komplex	$k_0$ (s <sup>-1</sup> )	$k_1$ (s <sup>-1</sup> )	$K$ (M <sup>-1</sup> )
pc-[Cu(HL <sup>1</sup> )]	$(4,1 \pm 1,3) \cdot 10^{-5}$	$(12,6 \pm 0,7) \cdot 10^{-4}$	$0,42 \pm 0,06$
pc-[Cu(H <sub>2</sub> te2p)] [17]		$(8,5 \pm 0,3) \cdot 10^{-4}$	$1,9 \pm 0,1$
pc-[Cu(te2pin <sup>BnNH2</sup> )] [62]		$(13 \pm 2) \cdot 10^{-4}$ *	$0,25 \pm 0,6$ *

\*Hodnoty pro měření při 30 °C. Ostatní hodnoty získané pro experimenty při 25 °C.

Jak si lze povšimnout na Obr. 4.8-C,D, systém se po určité době dostane do stavu, kdy již významně neklesá absorbance (tj.  $A = A_\infty$ ). Za předpokladu, že tato konečná absorbance pro nejvyšší koncentraci kyseliny,  $A_\infty(5\text{M})$ , odpovídá pouze absorbanci pozadí, tak hodnoty  $\Delta A_\infty(i) = A_\infty(i) - A_\infty(5\text{M})$  pro jednotlivá měření  $i$  odpovídají koncentraci nerozloženého komplexu. Pokud tyto hodnoty vydělíme hodnotou  $A_0$  (absorbance komplexu bez přítomnosti kyseliny při stejné iontové síle, tj. pouze roztok komplexu s chloristanem) a vyneseme v závislosti na pH, získáme body odpovídající svým rozložením distribučnímu diagramu zastoupení komplexu (v různě protonizovaných formách) v kyselé oblasti (Obr. 4.10).



Obrázek 4.10: Distribuční diagram komplexu v kyselé oblasti pH. Pro ilustraci je znázorněna i dopočítaná distribuce Cu(II) iontů. Křivky jsou rovněž znázorněny pro ilustraci („guide for eye“).

Závislost znázorněná na Obr. 4.10 dokresluje chování systému v kyselém prostředí. Stejně jako u srovnávaných příbuzných ligandů ( $H_4te2p$  a  $H_2te2pin^{BnNH_2}$ , kde byly provedeny i potenciometrické studie) se lze domnívat, že při  $pH > 3$  je ligand plně koordinován (tedy Cu(II) je v daném systému – Cu(II):L = 1:1, koncentrační škála  $10^{-4}$  M – zcela zakomplexována), a tudíž lze usuzovat, že komplex  $pc-[Cu(HL^1)]$  je termodynamicky stabilní.

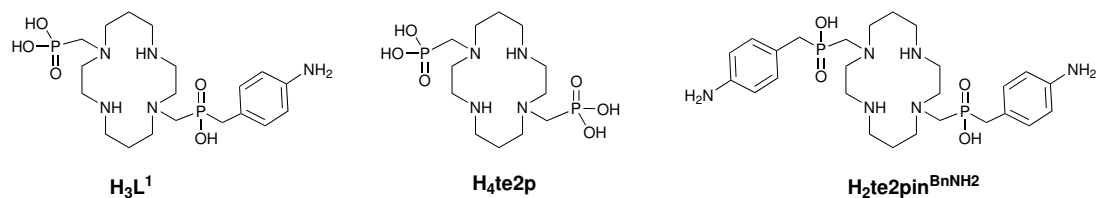
# Závěr

V rámci této diplomové práce byl alternativním několikakrokovým způsobem připraven ligand  $H_3L^1$  (poprvé ve větším množství). Syntetická cesta zahrnuje přípravu orthogonálně chráněného cyklamu, na který jsou následně postupně zaváděny pendantní skupiny. Značná pozornost byla věnována optimalizaci tohoto nového orthogonálního chránění, které je vhodným způsobem pro zavádění různých pendantních skupin a představuje tak obecný přístup pro přípravu nesymetricky *trans*-disubstituovaných derivátů cyklamu.

Byly připraveny oba očekávané izomery měďnatých komplexů ligandu  $H_3L^1$  a byly zkoumány vlastnosti těchto komplexů a přeměna mezi nimi pomocí UV-Vis spektroskopie a HPLC.

Rovněž byla studována kysele katalyzovaná disociace pentakoordinovaného komplexu. Přestože je zkoumaný komplex poněkud méně kineticky inertní než měďnatý komplex příbuzného ligandu  $H_4te2p$ , lze komplex  $pc-[Cu(HL^1)]$  označit za velmi kineticky inertní (srovnatelně s  $Cu(II)$  komplexem ligandu  $H_2te2pin^{BnNH_2}$ , Obr. 4.11).

Postačující kinetická inertnost měďnatého komplexu, výborná rozpustnost ve vodě a vhodná postranní bifunkční skupina pro konjugaci činí z ligandu  $H_3L^1$  perspektivního kandidáta pro využití v diagnostice a terapii pomocí radionuklidů mědi.



Obrázek 4.11: Ligand  $H_3L^1$  připravený v této práci a srovnávané příbuzné ligandy.

# Seznam použitých zkratek

**Ac** acetyl

**Bn** benzyl

**Boc** *t*-butyloxykarbonyl

**Bu** butyl

**Bz** benzoyl

**CAM** cyklam

**cb** cross-bridged

**Cbz** benzyloxykarbonyl

**CSD** Cambridge Structural Database

**CT** charge-transfer

**DCM** dichlormethan

**DIBAL-H** diisobutylaluminiumhydrid

**Et** ethyl

**HPLC** vysokoúčinná kapalinová chromatografie

**Me** methyl

**MRI** zobrazování pomocí magnetické rezonance

**MS** hmotnostní spektrometrie

**NBPin** kyselina *p*-nitrobenzylfosfinová

**NMR** nukleární magnetická rezonance

**PET** pozitronová emisní tomografie

**RT** room temperature, laboratorní teplota

**RVO** rotační vakuová odparka

**SPECT** jednofotonová emisní tomografie

**TFA** kyselina trifluoroctová

**TLC** tenkovrstevná chromatografie

**TMS** tetramethylsilan

**Troc** 2,2,2-trichlorethyloxykarbonyl

**Ts** tosyl

**UV** ultrafialový

**UV-Vis** ultrafialovo-viditelný

# Seznam použité literatury

- [1] J. M. Caillé, B. Lemanceau and B. Bonnemain, *American Journal of Neuroradiology*, 1983, **4**, 1041–1042.
- [2] U. Hennrich and M. Benešová, *Pharmaceuticals*, 2020, **13**, 1424–8247.
- [3] B. Gutfilen, S. A. Souza and G. Valentini, *Drug Design, Development and Therapy*, 2018, **12**, 3235–3245.
- [4] T. David, V. Kubíček, O. Gutten, P. Lubal, J. Kotek, H.-J. Pietzsch, L. Rulíšek and P. Hermann, *Inorganic Chemistry*, 2015, **54**, 11751–11766.
- [5] P. J. Blower, J. S. Lewis and J. Zweit, *Nuclear Medicine and Biology*, 1996, **23**, 957–980.
- [6] K. S. Woodin, K. J. Heroux, C. A. Boswell, E. H. Wong, G. R. Weisman, W. Niu, S. A. Tomellini, C. J. Anderson, L. N. Zakharov and A. L. Rheingold, *European Journal of Inorganic Chemistry*, 2005, **2005**, 4829–4833.
- [7] M. S. Cooper, M. T. Ma, K. Sunassee, K. P. Shaw, J. D. Williams, R. L. Paul, P. S. Donnelly and P. J. Blower, *Bioconjugate Chemistry*, 2012, **23**, 1029–1039.
- [8] X. Liang and P. J. Sadler, *Chemical Society Reviews*, 2004, **33**, 246–266.
- [9] M. Paúrová, T. David, I. Císařová, P. Lubal, P. Hermann and J. Kotek, *New Journal of Chemistry*, 2018, **42**, 11908–11929.
- [10] R. Delgado, V. Félix, L. M. P. Lima and D. W. Price, *Dalton Transaction*, 2007, **2007**, 2734–2745.
- [11] T. W. Price, J. Greenman and G. J. Stasiuk, *Dalton Transaction*, 2016, **45**, 15702–15724.
- [12] B. M. Zeglis and J. S. Lewis, *Dalton Transaction*, 2011, **40**, 6168–6195.
- [13] B. Bosnich, C. K. Poon and M. L. Tobe, *Inorganic Chemistry*, 1965, **4**, 1102.
- [14] M. A. Donnelly and M. Zimmer, *Inorganic Chemistry*, 1999, **38**, 1650–1658.

- [15] P. J. Connolly and E. J. Billo, *Inorganic Chemistry*, 1987, **26**, 3224–3226.
- [16] M. Bakaj and M. Zimmer, *Journal of Molecular Structure*, 1999, **508**, 59–72.
- [17] J. Kotek, P. Lubal, P. Hermann, I. Císařová, I. Lukeš, T. Godula, I. Svobodová, P. Táborský and J. Havel, *Chemistry – A European Journal*, 2003, **9**, 233–248.
- [18] I. Svobodová, J. Havlíčková, J. Plutnar, P. Lubal, J. Kotek and P. Hermann, *European Journal of Inorganic Chemistry*, 2009, **2009**, 3577–3592.
- [19] E. H. Wong, G. R. Weisman, D. C. Hill, D. P. Reed, M. E. Rogers, J. S. Condon, M. A. Fagan, J. C. Calabrese, K.-C. Lam, I. A. Guzei and A. L. Rheingold, *Journal of the American Chemical Society*, 2000, **122**, 10561–10572.
- [20] X. Sun, M. Wuest, G. R. Weisman, E. H. Wong, D. P. Reed, C. A. Boswell, R. Motekaitis, A. E. Martell, M. J. Welch and C. J. Anderson, *Journal of Medicinal Chemistry*, 2002, **45**, 469–477.
- [21] R. Ferdani, D. J. Stigers, A. L. Fiamengo, L. Wei, B. T. Y. Li, J. A. Golen, A. L. Rheingold, G. R. Weisman, E. H. Wong and C. J. Anderson, *Dalton Transaction*, 2012, **41**, 1938–1950.
- [22] L. Pazderová, T. David, V. Hlinová, J. Plutnar, J. Kotek, P. Lubal, V. Kubíček and P. Hermann, *Inorganic Chemistry*, 2020, **59**, 8432–8443.
- [23] T. J. Wadas, E. H. Wong, G. R. Weisman and C. J. Anderson, *Chemical Reviews*, 2010, **110**, 2858–2902.
- [24] T. J. Wadas, E. H. Wong, G. R. Weisman and C. J. Anderson, *Current Pharmaceutical Design*, 2007, **13**, 3–16.
- [25] I. M. Helps, D. Parker, J. Chapman and G. Ferguson, *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, 1988, **16**, 1094–1095.
- [26] I. Lukeš, J. Kotek, P. Vojtíšek and P. Hermann, *Coordination Chemistry Reviews*, 2001, **216-217**, 287–312.

- [27] J. Kotek, P. Vojtíšek, I. Císařová, P. Hermann, P. Jurečka, J. Rohovec and I. Lukeš, *Collection of Czechoslovak Chemical Communications*, 2000, **2000**, 1289–1316.
- [28] K. Bazakas and I. Lukeš, *Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions*, 1995, 1133–1137.
- [29] K. P. Pulukkody, T. J. Norman, D. Parker, L. Royle and C. J. Broan, *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2*, 1993, 605–620.
- [30] F. I. Bel'skii, Y. M. Polikarpov and M. I. Kabachnik, *Uspekhi Khimii*, 1992, **61**, 415–455.
- [31] R. Delgado, L. C. Siegfried and T. A. Kaden, *Helvetica Chimica Acta*, 1990, **73**, 140–148.
- [32] M. Paúrová, J. Havlíčková, A. Pospíšilová, M. Vetrík, I. Císařová, H. Stephan, H.-J. Pietzsch, M. Hrubý, P. Hermann and J. Kotek, *Chemistry – A European Journal*, 2015, **21**, 4671–4687.
- [33] J. Notni, P. Hermann, J. Havlíčková, J. Kotek, V. Kubíček, J. Plutnar, N. Loktionova, P. J. Riss, F. Rösch and I. Lukeš, *Chemistry – A European Journal*, 2010, **16**, 7174–7185.
- [34] J. Šimeček, O. Zemek, P. Hermann, H.-J. Wester and J. Notni, *ChemMedChem*, 2012, **7**, 1375–1378.
- [35] J. Rohovec, M. Kývala, P. Vojtíšek, P. Hermann and I. Lukeš, *European Journal of Inorganic Chemistry*, 2000, **2000**, 195–203.
- [36] P. Lubal, M. Kývala, P. Hermann, J. Holubová, J. Rohovec, J. Havel and I. Lukeš, *Polyhedron*, 2001, **20**, 47–55.
- [37] S. Liu, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2008, **60**, 1347–1370.
- [38] S. Bhattacharyya and M. Dixit, *Dalton Transactions*, 2011, **40**, 6112–6128.
- [39] J. R. Dunetz, J. Magano and G. A. Weisenburger, *Organic Process Research Development*, 2016, **20**, 140–177.

- [40] P. Thirumurugan, D. Matosiuk and K. Jozwiak, *Chemical Reviews*, 2013, **113**, 4905–4979.
- [41] F. Denat, S. Brandès and R. Guilard, *Synlett*, 2000, **2000**, 561–574.
- [42] I. M. Helps, D. Parker, J. R. Morphy and J. Chapman, *Tetrahedron*, 1989, **45**, 219–226.
- [43] B. Boitrel, B. Andrioletti, M. Lachkar and R. Guilard, *Tetrahedron Letters*, 1995, **36**, 4995–4998.
- [44] E. K. Barefield, F. Wagner and K. D. Hodges, *Inorganic Chemistry*, 1976, **15**, 1370–1377.
- [45] Z. Kovacs and A. D. Sherry, *Synthesis*, 1997, **1997**, 759–763.
- [46] G. R. Weisman, V. Johnson and R. E. Fiala, *Tetrahedron Letters*, 1980, **21**, 3635–3638.
- [47] G. R. Weisman, M. E. Rogers, E. H. Wong, J. P. Jasinski and E. S. Paight, *Journal of the American Chemical Society*, 1990, **112**, 8604–8605.
- [48] H. Yamamoto and K. Maruoka, *Journal of the American Chemical Society*, 1981, **103**, 4186–4194.
- [49] J. Kotek, P. Hermann, P. Vojtíšek, J. Rohovec and I. Lukeš, *Collection of Czechoslovak Chemical Communications*, 2000, **65**, 243–266.
- [50] G. Royal, V. Dahaoui-Gindrey, S. Dahaoui, A. Tabard, R. Guilard, P. Pullumbi and C. Lecomte, *European Journal of Organic Chemistry*, 1998, **1998**, 1971–1975.
- [51] R. W. Alder, E. Heilbronner, E. Honegger, A. B. McEwen, R. E. Moss, E. Olefirowicz, P. A. Petillo, R. B. Sessions and G. R. Weisman, *Journal of the American Chemical Society*, 1993, **115**, 6580–6591.
- [52] A. Comparone and T. A. Kaden, *Helvetica Chimica Acta*, 1998, **81**, 1765–1772.

- [53] M. Lachkar, R. Guilard, A. Atmani, A. De Cian, J. Fischer and R. Weiss, *Tetrahedron*, 1998, **37**, 1575–1584.
- [54] J. D. Chartres, L. F. Lindoy and G. V. Meehan, *Tetrahedron*, 2006, **62**, 4173–4187.
- [55] W. Yang, C. M. Giandomenico, M. Sartori and D. A. Moore, *Tetrahedron Letters*, 2003, **44**, 2481–2483.
- [56] J. Blahut, *Diplomová práce*, Univerzita Karlova, 2013.
- [57] Z. Kotková, L. Helm, J. Kotek, P. Hermann and I. Lukeš, *Dalton Transactions*, 2012, **41**, 13509–13519.
- [58] A. Hörnerová, *Bakalářská práce*, Univerzita Karlova, 2020.
- [59] I. Lukeš and P. Hermann, WO 03/008394 A1, 2003.
- [60] M. R. Willcott, *Journal of the American Chemical Society*, 2009, **131**, 13180–13180.
- [61] M. Meyer, V. Dahaoui-Gindrey, C. Lecomte and R. Guilard, *Coordination Chemistry Reviews*, 1998, **178-180**, 1313–1405.
- [62] J. Blahut, *Bakalářská práce*, Univerzita Karlova, 2011.