

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Chemie
Studijní obor: Medicinální chemie



Bc. Michal Chrappa

Syntéza fosfono-bis(fosfinátového) derivátu cyklámu
Synthesis of phosphono-bis(phosphinate) cyclam derivative

Diplomová práce

Vedoucí závěrečné práce
Prof. RNDr. Petr Hermann, Dr.

Praha, 2023

Prohlášení:

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

V Praze, dňa 17.5.2023

Michal Chrappa

Abstrakt

Radiofarmaka obsahující izotopy mědi jsou potenciálně využitelné pro diagnostiku (metody PET, SPECT) nebo léčbu nádorů. Radionuklidy mědi musí být do těla aplikované ve formě koordinační sloučeniny s vhodným ligandem. Pro mědnatý ion jsou jedny z nejvhodnějších ligandů deriváty 1,4,8,11-tetraazacyklotetradekanu (cyklamu). Výsledný komplex musí být termodynamicky stabilní a kineticky inertní. Ke koordinaci iontu kovu na ligand musí docházet v co možná nejkratším čase. V rámci této práce byl syntetizován jeden z prvních asymetricky substituovaných derivátů cyklamu s využitím dvou typů ortogonálního chránění makrocyclu. Syntetizovaný ligand obsahuje fosfonátové a methylen-bis(fosfinátové) pedantní rameno. Připravený byl taktéž mědnatý komplex tohoto ligandu a byla studována jeho disociační kinetika v kyselém prostředí.

Klíčová slova: radioterapie, PET, SPECT, komplexy mědi, deriváty cyklamu, fosfonové kyseliny

Abstrakt

Rádiofarmaká obsahujúce izotopy medi sú potenciálne využiteľné na diagnostiku (metódy PET, SPECT) alebo liečenie nádorov. Nuklidy medi musia byť do tela aplikované vo forme koordinačnej zlúčeniny s vhodným ligandom. Pre meďnatý ión sú jedny z najvhodnejších deriváty 1,4,8,11-tetraazacyklotetradekánu (cyklámu). Výsledný komplex musí byť termodynamicky stabilný a kineticky inertný. Ku koordinácii iónu kovu na ligand musí dochádzať v čo možno najkratšom čase. V rámci tejto práce bol syntetizovaný jeden z prvých asymetricky substituovaných derivátov cyklámu s využitím dvoch typov ortogonálneho chránenia cyklu. Syntetizovaný ligand obsahuje fosfonátové a metylén-bis(fosfinátové) pendantné rameno. Pripravený bol tiež meďnatý komplex tohto ligandu a študovaná bola jeho disociačná kinetika v kyslom prostredí.

Kľúčové slová: rádioterapia, PET, SPECT, komplexy medi, deriváty cyklámu, fosfónové kyseliny

Abstract

Radiopharmaceuticals containing copper isotopes can be used as diagnostic tools (methods PET, SPECT) or agents for tumour treatment. Copper radionuclides must be applied into the organism in the form of a coordination compound with suitable ligand. Derivatives of 1,4,8,11-tetraazacyclotetradecane (cyclam) are some of the most suitable ligands for Cu (II). A coordination compound must be thermodynamically stable and kinetically inert, the ligand must coordinate the metal ion as quickly as possible. In this Diploma thesis, one of the first unsymmetrically substituted derivatives of cyclam has been synthesized using two methods of orthogonal protection. The synthesized ligand contains one phosphonate and one methylene bis(phosphinate) pendant arm. Copper complex of the ligand was prepared, and its acid assisted dissociation kinetics were studied.

Key words: radiotherapy, PET, SPECT, copper complexes, cyclam derivatives, phosphonic acids

Pod'akovanie

Chcel by som sa pod'akovať svojmu školiteľovi za množstvo cenných rád, pripomienok a čas venovaný pri konzultáciach. Adamovi Svitkovi za poskytnutie metylén-bis(fosfinovej) kyseliny. Filipovi Kouckému za nameranie NMR charakterizačných spektier pripraveného ligandu na 600MHz spektrometre. Janovi Kubincovi za pomoc s meraním disociačných kinetík.

Ďakujem tiež všetkým kolegom zo skupiny za pomoc, rady a vytvorenie príjemnej atmosféry. Pod'akovanie patrí v neposlednom rade aj mojej rodine, ktorá ma počas celého môjho štúdia podporovala a vždy tu bola pre mňa.

Obsah

1	Teoretický úvod	3
1.1	Rádiomedicína	3
1.2	Diagnostické metódy a terapia	3
1.3	Rádioizotopy medi.....	5
1.4	Makrocyclické ligandy	7
1.5	Typy pendantných ramien	8
1.6	1,8-disubstituované deriváty cyklámu	11
2	Ciele práce	15
3	Experimentálna časť	16
3.1	Všeobecné postupy a použité chemikálie.....	16
3.2	Metódy delenia a charakterizácie	16
3.2.1	Tenkovrstvová chromatografia (TLC).....	16
3.2.2	HPLC a hmotnostná spektrometria.....	16
3.2.3	Chromatografia	17
3.2.4	NMR spektrometria	17
3.3	Syntetická časť.....	19
3.3.1	Schéma syntézy.....	19
3.3.2	Syntéza 1,8-dibenzyl cyklámu.....	20
3.3.3	Syntéza ortogonálne chráneného derivátu cyklámu	20
3.3.4	Spôsob zavedenia fosfonátového ramena na cyklám	24
3.4	Zavedenie metylén-bis(fosfinátového) ramena	26
3.5	Syntéza cieľového ligandu.....	31
3.6	Príprava meďnatého komplexu.....	33
3.7	UV-vis spektroskopia	33
3.8	Disociačné kinetiky	33
4	Diskusia.....	35
4.1	Syntéza ortogonálne chráneného derivátu cyklu	36
4.1.1	Reakcia A.....	36
4.1.2	Reakcia B.....	37
4.1.3	Reakcia C	37
4.1.4	Reakcia D.....	37
4.2	Spôsob zavedenia fosfonátového ramena na cyklám	38
4.2.1	Reakcia E	39
4.2.2	Reakcia F	39
4.2.3	Reakcia G.....	40
4.3	Zavedenie metylén-bis(fosfinátového) ramena – spôsob č. 1	40

4.3.1	Reakcia H.....	40
4.3.2	Reakcia I.....	40
4.3.3	Reakcia J.....	41
4.4	Zavedenie metylén-bis(fosfinátového) ramena – spôsob č. 2.....	41
4.4.1	Reakcia K.....	42
4.4.2	Reakcia L.....	42
4.4.3	Reakcia M.....	42
4.5	Syntéza cieľového ligandu.....	43
4.6	Meďnaté komplexy.....	44
4.7	Disociačné kinetiky.....	46
5	Záver.....	50
6	Zoznam použitých skratiek.....	51
7	Použitá literatúra.....	52

1 Teoretický úvod

1.1 Rádiomedicína

V 20. storočí došlo k veľkému rozvoju prírodných vied. Vznikali nové teórie, postupy a metódy skúmania prírody. V niektorých odboroch dochádzalo k vzniku celkom nových oblastí. Veda začínala byť čoraz viac prepojená s každodenným životom a mala čoraz väčší dopad aj na bežných ľuďoch. Jedným z najpozitívnejších príkladov takéhoto prepojenia je aplikácia poznatkov získaných z prírodných vied v medicíne. Jej dôsledkom bol aj vznik nového odboru, rádiomedicíny.

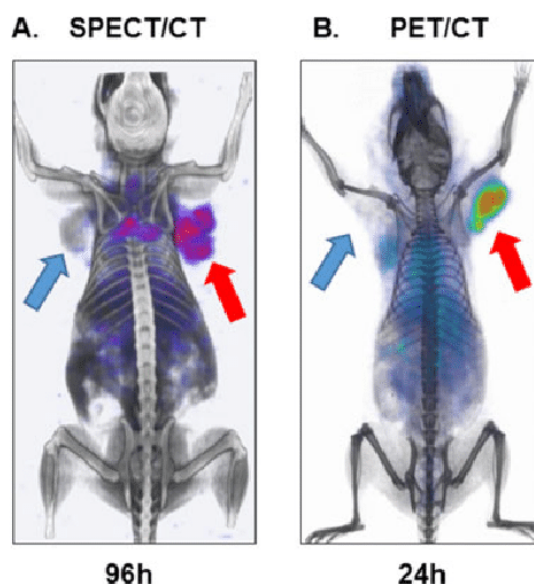
Rádiomedicína je pomerne moderný odbor, ktorý sa zameriava najmä na liečenie rakoviny, ale aj rôznych porúch endokrinného systému či zisťovanie kardiovaskulárnych ochorení. Jej úlohou je zachytiť chorobu v najskoršom možnom štádiu, zacieliť liečbu na konkrétne bunky, sledovať a vyhodnocovať odpoveď pacienta na podávanú liečbu. Liečivá obsahujúce rádioizotop používané na zobrazovanie ložiska sledovanej choroby (napríklad nádoru) alebo na liečbu choroby (odstránenie tohto ložiska) sa nazývajú rádiofarmaká. Rádionuklid prítomný v týchto liečivách podlieha rozpadu za uvoľnenia rádioaktívneho žiarenia. Podľa typu vyžiarenej častice sa používajú jednotlivé farmaká na diagnostiku alebo terapiu. Veľkou výhodou týchto metód je, že sú neinvazívne, teda pri nich nemusí dôjsť k chirurgickému zákroku. Rádiomedicínske zobrazovacie metódy poskytujú len obraz distribúcie kontrastnej látky, často je teda nutné ich kombinovať s obrazmi z CT (Computed Tomography), ktoré obsahujú anatomickú informáciu za vzniku tzv. „fused-images“. Ide o obrazy, pomocou ktorých je možné lokalizovať nádor na konkrétnom mieste v tele pacienta.

1.2 Diagnostické metódy a terapia

Pri lokalizácii ložiska choroby (diagnostika) sa využívajú tzv. γ -žiariče alebo β^+ -žiariče. Látky, ktoré vyžarujú fotón (γ -žiariče) sa používajú pri zobrazovaní metódou SPECT a látky, ktoré vyžarujú pozitron (β^+ -žiariče) sa využívajú pri diagnostike pomocou metódy PET. Pri metóde SPECT (Single-Photon Emission Computed Tomography) sledujeme detektorom vyžiarený fotón (s ideálnou energiou 100–250 keV)¹. Detektor sníma pacienta pod rôznymi uhlami a vytvára obrazy, ktoré sú nakoniec zrekonštruované do 3D podoby. Výhodou metódy SPECT je dobrá dostupnosť používaných nuklidov a relatívne nízka cena detektorov². Najpoužívanejšími izotopmi využívanými pri tejto metóde sú ^{99m}Tc a ^{123}I .²

Pri metóde PET (Positron Emission Tomography) nachádzajú svoje uplatnenie liečivá

obsahujúce β^+ -žiariče. Tieto nuklidy uvoľňujú v mieste nahromadenia rádiofarmaka v organizme pozitrony, následne dochádza k zrážke pozitronov s elektrónmi, anihilácii a vyžiareniu dvoch fotónov s energiou 511 keV. Tomograf PET zachytí fotóny, ktoré dopadajú na detektor v koincidencii a pod uhlom 180° . Na základe množstva zaznamenaných zrážok je vytvorená mapa distribúcie rádiofarmaka v orgánoch alebo študovaných tkanivách. Najpoužívanejším izotopom pri metóde PET je ^{18}F . Aplikuje sa v mnohých liečivách ako bioizoster atómu vodíka, príkladom je vôbec najčastejšie používané rádiofarmakum [^{18}F]-fluorodeoxyglukóza (^{18}F -FDG). Dôležitou výhodou metódy PET je jej presnosť. Tá spočíva v spôsobe detekcie, keďže vyžiarené fotóny zachytáva detektor v čo najkratšom rozstupe od dopadu naň (v rozmedzí 10–20 ns)³, a tiež v menšej energii emitovaných pozitronov, a tým aj krátkom dolete v tkanive.⁴ Vyššiu presnosť metódy PET oproti metóde SPECT ilustruje Obrázok 1.1.



Obrázok 1.1. Porovnanie presnosti zobrazovacích metód SPECT a PET. Sledované nádory sú vyznačené šípkami.⁵

Inou výhodou metódy PET, ktorá vychádza z povahy ďalšieho často používaného nuklidu ^{11}C , je to že značené farmaká sú často z chemického hľadiska nerozlíšiteľné od neznačených.² To umožňuje využiť fyziologickú distribúciu v tele na transport liečiva do žiadaného miesta a tým aj lokalizovanie cieľa terapeutického zásahu.

Terapia spočíva vo využívaní účinkov ionizujúceho žiarenia na tkanivo, konkrétne v schopnosti poškodzovať DNA, a tým spomaľovať rast nádorových buniek alebo ich priamo likvidovať. Rádiofarmakum musí byť špecificky dopravené k miestu pôsobenia, aby bola na pacienta vyvinutá čo možno najnižšia záťaž. Ďalšími dôležitými vlastnosťami z hľadiska potenciálnych vedľajších účinkov (a poškodenia okolitých zdravých buniek) sú polčas rozpadu

nuklidu a energia vyžiarenej častice. Najčastejšie sa používajú β^- -žiarice, príkladom takýchto nuklidov je ^{131}I (využívaný výlučne na terapiu porúch funkcie štítnej žľazy), ^{177}Lu alebo ^{90}Y . Skúmané sú α -žiarice, keďže emitované častice sú ťažšie a majú vyššiu kinetickú energiu, ale kratší dosah v tkanive a majú silnejší a presnejší účinok na cieľ terapeutického zásahu.⁶ Jediným schváleným rádiofarmakom tohto typu je Xofigo® (RaCl_2) obsahujúci nuklid ^{223}Ra , ktorý sa však používa len na paliatívnu terapiu kostných metastáz.⁶ Z tohto dôvodu predstavujú hlavnú skupinu rádioterapeutík farmaká obsahujúce β^- -žiarice.

Keďže rádioterapia je vyhradená takmer výlučne kovovým izotopom, začalo sa skúmať potenciálne využitie kovových rádionuklidov s využitím bohatých možností koordinačnej chémie, napríklad pre ióny rôznych prvkov d-bloku. Hlavným dôvodom výskumu rádioizotopov kovových prvkov je však ich variabilita v dĺžke polčasov rozpadu. To je významné najmä z hľadiska logistiky nutnej pre prípravu rádiofarmák, a tiež z hľadiska ich použitia pri zobrazovaní konkrétnych procesov v organizme. Dostatočne dlhý polčas rozpadu je potrebný na to, aby bolo možné rádioizotop/rádiofarmakum pripraviť, distribuovať na miesto vyšetrenia pacienta, dostať vo vhodnej forme do organizmu a dopraviť ho v organizme na cieľové miesto pomocou krvného riečiska. Pri tom všetkom je nutné brať do úvahy aj vedľajšie účinky na zdravie pacienta, dĺžka polčasu rozpadu by mala korešpondovať s farmakokinetikou rádiofarmaka. Rádioizotopy kovových prvkov sú preto predmetom intenzívneho výskumu a v tejto práci sa zaoberám syntézou a meraním vlastností látok, ktoré by potenciálne mohli viesť k rádiofarmakám založeným na izotopoch medi.

1.3 Rádioizotopy medi

Meď má množstvo rádioizotopov so širokým spektrom fyzikálnych vlastností (polčasov rozpadu, typov rozpadu aj energie vyžiarených častíc). To umožňuje použitie izotopov medi pri diagnostike aj terapii a konkrétnych špecifických aplikáciách. Najväčší význam majú izotopy ^{64}Cu a ^{67}Cu , no uvažovať sa dá aj o ďalších izotopoch, ktoré sú uvedené v tabuľke 1.1.

Tabuľka 1.1: Prehľad rádioizotopov medi, ich polčas a typ rozpadu, ktorému podliehajú.^{1,7}

Izotop	Polčas rozpadu (h)	Typ rozpadu	Zdroj
⁶⁰ Cu	0,4	β^+ (93 %), EZ (7 %)	cyklotrón
⁶¹ Cu	3,3	β^+ (62 %), EZ (38 %)	cyklotrón
⁶² Cu	0,2	β^+ (98 %), EZ (2 %)	generátor
⁶⁴ Cu	12,7	β^+ (19 %), EZ (41 %)	cyklotrón
		β^- (40 %)	
⁶⁶ Cu	0,1	β^- (100 %)	reaktor / cyklotrón
⁶⁷ Cu	62,0	β^- (100 %)	reaktor / cyklotrón / fotonukleárne reakcie

Najdôležitejším izotopom z hľadiska zobrazovacích techník je vďaka pomerne dlhému polčasu rozpadu a nízkej energii emitovaných pozitronov izotop ⁶⁴Cu, ktorý sa dá použiť na zobrazovanie pomocou metódy PET. Tento nuklid podlieha aj β^- rozpadu, a z tohto dôvodu by rádiofarmakum obsahujúce ⁶⁴Cu mohlo byť použité pri tzv. teranostike (terapia prebieha súčasne so zobrazovaním). Príkladom schváleného rádiofarmaka obsahujúceho izotop ⁶⁴Cu používaného na diagnostiku je peptidový analóg predávaný pod komerčným názvom Detectnet® ([⁶⁴Cu]-DOTATATE) používaný na zobrazovanie neuroendokrinných nádorov.⁸

Z hľadiska potenciálneho využitia pri terapii je najvýznamnejší izotop ⁶⁷Cu s najdlhším polčasom rozpadu spomedzi nuklidov medi ($\tau_{1/2} = 62,0$ h). Pri terapii ovplyvňuje dĺžka polčasu dobu pôsobenia rádiofarmaka na nádor v organizme, a tým aj účinnosť liečby. Polčas rozpadu ⁶⁷Cu je dostatočne dlhý na ničenie nádorových buniek, ale krátky na to, aby dochádzalo k nadbytočnému poškodeniu zdravého tkaniva.⁹ Napriek tomu sa aktuálne nepoužíva žiadne rádiofarmakum obsahujúce ⁶⁷Cu na terapiu. Najbližšie k schváleniu je peptidový analóg ([⁶⁷Cu]- SARTATE), potenciálne použiteľný na liečbu neuroblastómov, ktorý je vo fáze klinického testovania.¹⁰

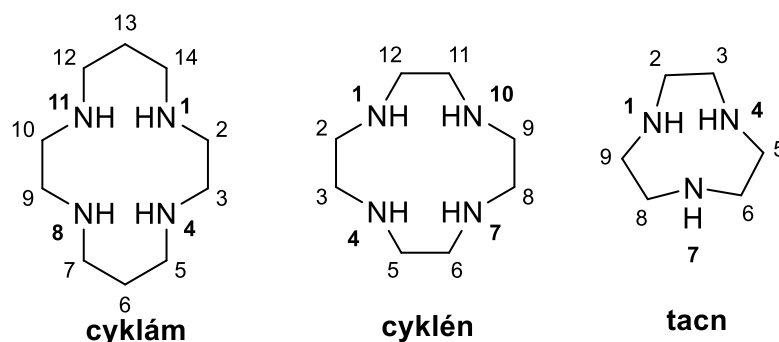
Kovový ión nemôže slúžiť samotný ako rádiofarmakum, pretože by dochádzalo k jeho nešpecifickému zabudovávaniu v tele. Kvôli minimalizácii vedľajších účinkov na zdravie pacienta sa používajú kovové izotopy vo forme koordinačných zlúčenín s vhodnými ligandami. Aby bola zaistená stabilita komplexov v organizme a nedochádzalo k vyviazaniu kovových iónov výhodnejšími ligandami, musia byť sledované koordinačné zlúčeniny termodynamicky

stále a kineticky inertné. Výhodou komplexov s Cu^{2+} je ich vyššia termodynamická stabilita v porovnaní s analogickými komplexami iných kovových prvkov 4. periódy. Jedným z dôvodov tejto zvýšenej stability je Jahn-Tellerov efekt, ktorým sa vyznačujú koordinačné zlúčeniny s Cu^{2+} vedúci k vysokej hodnote stabilizačnej energie ligandového poľa. Vyššiu termodynamickú stabilitu Cu^{2+} odzrkadľuje Irwing-Williamsova séria. Komplexy Cu^{2+} s bežnými jednoduchými ligandami však bývajú kineticky labilné, preto je nutné pre rádiofarmaká obsahujúce meďnatý ión nájsť vhodné ligandy tvoriace kineticky inertné komplexy.

Ďalšou dôležitou vlastnosťou je rýchlosť koordinácie ligandu na ión rádiokovu, ktorá určuje potenciál využitia aktivity nuklidu. Termodynamická stabilita, kinetická inertnosť a rýchlosť komplexácie je v koordinačných zlúčeninách definovaná vhodnými ligandami.

1.4 Makrocyclické ligandy

Vhodnými ligandami pre koordináciu iónu kovu sú hlavne ligandy zo skupiny makrocyclov. Dôvodom ich využívania je zvýšená termodynamická stabilita zapríčinená tzv. makrocyclickým efektom. Najčastejšie ide o deriváty troch polyazamakrocyclov, cyklámu (1,4,8,11-tetraazacyklotetradekán), cyklénu (1,4,7,10-tetraazacyklododekán) a tacn (1,4,7-triazacyklononán) (Obrázok 1.2.).



Obrázok 1.2. Príklady makrocyclov, ktorých deriváty sú najčastejšie používané pri komplexácii iónov rádioaktívnych kovov

Meď sa v koordinačných zlúčeninách vyskytuje v oxidačnom stave I^+ a II^+ . Využitie komplexov Cu^+ v rádiofarmácii je zanedbateľné, pretože komplexy, ktoré meďný ión tvorí, sa nepovažujú za dostatočne kineticky inertné. Z tohto dôvodu sa ďalej budeme zaoberať ligandami, ktoré sú vhodné pre ión Cu^{2+} .

Ligandy založené na vyššie uvedených makrocycloch sú vhodné pre ión Cu^{2+} vďaka jeho povahe. Katión Cu^{2+} je na základe teórie tvrdých a mäkkých kyselín a báz vďaka svojej

veľkosti náboja a polomeru zaradovaný do strednej kategórie medzi tvrdé a mäkké kyseliny. Z toho vyplýva, že vhodnými ligandami pre ión Cu^{2+} sú ligandy obsahujúce dusíkové amínové donory. Táto práca sa zameriava konkrétne na deriváty cyklámu, ktorého kavita (tj. priestor vnútri makrocyklu) je presne vhodná pre koordináciu Cu^{2+} iónu a obsahuje štyri amínové skupiny schopné koordinácie v ekvatoriálnej polohe.

Pretože cyklám koordinuje meďnatý katión do roviny medzi štyri atómy dusíka dochádza k vzniku komplexov, ktoré sú stabilné *in vivo*.⁷ Nevýhodou koordinačných zlúčenín obsahujúcich ligand, ktorý je derivátom cyklámu, je pomalšia komplexácia iónu kovu, čo zapríčiňuje obtiažnejšiu prípravu rádiofarmák (je napríklad nutné používať vyššie teploty pri rádioznačení).

Dôležitá je tiež termodynamická preferencia derivátov cyklámu pre Cu^{2+} ión oproti iónu Zn^{2+} a Ni^{2+} vyplývajúca z Irwing-Williamsovej série. Okrem toho, že sa Zn^{2+} ión nachádza bežne v organizme a po aplikácii farmaka by mohlo dochádzať k uvoľňovaniu rádioaktívneho nuklidu medi, sú zinočnatý a nikelnatý ión častými nečistotami pri produkcii izotopov medi. Tie sa totiž vyrábajú ostreľovaním terčov zo zinku alebo niklu.⁷

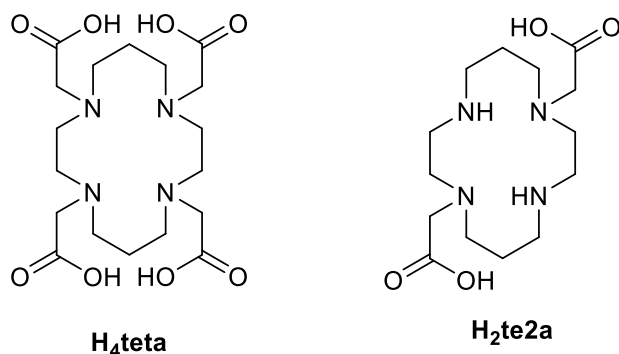
Termodynamická stabilita, kinetická inertnosť aj rýchlosť komplexácie iónu kovu na cyklám sa dajú vylepšovať zavádzaním vhodných pendantných ramien na voľné aminoskupiny cyklu.

1.5 Typy pendantných ramien

Pendantné ramená obsahujúce skupinu, ktorá sa koordinuje na ión kovu, pomáhajú tento ión stabilizovať v kavite makrocyklu a zvyšujú tým termodynamickú stabilitu takéhoto komplexu. Pripravené boli deriváty cyklámu s rôznym počtom koordinujúcich sa pendantných ramien, napríklad pendantov s metylkarboxylovými (tzv. acetátovými) skupinami (Obrázok 1.3.). Zistilo sa, že optimálne vlastnosti majú komplexy, v ktorých je ión kovu koordinovaný šiestimi donorovými atómami (tj. cyklám je modifikovaný iba dvoma koordinujúcimi sa pendantnými ramenami).¹¹ Pripravené boli komplexy ligandu $\text{H}_2\text{te}2\text{a}$ s iónmi Cu^{2+} , ktoré vykazovali vysokú kinetickú inertnosť.¹² Nevýhodou tohto ligandu môže byť vedľajšia reakcia, ktorá prebieha vo vodných roztokoch pri laboratórnej teplote. Ide o vznik tricyklického laktámu medzi karboxylovou skupinou pendantného ramena a voľnou sekundárnou amínovou skupinou.¹³

V prípade, že ligand obsahuje viac pendantných ramien, má výsledná koordinačná zlúčenina nižšiu kinetickú inertnosť (dochádza k vyvázovaniu iónu kovu *in vivo*), čo bolo

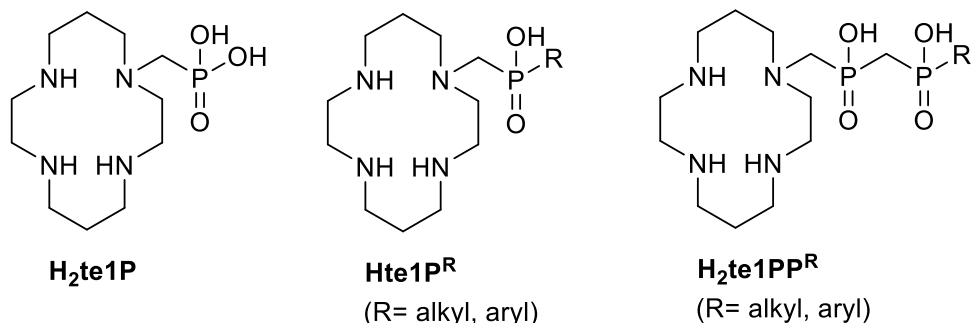
potvrdené napr. na komplexe H_4teta s Cu^{2+} .¹⁴



Obrázok 1.3. Deriváty cyklámu obsahujúce karboxymetylové pendentné ramená

Ďalším typom pendentných ramien, ktorými sú upravované makrocykly, sú ramená odvodené od kyselín fosforu. Tieto ramená je možné, na rozdiel od acetátových ramien, ďalej modifikovať na atóme fosforu (v prípade fosfonátového ramena vo forme esteru a v prípade fosfinátového ramena vo forme *P*-alkylu).

Pre pochopenie ďalšieho textu je nutné vysvetliť názvoslovie organických kyselín odvodených od kyselín fosforu, a teda aké koordinujúce ramená sú používané pre modifikáciu azamakrocyklov. Tieto kyseliny sa dajú formálne odvodiť nahradením $-OH$ skupín v kyseline fosforečnej, alebo nahradením väzby $P-H$ v kyseline fosforitej alebo fosfornej, organickým reťazcom. Fosfonátové rameno (Obr.1.4.- H_2te1P) je teda formálne odvodené od kyseliny fosforitej, fosfinátové rameno (Obr.1.4.- $Hte1P^R$) je odvodené od kyseliny fosfornej a bis(fosfinátové) rameno (Obr.1.4.- H_2te1PP^R) od dvoch molekúl kyseliny difosforenej spojenjej cez metylénový mostík (túto skupinu by bolo možné tiež považovať za derivát kyseliny difosforečnej).



Obrázok 1.4. Deriváty cyklámu obsahujúce pendentné ramená odvodené od kyselín fosforu

Z chemickej podstaty ramien odvodených od kyselín fosforu vychádzajú rôzne

odlišnosti od acetátových ramien. Na prvý pohľad je badateľná odlišná geometria. Ramená odvodené od kyselín fosforu sú tetraedrické na rozdiel od planárnych metylkarboxylových ramien. Fosfonátové rameno je kyslejšie (pri deprotonizácii do prvého stupňa),¹⁵ bázicitu amínových skupín však skupina fosfonátová zvyšuje (kvôli repulzií negatívnych nábojov na atómoch kyslíka tejto skupiny, keď je plne deprotonovaná). Fosfinátové rameno, naopak bázicitu aminoskupín cyklu znižuje (repulzia negatívneho náboja je menšia, a preto prevláda efekt fosfinátovej skupiny, ktorá odťahuje elektróny z aminoskupiny cyklu).¹⁶ Elektróny odťahujúci efekt fosfinátovej skupiny, sa ale dá modifikovať pomocou ďalšieho substituentu na atóme fosforu. Bázicita aminoskupín cyklámu ovplyvňuje termodynamickú stabilitu komplexu Cu^{2+} s derivátom makrocyklu. Týmto vplyvom je tiež mierne modifikovaný príspevok makrocyclickeho efektu k stabilite koordinačnej zlúčeniny.¹⁶

Vďaka tomu, že fosfonátové alebo fosfinátové rameno je kyslejšie, dochádza ku komplexácii iónu kovu už pri nižších hodnotách pH než pri derivátoch s acetátovými ramenami, čo však súčasne znamená, že pendantné rameno môže byť náchylnejšie k substitúcii inými ligandami. Pretože pre termodynamickú stabilitu je rozhodujúca bázicita amínových skupín makrocyklu, sú komplexy ligandov s fosfonátovými pendantnými ramenami obvykle termodynamicky stabilnejšie než komplexy ligandov s acetátovými pendantami. V prípade komplexov s makrocyklami s fosfinátovými pendantami je bázicita ich amínových skupín nižšia než v prípade makrocyklov s acetátovými pendantnými ramenami, a preto sú komplexy makrocyklov s fosfinátovými ramenami menej termodynamicky stabilné než analógy s acetátovými ramenami.

Na objasnenie vplyvu fosfonátového alebo fosfinátového ramena na urýchlenie rýchlosti komplexácie je nutné pochopiť mechanizmus koordinácie iónu kovu makrocyclickými ligandami.

Prvým krokom komplexácie kovu na derivát makrocyklu s koordinujúcim pendantným ramenom je predradená rovnovážna reakcia, pri ktorej dochádza ku koordinácii iónu kovu na pendantné rameno/ramená (amínové skupiny makrocyklu sú protonizované). Vzniká tzv. „*out-of-cage*“ komplex. Tento prvý krok je nasledovaný krokom určujúcim rýchlosť komplexácie. Dochádza v ňom k bázicky katalyzovanému odstráneniu protónu z kavity makrocyklu (z priestoru medzi atómami dusíka makrocyklu) za súčasného presunu iónu kovu koordinovaného pendantnými ramenami do uvoľnenej kavity makrocyklu za vzniku konečného „*in-cage*“ komplexu.

Fosfonátové rameno dokáže urýchľovať proces komplexácie, pretože napomáha odstraňovaniu protónu z kavity makrocyklu. Ďalší dôvod urýchlenia komplexácie spočíva

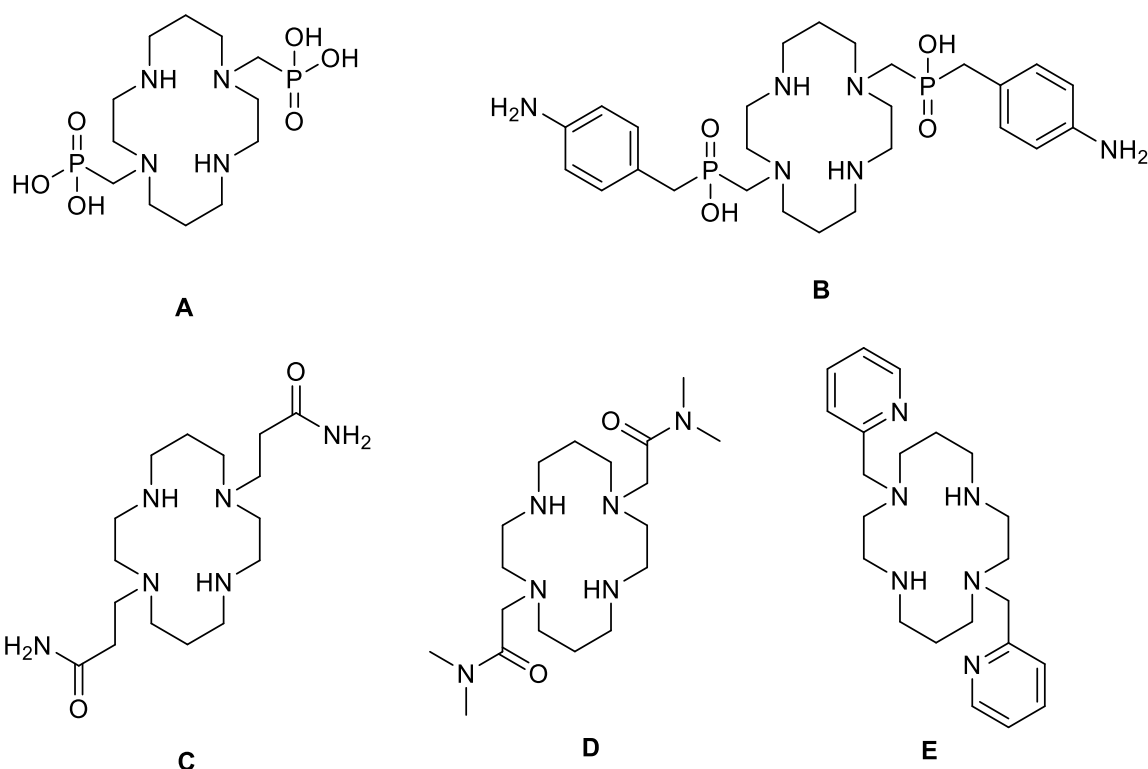
v uľahčenom vzniku „*out-of-cage*“ komplexu (predradenom naviazaní iónu kovu na fosfonátové pendantné rameno), pretože samotná fosfonátová skupina tvorí relatívne stabilné komplexy. Podobne môže ión kovu chelátovať bis(fosfinátová) skupina (hoci je málo bázická), a preto tvorí relatívne stabilný „*out-of-cage*“ komplex. Treba brať do úvahy, že vytvorený „*out-of-cage*“ komplex musí mať optimálnu termodynamickú stabilitu vo vzťahu k stabilite výsledného komplexu iónu kovu s derivátom makrocyklu.¹¹ Obe tieto pendantné ramená obsahuje cieľový ligand tejto práce. Mali by teda urýchľovať koordináciu iónu kovu na tento derivát cyklámu. Bis(fosfinátové) rameno vytvorením optimálne stabilného „*out-of-cage*“ komplexu a fosfonátové rameno odstránením protónu z kavity makrocyklu.

Ďalšou výhodou pendantných ramien odvodených od kyselín fosforu oproti acetátovým je ich väčšia hydrofilnosť, ktorá by mala zabezpečiť jednoduchšie vylučovanie radiofarmák z tela pomocou obličiek. Výnimku môžu tvoriť deriváty makrocyklov s bis(fosfonátovými)¹ pendantnými ramenami, ktoré majú zvýšenú afinitu k hydroxyapatitu a je možné pozorovať ich vychytávanie v kostiach.¹⁷ Makrocykly s fosfinátovou alebo bis(fosfinátovou) skupinou môžu tiež byť tzv. bifunkčnými ligandami (tj. ligandami s možnosťou konjugácie na biologicky aktívnu molekulu), v ktorých je reaktívnou skupinou v uhlíkovom reťazci modifikovaný atóm fosforu, pričom sa táto skupina nepodieľa na koordinácii iónu kovu v „*in-cage*“ komplexe.

1.6 1,8-disubstituované deriváty cyklámu

V predchádzajúcej kapitole bolo uvedené, že optimálne je modifikovať derivát cyklámu práve dvoma koordinujúcimi pendantnými ramenami. Pripravených bolo mnoho takýchto derivátov, pričom prevažujú tzv. *trans* deriváty cyklámu (tj. disubstituované v polohe 1,8-) nad tzv. *cis* derivátmi (tj. disubstituované v polohách 1,4- alebo 1,11-). Jedným z hlavných dôvodov preferencie *trans* derivátov je ich jednoduchšia syntetická dostupnosť. V predchádzajúcej kapitole bol už spomínaný ligand H₂te2a (Obr. 1.3.), ktorý obsahoval dve acetátové ramená, v tejto kapitole sú spomenuté niektoré ďalšie príklady 1,8- disubstituovaných derivátov cyklámu, na ktorých je možné demonštrovať vplyv určitých typov ramien na vlastnosti výslednej koordinačnej zlúčeniny, ale tiež rôzne zákonitosti syntézy tohto typu látok.

¹ Deriváty metylén-bis(fosfonátovej) kyseliny (H₂O₃P-CH₂-PO₃H₂)



Obrázok 1.5. Príklady disubstituovaných derivátov cyklámu

V predchádzajúcej kapitole bol nepriamo spomínaný derivát cyklámu obsahujúci dve fosfonátové pendantné ramená (Obr.1.5.-A). Jednou z výhod tohto derivátu oproti H_2te_2a , ktoré ešte neboli spomenuté je, že je stabilný vo vodnom roztoku (nedochádza k jeho spontánnej laktamizácii). Pri príprave komplexu tohto ligandu s Cu^{2+} iónom sa zistilo, že koordinačná zlúčenina, ktorá vznikla pri nižšej teplote mala pentakoordinovaný tvar (jedna fosfonátová skupina ostáva nekoordinovaná). Pri vyššej teplote vzniká komplex, v ktorom je meďnatý ión hexakoordinovaný vo forme oktaédra. Oba komplexy vykazovali značnú kinetickú inertnosť.¹⁸ Pri porovnaní s inými iónmi prechodných kovov vykazoval tento derivát značnú termodynamickú selektivitu voči iónom Cu^{2+} .¹⁹

Ďalšou variantou derivátu cyklámu s pendantným ramenom odvodeným od kyseliny fosforu je cyklám obsahujúci *p*-aminobenzylfosfinové rameno (Obr.1.5.-B). Od tohto ligandu bol pripravený komplex s iónom Cu^{2+} v oboch formách spomínaných v predchádzajúcom odstavci. Pripravený bol konjugát tohto makrocyklu na modelový aminosacharid (glukozamín). Tu bolo využité, že modifikované fosfinové rameno môže okrem koordinácie iónu kovu slúžiť aj ako tzv. linker pre konjugáciu s biomolekulou, ktorá slúži na špecifické zavedenie rádiofarmaka na miesto pôsobenia v organizme.²⁰

Amidová skupina môže byť tiež využitá ako koordinujúce pendantné rameno.

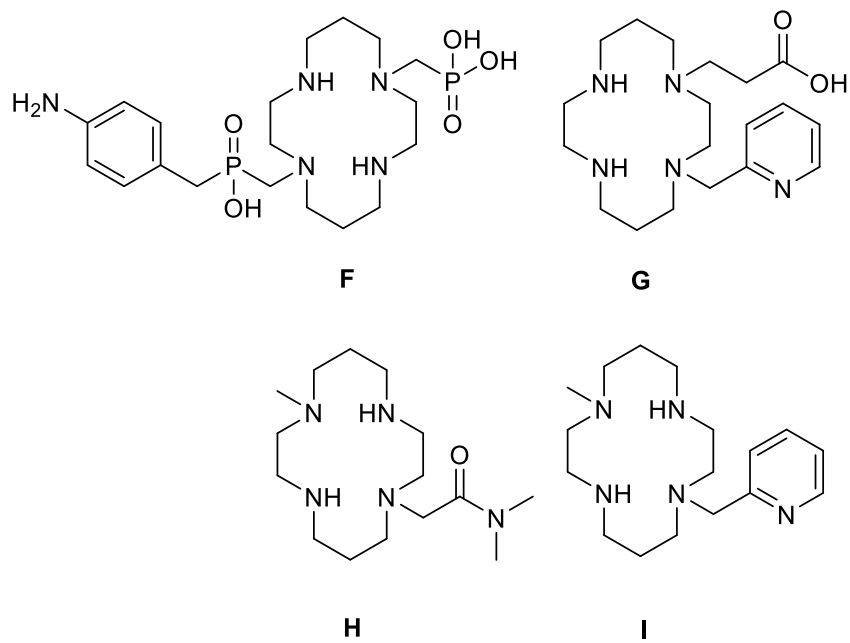
Pripravený bol derivát cyklámu obsahujúci dve *n*-propylamidové ramená (Obr.1.5.-C).²¹ Pri syntéze tejto zlúčeniny boli preskúmané možnosti vzniku rôznych derivátov cyklámu pri disubstitúcii na nechránený cyklus. Bolo zistené, že uvedený 1,8-produkt vznikal v prebytku oproti 1,11-substituovanému produktu. Okrem stérických faktorov prispieval k vzniku 1,8-disubstituovaného produktu aj fakt, že vodíková väzba, ktorá sa nachádza medzi atómom dusíka v polohe 1- a v polohe 8- bola pri vzniku monosubstituovaného intermediátu porušená. Následná reakcia teda prebiehala preferovane na atóme dusíka, ktorý nebol viazaný vodíkovou väzbou.²¹

Iným karboxamidovým derivátom je cyklám obsahujúci dve *N,N*-dimetyl-acetamidové ramená (Obr.1.5.-D), z ktorého bol pripravený aj komplex s Cu^{2+} . Hlavný efekt kratšieho pendantného ramena je, že vo výslednom komplexe bude pendantné rameno súčasťou päťčlenného chelátového kruhu s iónom kovu, ktorý je stabilnejší oproti kruhu šesťčlennému. Pripravené boli obe formy komplexu (pentakoordinovaná aj hexakoordinovaná). Bolo zistené, že hexakoordinovanú formu bolo možné vytvoriť aj pri izbovej teplote pri zvýšenom pH, takže kľúčová pre tvorbu oktaedrického komplexu bola aj konformácia voľného makrocyklu, ktorá súvisela so stupňom protonizácie.¹²

Derivát cyklámu obsahujúci (pyrid-2-yl)-metylové pendantné ramená (Obr.1.5.-E) bol pripravený s využitím bis-(aminálového) chránenia² cyklámu alkylačnou reakciou s 2-(chlórmetyl)pyridínom s vysokým výťažkom a bez pozorovaného vzniku vedľajších produktov.²²

Zavedením rôznych ramien na makrocyklus je možné vzájomne skombinovať ich výhody. Výsledkom sú tzv. nesymetricky substituované deriváty cyklámu. O obtiažnosti ich syntézy svedčí fakt, že známe sú iba dva deriváty obsahujúce dve odlišné koordinujúce pendantné ramená. Jedným je derivát cyklámu obsahujúci v polohe 1,8- jedno fosfonátové a jedno aminobenzylfosfínátové rameno (Obr.1.6-F), ktorého syntéza bola optimalizovaná.²³ Z tohto derivátu boli tiež pripravené komplexy s iónom Cu^{2+} , ktoré boli kineticky inertné. Druhý doposiaľ pripravený derivát obsahoval etyl-2-karboxylové a (pyrid-2-yl)-metylové rameno v 1,4- polohe (Obr.1.6-G).²⁴ Známe sú tiež ďalšie nesymetricky substituované deriváty cyklámu, ktoré však obsahujú iba jedno koordinujúce pendantné rameno (Obr.1.6-H,I).²⁵

² Chránenie s využitím metylénových mostíkov medzi dusíkmi v polohách 1,11 alebo 4,8

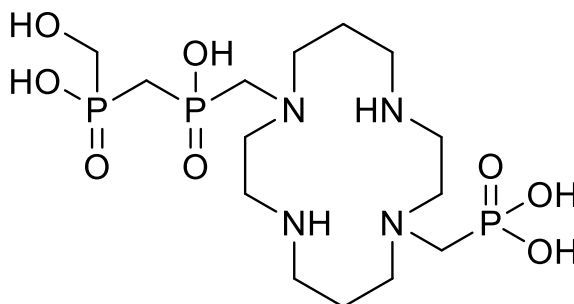


Obrázok 1.6. Nesymetricky substituované deriváty cyklámu

2 Ciele práce

V teoretickom úvode boli spomínané možnosti využitia koordinačných zlúčenín, v ktorých ako ligandy vystupujú deriváty polyazamakrocyclov v rádiomedicíne. Popísaná bola možnosť optimalizácie vlastností týchto komplexov pomocou zavádzania vhodných pendantných ramien na aminoskupiny cyklu. Predstavené boli rôzne typy pendantných ramien a zdôraznené výhody ramien na báze kyselín fosforu. Spomedzi polyazamakrocyclov má pre Cu^{2+} najvyššiu afinitu cyklám.

Cieľom práce preto je pripraviť jeden z prvých nesymetricky substituovaných derivátov cyklámu, ktorý je substituovaný v polohe 1,8- (Obr. 2.1.), a pripraviť jeho komplex s Cu^{2+} . Cieľom je tiež tento komplex charakterizovať a preštudovať ako jeho vlastnosti ovplyvňuje kombinácia fosfonátovej a bis(fosfinátovej) skupiny.



Obrázok 2.1. Cieľový ligand

3 Experimentálna časť

3.1 Všeobecné postupy a použité chemikálie

Všetky použité chemikálie pochádzajú od komerčne dostupných dodávateľov (Sigma-Aldrich, Fluorochem, Fluka, Lachema, Penta). Diizopropyl ester kyseliny metylénbis(fosfínovej) bol pripravený Mgr. Adamom Svitkom.

3.2 Metódy delenia a charakterizácie

3.2.1 Tenkovrstvová chromatografia (TLC)

Priebeh reakcií bol kontrolovaný pomocou tenkovrstvovej chromatografie na chromatografických doštičkách Silica gel 60 F254 (Merck a VWR). Vizualizácia škvŕn na doštičkách bola uskutočnená pomocou UV detekcie (detekcia látok obsahujúcich aromatický kruh), Dragendorfovho činidla (vodný roztok $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3$ a KI v octovej kyseline, detekcia dusíkatých makrocuklov), KMnO_4 (vodný roztok KMnO_4 a Na_2CO_3 , detekcia organických látok), 0,5 % roztoku ninhydrínu v etanole (detekcia látok obsahujúcich aminoskupiny) alebo $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (5 % vodný roztok, detekcia látok dobre koordinujúcich Cu(II))

3.2.2 HPLC a hmotnostná spektrometria

Hmotnostné spektrá v pozitívnom a negatívnom móde boli získané meraním na prístroji Waters ACQUITY QDa (duálny ortogonálny elektrosprej interface (Z-sprej) pre API (ionizácia za atmosférického tlaku); quadrupolový analyzátor; full scan v rozsahu 30 až 1250 m/z ; integrovaná turbomolekulárna vákuová pumpa a externá rotačná vákuová pumpa).

HPLC bolo merané na tom istom prístroji na kolóne s reverznou fázou Cortecs C18 (2,7 μm , 4,6×50 mm). K elúcii bol použitý gradient dvoch mobilných fáz (deionizovaná voda + 0,1 % TFA a acetonitril + 0,1 % TFA), ktorý je uvedený v Tab. 3.1. Pri monitorovaní všetkých reakcií v tejto práci pomocou HPLC bol použitý tento istý gradient.

Tabuľka 3.1. HPLC- použitý elučný gradient (mobilné fázy – A: H₂O + 0,1 % TFA, B: MeCN + 0,1 % TFA)

M1		
<i>t</i> (min)	A (%)	B (%)
0	100	0
2	100	0
8	0	100
11	0	100
13	100	0

3.2.3 Chromatografia

Chromatografické delenia pomocou automatizovaného preparatívneho „flash“ chromatografu boli uskutočňované na systéme ECOM TOY18DAD800 pozostávajúceho z kolektoru frakcií ECF2096, dvoch púmp ECP2200 a UV detektoru TOY18DAD800L. Separácie boli uskutočňované na kolónach s reverznou fázou C18-AQ-HG (25 mm · 215 mm; 120 g), YMC-ODS 25 (25 mm · 140 mm; 40 g), Luna 5 µm C18 (21 mm · 250 mm, 100 Å) a kolóne plnenej Silica gelom (0,040-0,060 mm, 60 Å, Acros). V prípade kolón s reverznou fázou boli použité gradienty dvoch mobilných fáz (deionizovaná voda + 0,1 % TFA a acetonitril + 0,1 % TFA). Konkrétne gradienty sú uvedené v Tab. 3.2.

Tabuľka 3.2. „Flash“ chromatografia - použité elučné gradienty (mobilné fázy – A: H₂O + 0,1 % TFA, B: MeCN + 0,1 % TFA)

M2			M3		
<i>t</i> (min)	A (%)	B (%)	<i>t</i> (min)	A (%)	B (%)
0	100	0	0	100	0
1	100	0	50	80	20
2	70	30			
25	60	40			
27	0	100			
33	0	100			

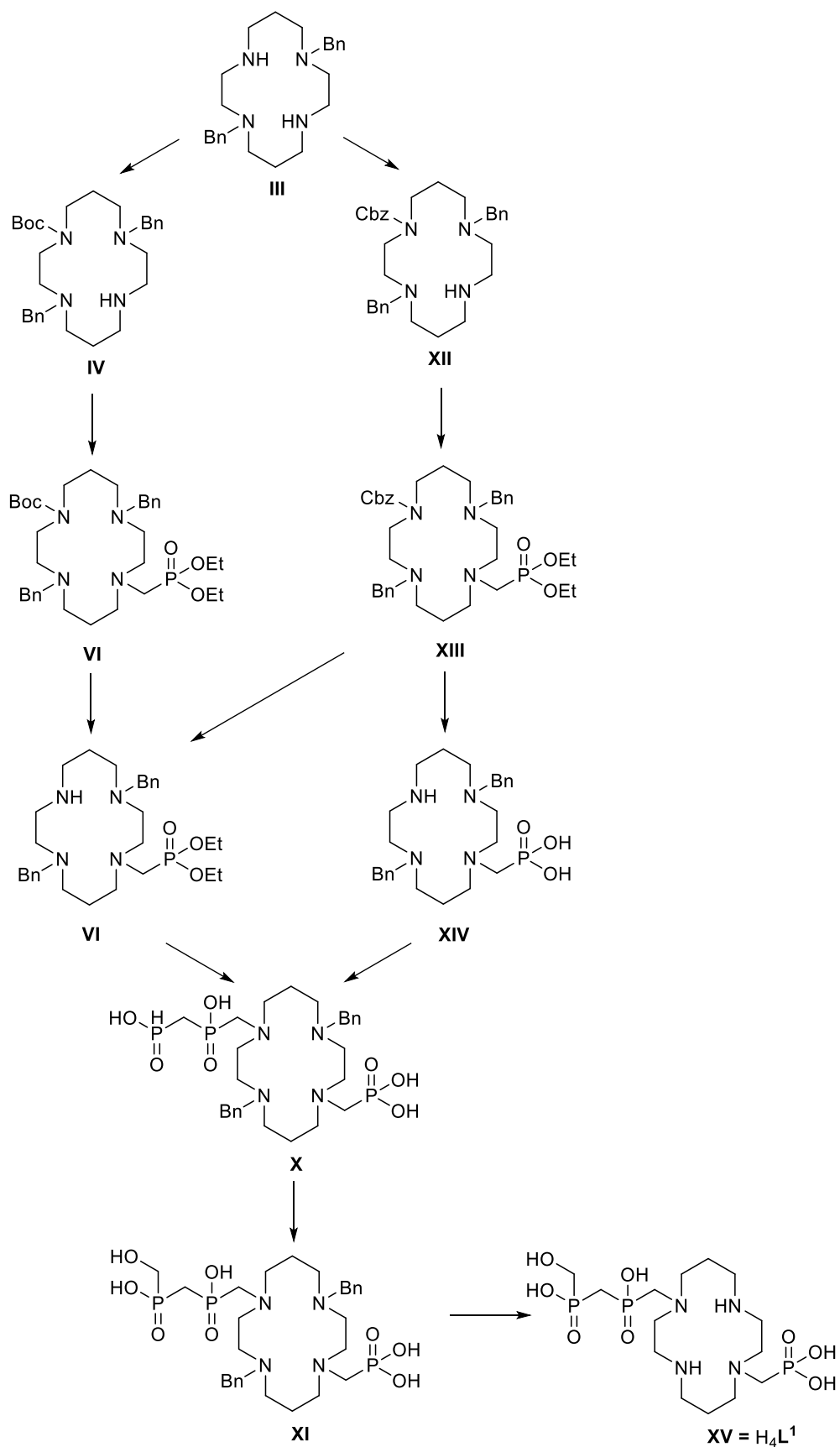
3.2.4 NMR spektrometria

Spektrá nukleárnej magnetickej rezonancie (NMR) pripravených látok boli zmerané na

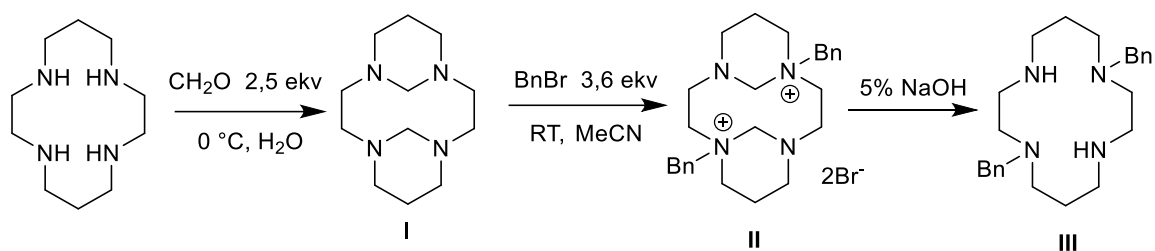
spektrometroch Varian VNMRS 300 MHz, Bruker 400 MHz, príp. na spektrometri Bruker Avance III 600 vybavenom kryosondou. Spektrá boli referencované na tetrametylsilán (TMS) ($\delta_{\text{H}} = 0,00$ ppm, $\delta_{\text{C}} = 0,0$ ppm v CDCl_3), *t*-BuOH ($\delta_{\text{H}} = 1,24$ ppm, $\delta_{\text{C}} = 30,3$ ppm v D_2O) a spracované v programe MestReNova. Všetky merania boli vykonané pri 25 °C. Spektrá zmerané na spektrometri Bruker Avance III 600 boli zmerané Mgr. Filipom Kouckým.

3.3 Syntetická část

3.3.1 Schéma syntézy



3.3.2 Syntéza 1,8-dibenzyl cyklámu

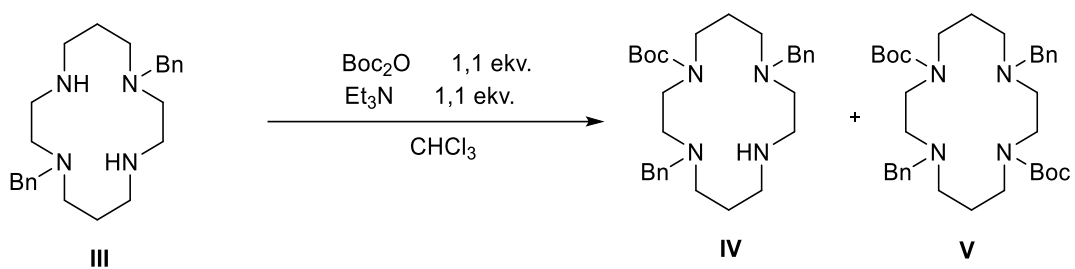


Obrázok 3.1. Schéma prípravy látky **III**

Látka **III** bola pripravená z cyklámu podľa schémy na obrázku 3.1. Príprava prebiehala podľa publikovaného postupu.²² Charakterizačné dáta boli v súlade s literatúrou.²²

3.3.3 Syntéza ortogonálne chráneného derivátu cyklámu

Reakcia A



Obrázok 3.2. Reakcia A

Do banky (100 ml) s miešadlom bola pridaná látka **III** (2,62 g; 6,88 mmol). Banka bola prefúknutá prúdom argónu a uzavretá septom. Látka bola rozpustená v banke v bezvodom CHCl₃ (20 ml). V slzovej banke (50 ml) s miešadlom, ktorá bola tiež prefúknutá argónom a uzavretá septom, bol oddelene rozpustený Boc₂O (1,65 g; 1,1 ekv.; 7,57 mmol) v bezvodom CHCl₃ (20 ml). K roztoku látky **III** bol pridaný suchý Et₃N (1,05 ml; 1,1 ekv.; 7,57 mmol) a zmes bola ponechaná miešať sa 5 min. Roztok Boc₂O bol pomocou injekčnej striekačky prevedený do prikvapkávacieho lievika. Z neho bol roztok po kvapkách pridávaný k roztoku látky **III** a Et₃N. Zmes bola ponechaná reagovať 24 h. Pridaná bola destilovaná voda (20 ml) a celá zmes bola prevedená do oddeľovacieho lievika. Zmes bola extrahovaná pomocou CHCl₃ (3 × 15 ml), do spojených organických fáz bol pridaný bezvodý MgSO₄ na vysušenie. Po odstránení MgSO₄ prefiltrovaním cez vatú bol filtrát odparený na RVO.

Odparok bol rozpustený v malom množstve EtOAc (10 ml) a ponechaný stáť cez noc. Vylúčené kryštály látky **V** boli odstránené filtráciou za zníženého tlaku cez fritu (S2) (560 mg).

Prefiltrovaná reakčná zmes bola čistená pomocou automatizovanej „flash“ chromatografie na kolóne (120 g, SiO₂). Najskôr bol eluovaný zvyšok látky **V** pomocou EtOAc (150 ml). Následne bola pomocou zmesi EtOH/ konc. vodný roztok NH₃ = 50:1 (150 ml) získaná látka **IV**. Frakcie obsahujúce čistú látku **V** boli spojené a odparené. Látka **V** bola získaná v podobe bezfarebného oleja (3,436 g; celkový výtťažok spolu s kryštálmi izolovanými pred čistením bol 40 %). Frakcie obsahujúce čistú látku **IV** boli spojené a odparené. Látka **IV** bola získaná v podobe jemne žltého oleja (397 mg; výtťažok 12 %).

Látka **IV**

TLC: MF = Hexán/EtOAc = 3:1; $R_f = 0,35$

MF = EtOH/NH₃ = 50:1; $R_f = 0,75$

MS (ESI): (+) 481,5 [M+H]⁺, vypočítaná $M_r = 480,5$

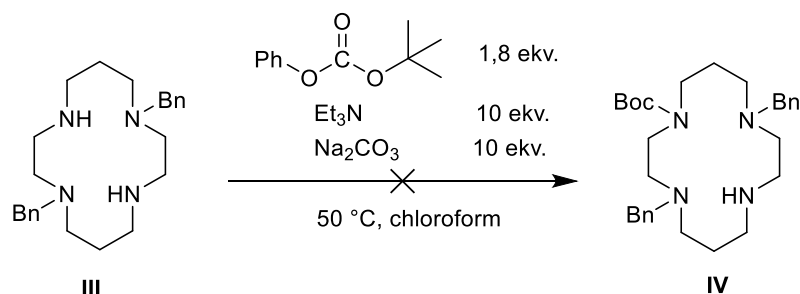
HPLC(UV): (Cortecs C18/M1) $t = 5,01$ min.

¹H-NMR (CDCl₃): δ 1,28 (s, 9H, C-CH₃); 1,59–1,71 (m, 2H, CH₂-CH₂-CH₂); 1,76–1,86 (m, 2H, CH₂-CH₂-CH₂); 2,39–2,47 (m, 2H, ring CH₂); 2,51–2,80 (m, 10H, ring CH₂); 3,26–3,39 (m, 4H, ring CH₂); 3,56 (s, 2H, N-CH₂-C₆H₅); 3,63 (s, 2H, N-CH₂-C₆H₅); 7,21–7,36 (m, 10H, C₆H₅)

¹³C{¹H}-NMR (CDCl₃): δ 26,95 a 26,45 (CH₂-CH₂-CH₂); 28,50 (CH₃-C); 45,80 , 46,40 , 47,05 , 47,48 , 50,90 , 51,51 , 53,13 , 54,07 (ring CH₂); 59,21 (N-CH₂-Ph); 59,93 (N-CH₂-Ph); 79,05 (CH₃-C); 136,97; 137,25; 138,28 (**2C**), 138,34 (**2C**), 138,92 (**2C**), 139,32 (**2C**), 148,65 a 148,98 (C^{ipso}) (všetko aromatické uhlíky); 165,41 (C=O)

¹H NMR spektrá látky **V** boli v zhode s publikovanými dátami.²⁷

Reakcia **B**

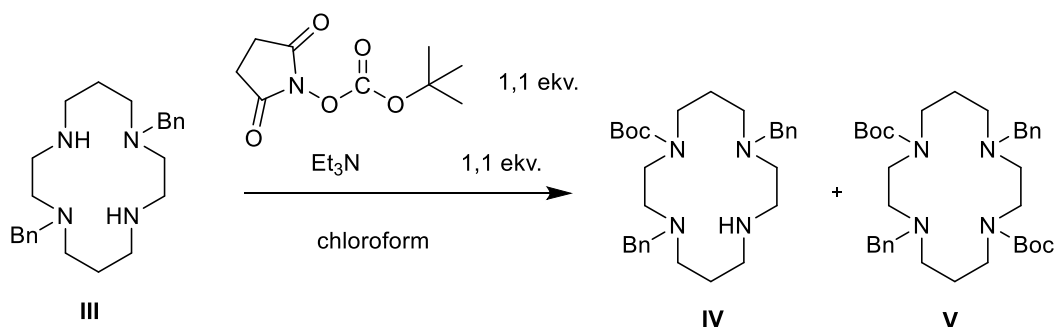


Obrázok 3.3. Reakcia **B**

Do banky (100 ml) s miešadlom bola pridaná látka **III** (0,384 g; 1,00 mmol). Banka

bola prefúknutá argónom a uzavretá septom, pridaný bol bezvodý CHCl_3 (20 ml). Oddelene bol rozpustený *t*-butyl fenyl karbonát (0,353 g; 1,8 ekv.; 1,82 mmol) v bezvodom CHCl_3 (8 ml) a bol pridaný k rozpustenej látke **III**. Zmes bola ponechaná reagovať cez noc, ale pomocou HPLC nebol pozorovaný vznik produktu. Nad banku s reakčnou zmesou bol zapojený spätný chladič a banka bola umiestnená do vodného kúpeľa. Zmes bola ponechaná za zahrievania na 50 °C reagovať. Po jednom dni bol injekčnou striekačkou pridaný Et_3N (1,40 ml; 10 ekv.; 10,1 mmol) a ďalší deň bol pridaný bezvodý Na_2CO_3 (1,055 g; 10 ekv.; 9,95 mmol). Po každom pridaní bola reakcia monitorovaná pomocou HPLC, bez zistenia prítomnosti produktu. Postup bol opakovaný s použitím EtOH ako rozpúšťadla. Vznik produktu však ani v tomto prípade nebol pozorovaný.

Reakcia C



Obrázok 3.4. Reakcia C

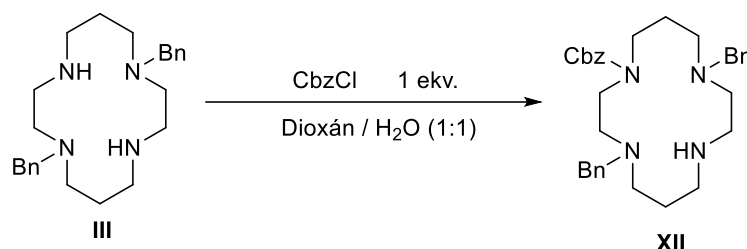
Do banky (100 ml) s miešadlom bola pridaná látka **III** (0,078 g; 0,21 mmol). Banka bola prefúknutá argónom a uzavretá septom. Látka **III** bola rozpustená v bezvodom CHCl_3 (10 ml). Oddelene bol rozpustený *N*-Boc sukcinimid (0,048 g; 1,1 ekv.; 0,22 mmol) v bezvodom CHCl_3 (8 ml) a bol pridaný k rozpustenej látke **III**. Po prvom dni bol pomocou HPLC zistený vznik látky **IV** (10 %) a látky **V** (10 %). Reakcia bola ďalej monitorovaná. Po piatich dňoch bol injekčnou striekačkou do reakčnej zmesi pridaný Et_3N (0,03 ml; 1,1 ekv.; 0,22 mmol) a reakcia bola po jednom dni zmonitorovaná pomocou HPLC (Tabuľka 3.3.). Reakčná zmes nebola čistená a produkt nebol izolovaný.

Reakcia bola paralelne uskutočnená podľa rovnakého postupu s 1,5 ekv. *N*-Boc sukcinimidu. Výsledky monitorovania tejto varianty reakcie pomocou HPLC sú v Tabuľke 3.3..

Tabuľka 3.3. Výsledky monitorovania variant *reakcie C* pomocou HPLC

	24 h	48 h	120 h	144 h (s Et ₃ N)
C1 (1,1 ekv. Boc-OSu)				
Látka IV	10 %	Bez zmeny	Bez zmeny	10 %
Látka V	10 %	Bez zmeny	Bez zmeny	15 %
C2 (1,5 ekv. Boc-OSu)				
Látka IV	7 %	7 %	Bez zmeny	7 %
Látka V	15 %	18 %	Bez zmeny	23 %

Reakcia D



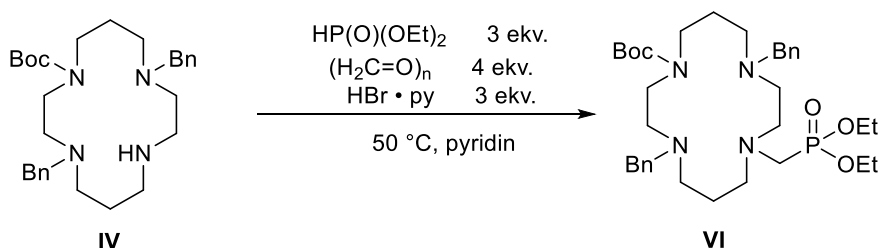
Obrázok 3.5. Reakcia D

Látka **XII** bola pripravená na základe optimalizovaného postupu.²³ V banke (100 ml) s miešadlom bola rozpustená látka **III** (1,61 g; 4,23 mmol) v 30 ml zmesi 1,4-dioxán / destilovaná voda = 1:1. Pomocou TFA (cca 25 ml; 5 % vodný roztok) bolo upravené pH reakčnej zmesi na hodnotu 1,3. Následne bol pridaný 1,4-dioxán (cca 25 ml), aby bol obnovený pomer 1,4-dioxán / destilovaná voda (1:1). Pomocou prikvapkávacieho lievika bol pomaly pridaný roztok CbzCl (0,61 ml; 1 ekv.; 4,23 mmol) v 1,4-dioxáne (10 ml). Zmes bola ponechaná reagovať 3 dni. Reakčná zmes bola odparená, odparok rozpustený vo vodnom roztoku NaOH (5 %, 60 ml) a zmes bola preextrahovaná 3 x 60 ml DCM. Organické fázy boli spojené a odparené. Odparok (2,17 g) bol rozpustený v malom množstve acetonitrilu (5 ml) a rozdelený pomocou automatizovanej „flash“ chromatografie na kolóne s reverznou fázou (120 g, C18-AQ) s použitím gradientu M2. Frakcie obsahujúce čistú látku **XII** boli spojené a odparené, a látka **XII** bola získaná vo forme trifluoroacetátu. Látka **XII** ako voľná báza bola získaná extrakciou. Odparok bol rozpustený vo vodnom roztoku NaHCO₃ (5 %, 20 ml) a preextrahovaný 3 x 20 ml DCM. Po odparení rozpúšťadiel bola získaná látka **XII** vo forme voľnej bázy, ktorá mala podobu bezfarebného oleja (650 mg; výt'azok 30 %).

^1H NMR spektrá, HPLC(UV) boli v zhode s publikovanými datami.²³

3.3.4 Spôsoby zavedenia fosfonátového ramena na cyklám

Reakcia E



Obrázok 3.6. Reakcia E

Do malej vialky bola navážená látka **IV** (0,337 g; 0,70 mmol). Do vialky bol pridaný paraformaldehyd (0,084 g; 4 ekv.; 2,79 mmol), dietylfosfit (0,27 ml; 3 ekv.; 2,10 mmol) a HBr·py (337 mg; 3 ekv.; 2,11 mol). Do vialky bolo pridané miešadlo, banka bola prefúknutá prúdom argónu, uzavretá septom a cez septum bol pridaný suchý pyridín (3 ml), v ktorom bola zmes rozpustená. Septum bolo oblepené teflónovou páskou a zmes bola ponechaná miešať pri teplote 50 °C. Po 4 dňoch bola pomocou ^{31}P NMR zistená konverzia 64 %. Reakčná zmes bola odparená na RVO. Odparok bol rozpustený v 15 ml vodného roztoku NaOH (pH \approx 12) a roztok bol extrahovaný 3 \times 20 ml DCM. Získané organické fázy boli spojené a odparené na RVO. Reakčná zmes bola čistená pomocou automatizovanej „flash“ chromatografie na kolóne (120 g, SiO_2). Odoberané boli frakcie po 30 ml. Najskôr boli eluované rôzne nečistoty pomocou EtOAc. Látka **VI** bola z kolóny eluovaná zmesou EtOAc:MeOH = 8:2. Frakcie obsahujúce látku **VI** boli odparené na RVO. V čistom stave bola izolovaná malá časť látky **VI** (55 mg, výťažok 13 %). Na dosiahnutie najlepšej možnej konverzie boli testované rôzne varianty reakcie E, ktoré sa líšili množstvom ekvivalentov jednotlivých reagentov. Výsledky HPLC monitorovania týchto reakcií sú v Tabuľke 3.4.

Tabuľka 3.4. HPLC výťažky testovaných variant reakcie D (s uvedenými reakčnými podmienkami)

Pomer ekvivalentov (DEP : paraformaldehyd : HBr·py)	^{31}P NMR po 3 dňoch
2:3:3	22 %
3:12:4	65 %
3:4:3	64 %

Látka VI

TLC: MF = EtOAc/MeOH = 8:2; $R_f = 0,81$

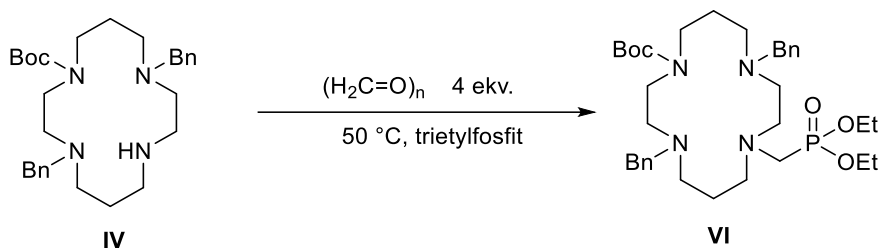
MS (ESI): (+) 631,7 $[M+H]^+$, vypočítaná $M_r = 630,4$

HPLC(UV): (Cortecs C18/M1) $t = 5,39$ min.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ 1,19 (t, 6H, $^2J_{\text{H-H}}=6,6$ Hz, O-CH₂-CH₃); 1,61 (m, 2H, CH₂-CH₂-CH₂); 1,78 (m, 2H, CH₂-CH₂-CH₂); 2,27–2,92 (m, 18H, ring CH₂ a N-CH₂-P); 3,42–3,69 (m, 5H, N-CH₂-C₆H₅ a NH); 3,97 (m, 4H, O-CH₂-CH₃); 7,14–7,29 (m, 10H, C₆H₅)

$^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR (CDCl_3): 26,7 (s)

Reakcia F

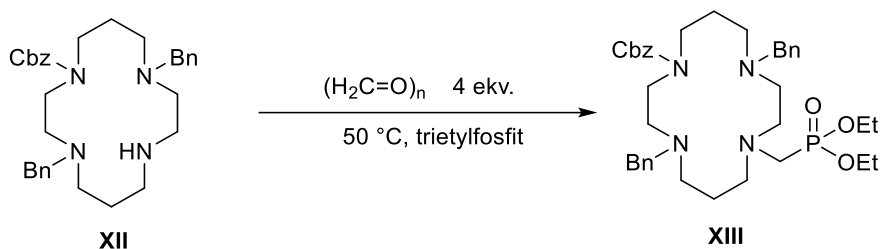


Obrázok 3.7. Reakcia F

Do slzovej banky (10 ml) s miešadlom bola pridaná látka **IV** (0,265 g; 0,42 mmol), paraformaldehyd (0,051 g; 4 ekv.; 1,68 mmol). Na rozpustenie látok bol pridaný trietylfosfit (8 ml). Banka bola prefúkaná prúdom argónu a uzavretá septom. Zmes bola ponechaná reagovať 2 dni za zahrievania na teplotu 50 °C. Z reakčnej zmesi bola odsávaním za zníženého tlaku po ukončení reakcie odstránená väčšia časť trietylfosfitu. Alternatívnym spôsobom odstránenia trietylfosfitu bolo odparenie na RVO pri zahrievaní na 70 °C a následnom odparení s 3 x 10 ml toluénu. Odparok bol rozpustený vo vodnom roztoku NaOH (5 %, 20 ml). Reakčná zmes bola extrahovaná 3 x 20 ml DCM. Zvyšok trietylfosfitu, ktorý nebol odparený bol z reakčnej zmesi odstránený pomocou „flash“ chromatografie na kolóne (120 g, SiO₂). Odoberané boli frakcie po 30 ml. Ako mobilná fáza bol použitý EtOAc. Týmto spôsobom bol zo zmesi vo frakciach 1-5 zachytený trietylfosfit. Následne bola pomocou zmesi EtOAc/DIIPA izolovaný produkt (frakcie 5-7) a zmes produktu a vedľajších anorganických produktov (frakcie 8-13). Frakcie obsahujúce čistý produkt boli spojené a odparené. Látka **VI** mala podobu bezfarebného oleja. Výťažok nebol určený, pretože sa podarilo získať iba malú časť látky **VI** v čistom stave na charakterizáciu. Väčšina bola znečistená trietylfosfátom (vznikol oxidáciou z trietylfosfitu), ktorý sa nepodarilo zo zmesi odstrániť, no mohla byť použitá do ďalších

reakcií.

Reakcia G

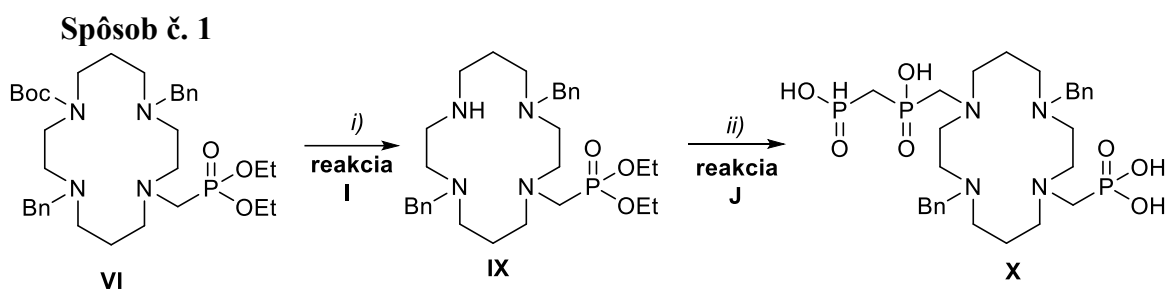


Obrázok 3.8. Reakcia G

Do banky (100 ml) s miešadlom bola pridaná látka **IV** (1,30 g; 2,52 mmol) a paraformaldehyd (0,303 g; 4 ekv.; 10 mmol). Pridané látky boli rozpustené v trietylfosfite (20 ml). Banka bola prefúknutá prúdom argónu a uzavretá septom. Zmes bola ponechaná reagovať 2 dni za zahrievania na teplotu 50 °C. Z reakčnej zmesi bola odstránená väčšina trietylfosfitu odparením na RVO pri zahrievaní na 70 °C a následnom odparení s 3 x 10 ml toluénu. Odparok bol rozpustený vo vodnom roztoku NaOH (5 %, 20 ml) a reakčná zmes bola extrahovaná 3 x 20 ml DCM. Organické fázy boli spojené a odparené na RVO. Odparok (1,72 g) obsahoval látku **VI** a malé množstvo trietylfosfátu.

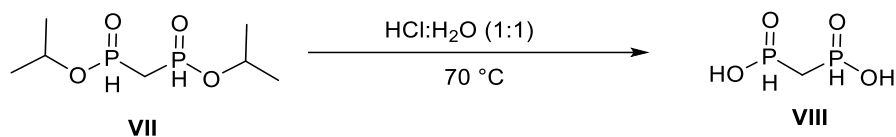
¹H NMR a ³¹P NMR spektrá boli v zhode s publikovanými datami.²³

3.4 Zavedenie metylén-bis(fosfinátového) ramena



Obrázok 3.9. Schéma prípravy látky **X** spôsobom č.1 – *i)* TFA/DCM = 1:1, 40 °C, *ii)* látka **VIII**, (H₂C=O)_n, konc. HCl/H₂O 1:1, 60 °C

Reakcia H

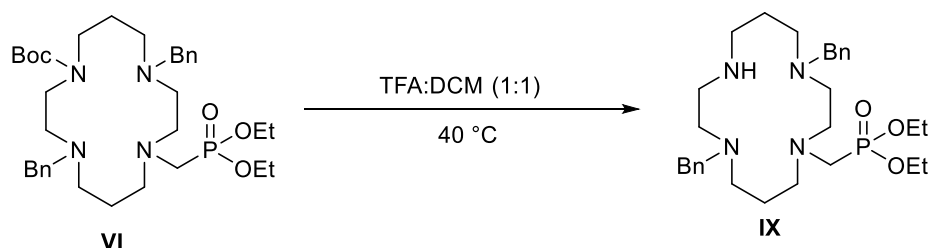


Obrázok 3.10. Reakcia H

Do banky (100 ml) s miešadlom bola navážená látka **VII** (2,1 g) a pridaný bol vodný roztok kys. chlorovodíkovej (6 M; 50 ml). Nad banku bol zapojený spätný chladič a zmes bola zahrievaná na olejovom kúpeli na teplotu 70 °C cez noc. Na druhý deň bola reakčná zmes odparená na RVO, čistota produktu a konverzia 100 % bola potvrdená pomocou ¹H NMR. Bol získaný produkt, látka **VIII**, ktorý mal podobu bezfarebného oleja (1,18 g; výt'azok 89 %).

¹H NMR a ³¹P NMR spektrá boli v zhode s publikovanými datami ²⁶

Reakcia I



Obrázok 3.11. Reakcia I

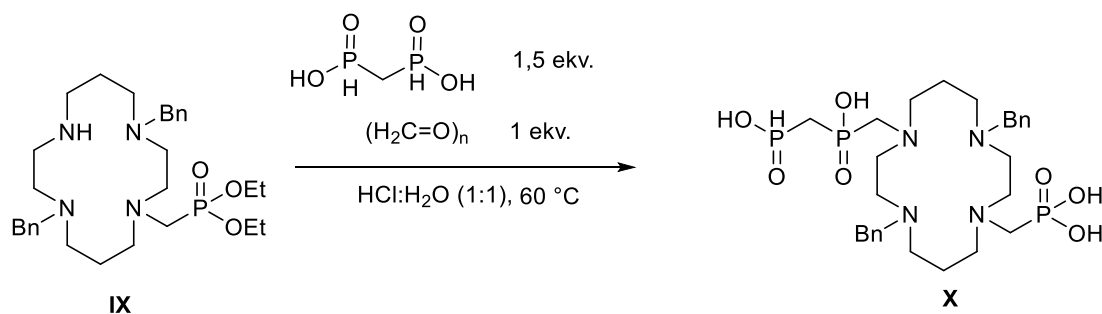
Do banky (100ml) s miešadlom bola pridaná zmes látky **VI** a vedľ'ajších anorganických produktov z **reakcie F** (337 mg). Pridaná bola zmes TFA/DCM = 1:1 (25 ml). Na banku bol nasadený spätný chladič a reakčná zmes bola ponechaná cez noc reagovať za zahrievania pomocou olejového kúpeľa na teplotu 40 °C. Reakčná zmes bola odparená na RVO a výsledný produkt mal podobu žltého oleja a bol vo forme trifluoroacetátu. Reakcia bola monitorovaná pomocou HPLC/MS a potvrdená bola konverzia 100 %.

Látka **IX**

MS (ESI): (+) 531,5 [M+H]⁺, vypočítaná $M_r = 530,3$

HPLC(UV): (Cortecs C18/M1) $t = 4,95$ min.

Reakcia J



Obrázok 3.12. Reakcia J

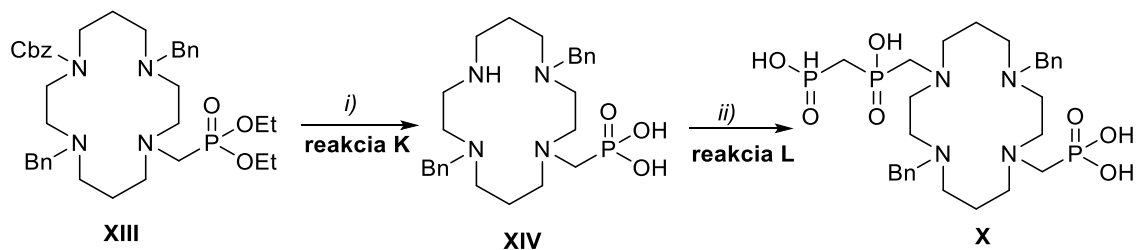
Do vialky s miešadlom bola prenesená reakčná zmes z **reakcie I** (0,409 g), metylén-bis(fosfinová) kyselina (látka **VIII**) (0,170 g; 1,5 ekv.) a paraformaldehyd (23 mg; 1 ekv.). Bol pridaný vodný roztok kys. chlorovodíkovej (6 M; 2,5 ml). Vialka bola uzavretá uzáverom so septom a umiestnená do reakčného bloku, kde sa ponechala zahrievať na teplotu 60 °C po dobu 5 dní. Reakčná zmes bola po každom dni monitorovaná pomocou HPLC/MS. Po 2 dňoch bola Mannichova reakcia s látkou **VIII** kompletne dokončená a pomaly dochádzalo k hydrolyze esterových skupín fosfonátovej kyseliny. Po 5 dňoch boli odstránené obe esterové skupiny a reakčná zmes bola odparená na RVO. Reakčná zmes nebola vyčistená a bola použitá do **reakcie N**.

Látka X

MS (ESI): (+) 631,5 [M+H]⁺, vypočítaná $M_r = 630,6$

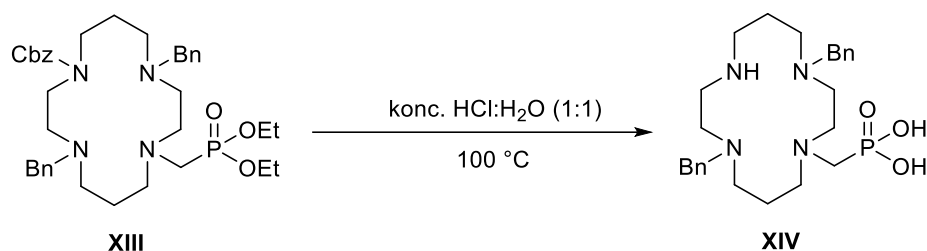
HPLC(UV): (Cortecs C18/M1) $t = 6,77$ min.

Spôsob č. 2



Obrázok 3.13. Schéma prípravy látky **X** spôsobom č.2 – *i)* konc. HCl/H₂O 1:1, 100 °C, *ii)* látka **VIII**, (H₂C=O)_n, konc. HCl/H₂O 1:1, 60 °C

Reakcia K

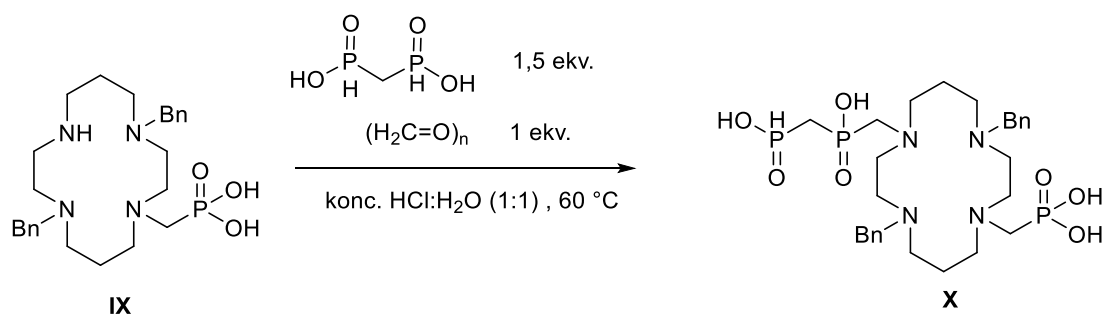


Obrázok 3.14. Reakcia K

Do banky (50 ml) s miešadlom bola pridaná látka **XIII** (0,615 g), ktorá obsahovala malé množstvo trietylfosfátu ako nečistoty. Zmes bola rozpustená vo vodnom roztoku kys. chlorovodíkovej (6 M; 10 ml), nad banku bol zapojený spätný chladič a zmes bola zahrievaná po dobu 2 dni na teplotu kúpeľa 100 °C. Po tejto dobe bola potvrdená konverzia 100 % pomocou HPLC a reakčná zmes bola odparená. Odparok (0,505 g) bol prečistený pomocou „flash“ chromatografie na reverznej fáze (40 g, YMC-ODS). Najskôr bola počas 4 minút čistou mobilnou fázou voda + 0,1 % TFA vymytá kyselina fosforečná, potom bola z kolóny počas 6 minút mobilnou fázou acetonitril + 0,1 % TFA vylučovaná látka **XIII** vo forme trifluoroacetátu. Frakcie obsahujúce produkt boli spojené a odparené (0,405 mg; výtťažok určený cez dva kroky, reakciu G a reakciu K pri reakcii z látky **XII** = 85 %).

^1H NMR a ^{31}P NMR spektrá boli v zhode s publikovanými datami.²³

Reakcia L

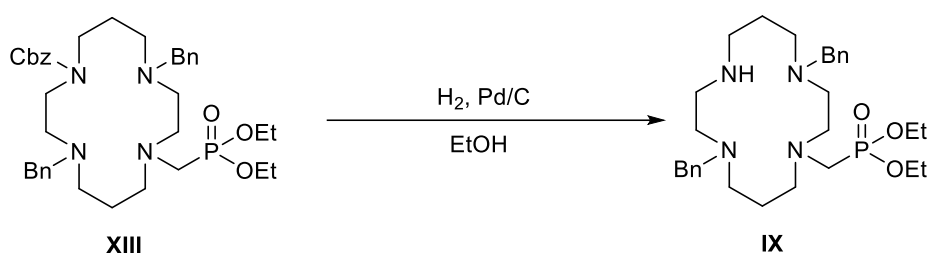


Obrázok 3.15. Reakcia L

Do vialky s miešadlom bola prenesená látka **IX** (0,400 g; 0,84 mmol), metylén-bis(fosfinová) kyselina (látka **VIII**) (0,185 g; 1,26 mmol) a paraformaldehyd (0,025 g; 0,83 mmol). Do zmesi bol pridaný vodný roztok kys. chlorovodíkovej (6 M; 2,5 ml), vialka bola uzavretá uzáverom so septom a umiestnená do reakčného bloku kde sa ponechala zahrievať na

teplotu 60 °C. Keďže na druhý deň boli v reakčnej zmesi biele kryštály (pravdepodobne išlo o časť východiskovej látky) bola reakčná zmes prenesená do banky (100 ml) kde bola rozpustená vo vodnom roztoku kys. chlorovodíkovej (3 M; 80 ml). Reakčná zmes bola ponechaná reagovať ešte dva dni počas ktorých bola monitorovaná pomocou HPLC. Bola dosiahnutá konverzia 80 %, ktorá sa zvyšovala už len pomaly. Keďže efektívnejšie bolo zmes čistiť až po **reakcii N**, nebola reakčná zmes obsahujúca produkt (látku **X**), minoritné množstvo východiskovej látky (látku **IX**), nečistoty a vedľajšie produkty spracovaná. Z tohto dôvodu nebol výťažok stanovený.

Reakcia M

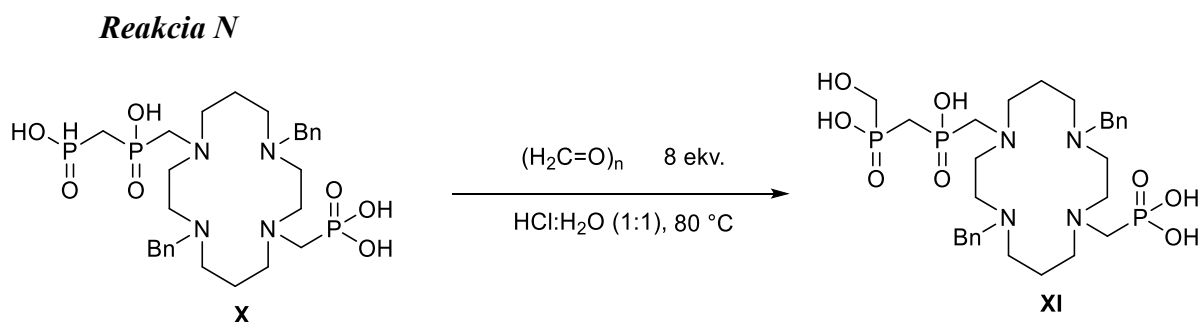


Obrázok 3.16. Reakcia M

Do banky (50 ml) s miešadlom bola prenesená látka **XIII** s malým obsahom trietylfosfátu (0,670 g). Látka bola rozpustená v bezvodom etanole (30 ml) a prisypané bolo 10 % Pd/C (60 mg). Vzduch nad zmesou bol opatrne odsatý vakuom a na ústie banky bol zavedený balón obsahujúci vodík. Zmes bola ponechaná reagovať 7 h. Reakčná zmes bola prefiltrovaná cez skladaný filtračný papier. Produkt (s malou prímiesou anorganických nečistôt) mal podobu bezfarebného oleja (0,589 g; keďže produkt obsahoval nečistoty z predchádzajúcich reakcií nebol výťažok stanovený a bol použitý v **reakcii J**).

Charakterizácia produktu odpovedala charakterizácii látky **IX** pripravenej v reakcii **I**.

3.5 Syntéza cieľového ligandu



Do vialky s miešadlom bola prenesená reakčná zmes z **reakcie J** (600 mg) a paraformaldehyd (228 mg; 8 ekv.). Pridaný bol vodný roztok kys. chlorovodíkovej (6 M; 2,5 ml). Vialka bola uzavretá uzáverom so septom a umiestnená do reakčného bloku, kde sa ponechala zahrievať na teplotu 80 °C po dobu 2 dni. Reakčná zmes bola monitorovaná pomocou HPLC/MS. Po dosiahnutí konverzie 100 % bola reakčná zmes odstavená z bloku, prefiltrovaná cez kúsok vaty a odparená na RVO. Po odparení bola reakčná zmes vyčistená pomocou „flash“ chromatografie s využitím gradientu M3 na kolóne Luna C18. Frakcie obsahujúce produkt boli spojené a odparené. Produkt bol získaný vo forme trifluoroacetátu a mal podobu bezfarebného oleja (100 mg; výťažok určený cez sekvenciu reakčných krokov **F**, **I**, **J**, **N** bol 28 %).

Látka **XI**

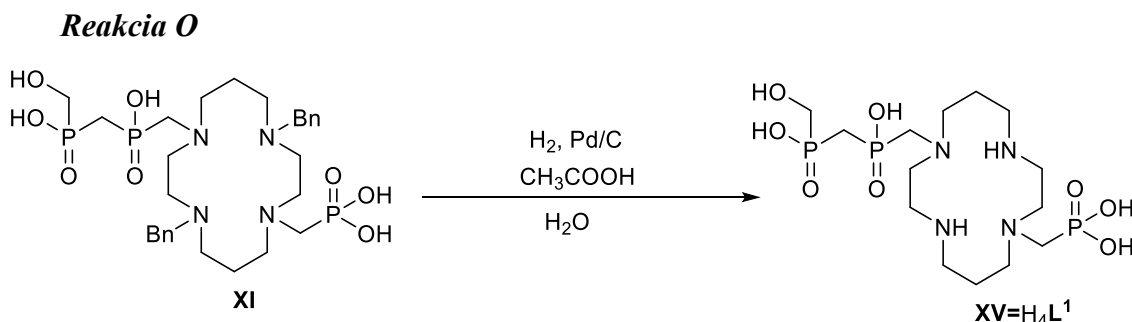
MS (ESI): (+661,5) $[M+H]^+$, vypočítaná $M_r = 660,6$

HPLC(UV): (Cortecs C18/M1) $t = 6,85$ min.

$^1\text{H-NMR}$ (D_2O): 2,18–2,35 (m, 4H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$); 2,35–2,51 (m, 2H, $\text{P-CH}_2\text{-P}$); 2,95 (d, 2H, $^2J_{\text{P-H}}=11,2$ Hz, $\text{N-CH}_2\text{-P}$); 3,04–3,12 (m, 2H, $\text{N-CH}_2\text{-P}$); 3,21–3,72 (m, 16H, ring CH_2); 3,79 (d, 2H, $^2J_{\text{P-H}}=5,6$ Hz, $\text{P-CH}_2\text{-OH}$); 4,44 (s, 2H, $\text{N-CH}_2\text{-C}_6\text{H}_5$); 4,51 (s, 2H, $\text{N-CH}_2\text{-C}_6\text{H}_5$); 7,51–7,59 (m, 10H, C_6H_5)

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}\text{-NMR}$ (D_2O): 19,05 a 19,55 (s, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$); 31,83 (m, $\text{P-CH}_2\text{-P}$); 46,17 (m, ring C); 46,80 (m, ring C); 46,88 (m, ring C); 46,99 (m, ring C); 47,05 (m, ring C); 47,12 (m, ring C); 50,11 (m, $\text{N-CH}_2\text{-P}$); 52,16 (m, ring C); 52,77 (m, ring C); 53,29 (m, $\text{N-CH}_2\text{-PO}_3\text{H}_2$); 57,45 (s, $\text{N-CH}_2\text{-Ph}$); 57,78 (s, $\text{N-CH}_2\text{-Ph}$); 59,69 (d, $^1J_{\text{P-C}}=113,0$ Hz, $\text{P-CH}_2\text{-OH}$); 126,97 (2C); 127,41 (2C); 128,92 (2C); 129,02 (2C); 129,96; 130,11; (všetko aromatické uhliky); 130,87 (C^{ipso}); 130,83 (C^{ipso})

$^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR (D_2O): 16,0 (s, NCH_2P), 24,1 (s, $\text{NCH}_2\text{PCH}_2\text{P}$), 37,3 (s, PCH_2P)



Obrázok 3.18. Reakcia O

Východisková látka **XI** vo forme trifluoroacetátu (0,190 g; 0,29 mmol) bola prenesená do banky (50 ml) s miešadlom. V nej bola látka **XI** rozpustená v destilovanej vode (15 ml) a pomocou injekčnej striekačky bola pridaná ľadová kyselina octová (1,5 ml). Pridané bolo 10 % Pd/C (28 mg). Aplikovaním vákuu bol jemne odsatý vzduch nad zmesou a cez kohút bol na ústie banky zavedený balón s vodíkom. Po 24 h nebola pomocou HPLC/MS pozorovaná prítomnosť východiskovej látky, reakčná zmes bola prefiltrovaná cez skladaný filtračný papier a odparená na RVO. Reakčná zmes bola odparená ešte 2x s destilovanou vodou (10 ml) na odstránenie kyseliny octovej. Produkt sa podarilo izolovať vo forme trifluoroacetátu ako bezfarebný olej (0,132 mg; odhadovaný výťažok 96 %).

Látka **XV**

MS (ESI): (+481,3) $[\text{M}+\text{H}]^+$, vypočítaná $M_r = 480,4$

HPLC(UV): (Cortecs C18/M1) $t = 1,50$ min.

^1H -NMR (D_2O): 1,93–2,06 (bs, 2H, $\text{CH}_2\text{--CH}_2\text{--CH}_2$); 2,10–2,24 (bs, 2H, $\text{CH}_2\text{--CH}_2\text{--CH}_2$); 2,37–2,53 (m, 2H, $\text{P--CH}_2\text{--P}$); 2,82–3,61 (m, 20H, ring CH_2 , $\text{N--CH}_2\text{--P}$); 3,76 (d, 2H, $^2J_{\text{P--H}}=5,2$ Hz, $\text{P--CH}_2\text{--OH}$);

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (D_2O): δ 23,66 a 24,66 (s, $\text{CH}_2\text{--CH}_2\text{--CH}_2$); 33,93 (m, $\text{P--CH}_2\text{--P}$); 43,57 (m, ring C); 44,30 (m, ring C); 44,78 (m, ring C); 51,37 (m, ring C); 51,50 (m, ring C); 51,86 (dt, $^1J_{\text{P--C}}=157$ Hz, $^3J_{\text{P--C}}=12,3$ Hz, $\text{N--CH}_2\text{--P}$); 52,79 (m, ring C); 55,35 (d, $^1J_{\text{P--C}}=97,3$ Hz, $\text{N--CH}_2\text{--PO}_3\text{H}_2$); 56,15 (m, ring C); 56,22 (m, ring C); 61,85 (d, $^1J_{\text{P--C}}=114$ Hz, $\text{P--CH}_2\text{--OH}$)

$^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR (D_2O): 17,8 (bs, NCH_2P), 24,9 (bs, $\text{NCH}_2\text{PCH}_2\text{P}$), 38,6 (bs, PCH_2P)

3.6 Príprava meďnatého komplexu

Z odparku látky **XV**, ktorá bola vo forme trifluoroacetátu bol pripravený roztok ligandu o známej približnej koncentrácii. Pomocou ^{19}F qNMR s využitím 1,1,1-trifluoroetanolu ako štandardu bola zistená koncentrácia trifluoroctovej kyseliny v roztoku a na základe toho určená skutočná koncentrácia ligandu v roztoku (33 mM).

Do vialky (20 ml) bol pomocou mikropipety pridaný roztok ligandu (3,160 ml; 0,104 mmol) a roztok CuCl_2 (1,868 ml; 0,094 mmol) tak, aby bol molárny pomer $\text{H}_4\text{L}^1 : \text{Cu}^{2+} = 1,1 : 1$. Okamžite bolo pozorované intenzívne sfarbenie roztoku do tmavomodra, pH roztoku bolo následne upravené na 5,5.

MS (ESI): (+542,2) $[\text{M}+\text{H}]^+$, vypočítaná $M_r = 541,1$

HPLC(UV): (Cortecs C18/M1) $t = 0,62$ min.

UV-Vis: $\lambda_{\text{max}} = 311$ nm (LMCT, $\varepsilon = 3920$ mol $^{-1}$ dm 3 cm $^{-1}$); $\lambda_{\text{max}} = 586$ nm (d-d, $\varepsilon = 136$ mol $^{-1}$ dm 3 cm $^{-1}$)

3.7 UV-vis spektroskopia

UV-Vis spektrá boli merané na prístroji Specord 50 Plus (Analytic Jena AG) v rozpätí vlnových dĺžok 190 až 1100 nm (deuteriová lampa bola použitá v rozpätí 190–320 nm a v rozpätí 320–1100 nm bola použitá halogénová lampa). Teplota bola udržiavaná pri $25,0 \pm 0,1$ °C pomocou bloku typu Peltier.

3.8 Disociačne kinetiky

Merania boli uskutočnené pri teplote $25,0 \pm 0,01$ °C pri rôznych koncentráciách HClO_4 (uvedené v tabuľke 3.5.). Roztoky boli pripravované z HClO_4 a NaClO_4 (obe o známej koncentrácii) tak, aby bola udržiavaná konštantná iónová sila $I(\text{Na,H})\text{ClO}_4 = 5,0$ M. Do kremennej kyvety (optická dĺžka 1,000 cm) bola pomocou mikropipety pridaná destilovaná voda (143 μl), vypočítaný objem vodného roztoku HClO_4 , vypočítaný objem vodného roztoku NaClO_4 (tak, aby celkový objem roztoku bol 1,000 ml). Takto pripravený roztok bol vytemperovaný po dobu 1 min. na teplotu 25 °C. Prídavkom 0,019M roztoku komplexu (10,0 μl) bola iniciovaná reakcia a po dobu minimálne 4 polčasov bola sledovaná absorbancia pri vlnovej dĺžke 311 nm, ktorá odpovedala maximu LMCT pásu.

Tabuľka 3.5. Zloženie roztokov pre meranie kyslo katalyzovaných disociačných kinetík.

c_{HClO_4} (M)	V_{HClO_4} (μl)	V_{NaClO_4} (μl)	V_{CuL} (μl)	$V_{\text{H}_2\text{O}}$ (μl)
5,0	847	0	10,0	143
4,5	762	85	10,0	143
4,0	677	169	10,0	143
3,5	593	254	10,0	143
3,0	508	339	10,0	143
2,0	339	508	10,0	143
1,0	169	677	10,0	143
0,5	85	762	10,0	143

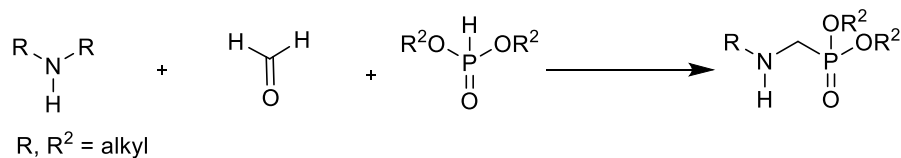
4 Diskusia

V rámci mojej bakalárskej práce²⁷ bolo zistené, že na syntézu nesymetricky substituovaného derivátu cyklámu bude nutné použiť ortogonálne chránenie cyklu. Pri syntéze, ktorá vychádzala z dvakrát chráneného derivátu cyklámu sa vznik štatistickej zmesi nepodarilo doceliť, a tým ani vznik nesymetricky substituovaného produktu v prijateľnom výťažku. Použité boli benzylové chrániace skupiny, keďže bis(fosfinátové) rameno bolo plánované na cyklám zaviesť reakciou Mannichovho typu v kyslom prostredí, čo vylučovalo použitie karbamátových chrániacich skupín, ktoré sú v silne kyslom prostredí labilné. Keďže metylén-bis(fosfinátová) kyselina je drahšia ako jednoduché estery fosfonovej kyseliny bolo na cyklám ako prvé zavádzané fosfonátové pendantné rameno. Pred posledným krokom, v ktorom budú odstránené benzylové skupiny pomocou hydrogenácie bolo nutné modifikovať bis(fosfinátové) rameno a zbaviť sa P–H väzby.

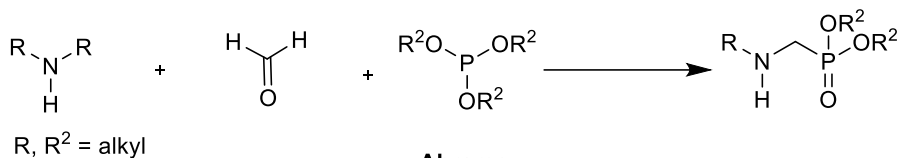
Poznáme rôzne spôsoby, ktorými sa na cyklám zavádzajú pendantné ramená odvodené od kyselín fosforu, súhrnne ich označujeme ako tzv. fosfo-Mannichove reakcie. Na tomto mieste je vhodné uviesť tri najpoužívanejšie z nich. V prípade, že aldehyd reaguje s amínom a esterom príslušnej kyseliny fosforu s väzbou P–H, ide o tzv. Kabachnik-Fieldsovu reakciu, ktorou sa na makrocyklus bežne zavádza napríklad fosfonátové rameno reakciou s dialkylfosfitmi (Obr. 4.1.). Dôležitý intermediát v tejto reakcii obsahuje „*in situ*“ generovanú C=N väzbu (napr. imín), ktorá následne reaguje s esterom kyseliny fosforu. Reakcia môže byť urýchlená Lewisovými, prípadne Brønstedovými kyselinami, ktoré pomáhajú generovať a stabilizovať imíniový ión.²⁸

Ďalším spôsobom zavádzania pendantných ramien je Abramovova reakcia, ktorá je podobná reakcii Kabachnik-Fieldsovej s plne esterifikovanou kyselinou fosforu miesto dietylésteru, t. j. s fosfitmi s formálne trojmocným atómom fosforu, akým je napríklad P(OEt)₃.

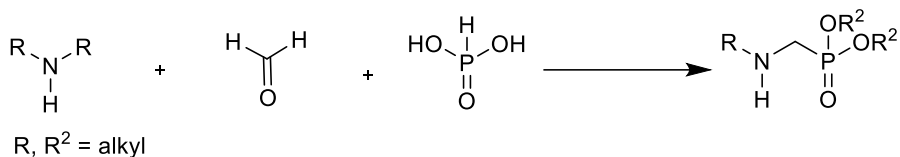
Tretím spôsobom je Moedritzer-Iraniho reakcia, ktorá by sa dala označiť aj ako „fosfo-Mannichova“ reakcia v kyslom vodnom prostredí. Kyslé prostredie je tradične zabezpečované pomocou vodného roztoku HCl a značne urýchľuje reakciu.²⁹ V reakcii reaguje opäť amín s aldehydom alebo ketónom, ale na rozdiel od predchádzajúcich spôsobov je treťou zložkou miesto esteru kyselina fosforu vo formálnom oxidačnom stave (V+).



Kabachnik-Fields



Abramov



Moedritzer-Irani

Obrázok 4.1. Typy reakcií, ktorými sa zavádzajú pendantné ramená na báze fosforu (ilustrované na príkladoch vzniku fosfonátov, t.j. látok odvodených od kyseliny fosforitej)

4.1 Syntéza ortogonálne chráneného derivátu cyklu

4.1.1 Reakcia A

Ako chrániaca skupina do kombinácie k dvom benzylovým skupinám bola zvolená skupina *t*-butyloxykarbonylová. Na 1,8-disubstituovaný cyklám bola zavedená nukleofilnou acylovou substitúciou, ktorá bola vyvinutá v rámci bakalárskej práce.²⁷ V rámci tejto diplomovej práce bola táto reakcia optimalizovaná a škálovaná smerom k väčším množstvám. Žiadaný trisubstituovaný produkt (látka **IV**) vznikal v reakcii vždy minoritne, pričom sa nepodarilo zaistiť vznik látky **IV** ako hlavného produktu. Je to pravdepodobne tým, že východiskový chránený cyklám zaujíma v roztoku špecifickú konformáciu, po ktorej rozrušení (po reakcii do prvého stupňa) dochádza ochotne k reakcii do druhého stupňa. Majoritne vzniká produkt tetrasubstituovaný (látka **V**), ktorý je obvyklou východiskovou látkou pri príprave cyklámu chráneného dvoma skupinami Boc v polohách 1,8-.

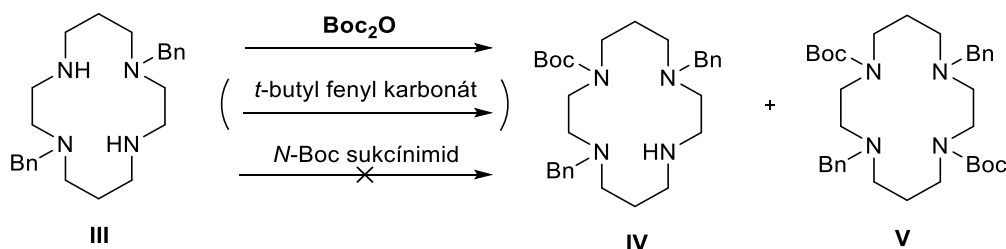
Aby bolo možné reakciu uskutočňovať z väčšieho množstva východiskovej látky bolo žiadané „predčistiť“ zmes pred nanesením na kolónu a chromatografickou separáciou. Bol pozorovaný vznik kryštálov symetrického tetrasubstituovaného produktu v odparku, v prípade, že bol ponechaný stáť pri laboratórnej teplote. Táto kryštalizácia bola podporená rozpustením odparku v malom množstve EtOAc.

4.1.2 Reakcia B

Aby sa podarilo získať látku **IV** vo väčšom výt'azku bola snaha odskúšať zavádzanie skupiny Boc na benzylmi chránený makrocyklus pomocou menej reaktívnej látky než je Boc-anhydrid (Obr. 4.2.). Prvou skúšanou látkou bol *t*-butyl fenyl karbonát, reakčné podmienky boli založené na úspešnom využití látky pri chránení pentaerytritol-tetraamínu.³⁰ Keďže vznik látky **IV** nebol pomocou HPLC zistený, bola snaha zvýšiť reaktivitu zvýšením teploty (na 50 °C), bázickou katalýzou (aby sa uľahčilo odtrhnutie protónu z aminoskupiny makrocyklu do reakčnej zmesi bol pridaný Et₃N a neskôr Na₂CO₃ vo veľkom nadbytku). Odkúšaná bola aj zmena rozpúšťadla na polárnejšie (na rozdiel od CHCl₃, ktorý bol vysušený, aby bola minimalizovaná hydrolyza *t*-butyl fenyl karbonátu), a teda bol použitý absolútny EtOH podľa vzoru.³⁰ Žiadna z vyššie uvedených reakčných podmienok však k vzniku produktu nevedla.

4.1.3 Reakcia C

Ako reaktívnejšia látka obsahujúca skupinu Boc bol použitý *N*-Boc-sukcínimid. Odkúšané bolo použitie 1,5 ekvivalentu (aby sa otestovalo, či látka **IV** vzniká) – reakcia **C2** a 1,1 ekvivalentu (aby bol zabezpečený preferovaný vznik látky **IV** oproti látke **V**) - reakcia **C1**. Vznik produktu bol pozorovaný už po 24 h, pričom podľa predpokladov vznikalo pri použití mierneho nadbytku *N*-Boc-sukcínimidu rovnaké množstvo látky **IV** a látky **V**, 10 % : 10 %). Pri použití väčšieho nadbytku v reakcií **C2** bol pri rovnakom čase pomocou HPLC zistený preferovaný vznik látky **V** oproti látke **IV**, 15 % : 7 %). Keďže po ďalších 48 h neboli pozorované väčšie zmeny (mierny nárast množstva vzniknutej látky **V** v prípade reakcie **C2**) a v oboch prípadoch bola celková konverzia nízka, a preto bola zvýšená reaktivita bázickou katalýzou (pridanie Et₃N). V oboch prípadoch sa síce konverzia zvýšila, ale len vďaka ďalšiemu vzniku látky **V**.



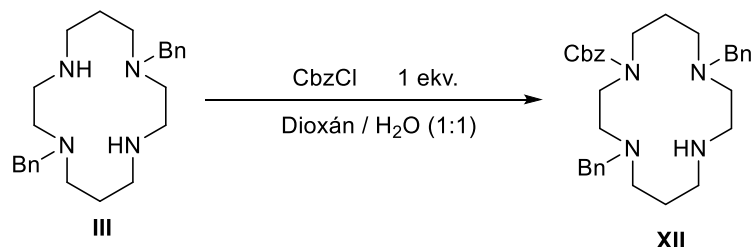
Obrázok 4.2. Skúmané spôsoby prípravy látky **IV**

4.1.4 Reakcia D

V priebehu vypracovávania tejto práce bol optimalizovaný postup prípravy iného ortogonálne chráneného derivátu cyklámu obsahujúci kombináciu dvoch skupín Bn a jednej

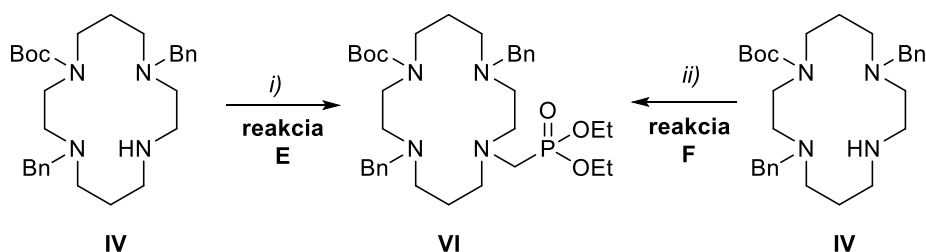
skupiny Cbz.²³ Toto ortogonálne chránenie bolo použité pri syntéze nesymetricky substituovaného derivátu cyklámu spomínaného v teoretickom úvode tejto práce (Obr. 1.6. – F). Použitím tohto postupu bola pripravená látka **XII**. Syntéza vychádzala oproti popísanému postupu z väčšieho množstva látky **III**. K väčšiemu výťažku ortogonálne chráneného cyklu v tejto reakcii oproti nami použitému chráneniu so skupinou Boc prispieva protonizácia voľnej aminoskupiny v kyslom prostredí. V rámci optimalizácie postupu²³ boli upravované podmienky kyslého prostredia, v ktorom dochádzalo k spomaľovaniu reakcie do druhého stupňa a vznikal prednostne monosubstituovaný produkt. Takáto optimalizácia v prípade chránenia so skupinou Boc nebola možná, keďže v kyslom prostredí by dochádzalo k hydrolyze Boc₂O.

Pri **reakcii D** bolo pozorované, že pri extrakcii reakčnej zmesi v niektorých prípadoch vznikala biela zrazenina východiskovej látky **III**, ktorá bola málo rozpustná vo vodnom roztoku NaOH a bola obtiažne extrahovateľná. Chromatografické delenie reakčnej zmesi prebiehalo s využitím gradientu uvedeného v postupe²³ pomerne bez problémov. Ojedinele bolo pozorované zachytenie zmesových frakcií východiskovej látky **III** a produktu. Produkt bol na konci extrahovaný z alkalického vodného roztoku do formy voľného amínu, aby mohol byť použitý do nasledujúcej **reakcie G**.



Obrázok 4.3. Príprava látky **XII**

4.2 Spôsobý zavedenia fosfonátového ramena na cyklám



Obrázok 4.4. Príprava látky **VI**: *i)* dietylfosfit, paraformaldehyd, HBr-py;
ii) trietylfosfit, paraformaldehyd

4.2.1 Reakcia E

Fosfonátové rameno nemohlo byť na ortogonálne chránený cyklám zavádzané reakciou Moedritzer-Iraniho typu kvôli zlej rozpustnosti východiskovej látky **III** vo vodnom roztoku HCl. Najskôr bola preto na tento účel odskúšaná Kabaschnik-Fieldsova reakciou (spôsob s dietylfosfitom, pyridínom ako rozpúšťadlom a s kyslou katalýzou, ktorú zabezpečoval bezvodý HBr·py), výsledkom bola látka **VI** (Obr. 4.4.). Keďže reakcia vychádzala z ortogonálne chráneného cyklu, bolo možné použiť nadbytok ostatných východiskových látok. Táto reakcia bola postupne optimalizovaná, pričom bol sledovaný vplyv zmeny pomeru látkových množstiev východiskových látok na celkovú konverziu sledovanú pomocou HPLC. Pri optimálnych podmienkach sa podarilo doceliť maximálne konverziu asi 65 %. Znamenalo to však, že pred použitím v ďalších reakčných krokoch je nutné reakčnú zmes vyčistiť. Extrakciou do roztoku zriedeného vodného NaOH boli zo zmesi odstránené rôzne anorganické nečistoty (pri extrakcii s vodou prechádzala do vodnej fázy aj časť produktu). Reakčná zmes bola vyčistená pomocou „flash“ chromatografie, prvou mobilnou fázou EtOAc sa vymyli rôzne nečistoty, látka **VI** bola eluovaná zmesou EtOAc:MeOH = 8:2. Celkový výtťažok reakcie bol nízky (13 %), čo bolo zapríčinené nízkou konverziou, ale tiež stratami pri chromatografickom delení. Napriek viacnásobnej optimalizácii teda nebol dosiahnutý vysoký výtťažok a ďalej bol hľadaný spôsob, ktorý by zabezpečil podstatne lepšiu konverziu.

4.2.2 Reakcia F

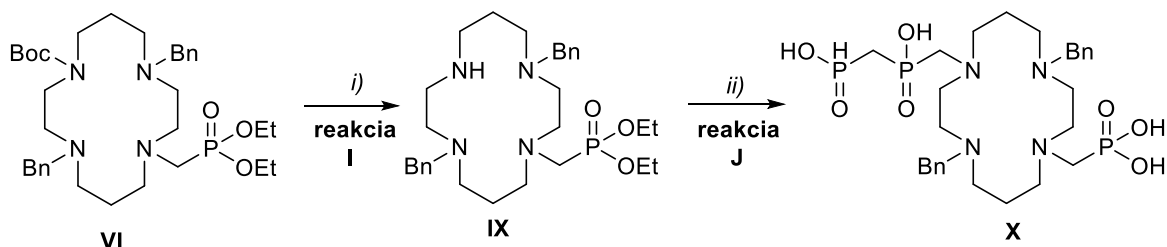
Najvhodnejšou reakciou sa ukázala byť reakcia Abramovovho typu, teda reakcia chráneného cyklu s nadbytkom paraformaldehydu vo veľkom nadbytku trietylfosfitu (bol použitý ako rozpúšťadlo). Po dvoch dňoch nebola v reakčnej zmesi zistená prítomnosť východiskovej látky. Bočný produkt, dietyl-(hydroxymetyl)fosfonát je možné zo zmesi odstrániť extrakciou do zriedeného vodného roztoku NaOH. Miernou nevýhodou tejto reakcie je zdĺhavé odstraňovanie trietylfosfitu (bod varu 156 °C). Väčšia časť rozpúšťadla sa dá odstrániť pri silnom vákuu (zapojenie dvoch membránových púmp v sérii a následná koevaporácia s toluénom). Pokúšali sme sa o chromatografické odstránenie zvyšku trietylfosfitu s využitím „flash“ chromatografie. Zvyšky tohto rozpúšťadla boli pomocou EtOAc eluované zo stĺpca v prvých frakciách, následne sa podarilo získať malú časť látky **VI** v čistom stave. Väčšina látky bola zo stĺpca eluovaná s trietylfosfátom, ktorý vznikal oxidáciou z trietylfosfitu. Delenie pred ďalšími reakčnými krokmi by však bolo neefektívne. V ďalších krokoch (Et)₃P=O nevadil, a preto nemusel byť pred ďalším reakčným krokom zo zmesi

odstránený. Z tohto dôvodu nebol celkový výťažok reakcie určený. Odstrániť bolo nutné len trietylfosfit, keďže v ďalšom kroku, odstraňovaní skupiny Boc, by v kyslom prostredí zhydrolyzoval na kyselinu fosforitú, ktorá obsahuje P–H väzbu a mohla by tak v ďalšom kroku pri reakcií Moetdritzer-Iraniho typu konkurovať bis(fosfinovej) kyseline, látke **VIII**.

4.2.3 Reakcia G

Fosfonátové rameno sa podarilo zaviesť aj na cyklám chránený kombináciou benzylových skupín a skupiny Cbz. Na tento účel bola použitá reakcia Abramovovho typu s rovnakými podmienkami ako v prípade látky **VI**.

4.3 Zavedenie metylén-bis(fosfinátového) ramena – spôsob č. 1



Obrázok 4.5. Schéma prípravy látky **X** spôsobom č.1 – *i)* TFA/DCM = 1:1, 40 °C, *ii)* látka **VIII**, (H₂C=O)_n, konc. HCl/H₂O 1:1, 60 °C

4.3.1 Reakcia H

Na začiatok bolo nutné pripraviť metylén-bis(fosfinovú) kyselinu, ktorá mala byť na derivát cyklámu zavádzaná ako druhé pendantné rameno. Kyselina bola pripravená z diizopropylesteru hydrolyzou vo vodnom roztoku 6M HCl pri zahrievaní pod spätným chladičom.

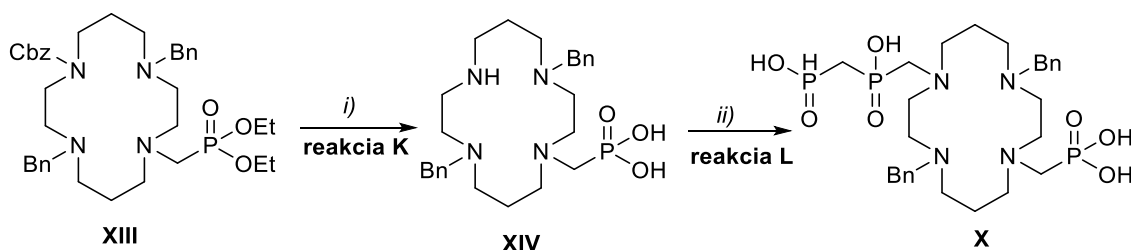
4.3.2 Reakcia I

Spôsob syntézy ligandu č.1 vychádza z látky **VI**. Najskôr bolo nutné odstrániť chrániacu skupinu Boc. Táto skupina bola kvantitatívne odstránená zahrievaním pod spätným chladičom v zmesi TFA:DCM (1:1). K hydrolyze esterov za týchto podmienok nedochádzalo. Produktom bola látka **IX** vo forme trifluoroacetátu a jej použitie v tejto forme pri ďalších reakciách neprekážalo.

4.3.3 Reakcia J

Keďže pripravená metylén-bis(fosfinová) kyselina reaguje pri reakcií Kabachnik-Fieldsovho, resp. Abramovovho typu zle, ale dobre reakciou Moedritzer-Iraniho typu (reakciou vo vodnom kyslom prostredí za zvýšenej teploty) bola na cyklám zavádzaná týmto typom reakcie. Tento typ reakcie môže byť použitý, lebo hydrofilné fosfonátové rameno zvýšilo rozpustnosť východiskovej látky (oproti látke **III**) vo vodnom roztoku HCl. Použitý bol jeden ekvivalent paraformaldehydu, aby bol potlačený vznik možného vedľajšieho produktu, dvoch derivátov cyklámu prepojených cez metylén-bis(fosfinátové) rameno. Vznik takejto látky bol pozorovaný iba v niektorých prípadoch a v minimálnom množstve (konverzia maximálne do 5 % podľa HPLC/MS). Tento bočný produkt nebol izolovaný. Dobrú reaktivitu metylén-bis(fosfinovej) kyseliny dokazuje aj to, že najskôr dochádzalo k samotnej fosfo-Mannichovej reakcii, takže východisková látka **IX** nebola už po jednom dni v zmesi pomocou HPLC/MS pozorovaná. Pozorovaný však nebol ani vznik látky **X** ako dietylésteru. Po dvoch dňoch bolo pozorovaných pomocou HPLC/MS 70 % produktu a 30 % produktu vo forme monoesteru. Po troch dňoch bolo pozorovaných 80 % produktu a 20 % produktu vo forme monoesteru. Na postupnú kvantitatívnu hydrolyzu oboch esterových skupín bolo potrebné čakať 5 dní.

4.4 Zavedenie metylén-bis(fosfinátového) ramena – spôsob č. 2



Obrázok 4.6. Schéma prípravy látky **X** spôsobom č.2 – i) konc. HCl/H₂O 1:1, 100 °C, ii) látka **VIII**, (H₂C=O)_n, konc. HCl/H₂O 1:1, 60 °C

V rámci tejto diplomovej práce bola odskúšaná reakčná sekvencia prípravy cieľového ligandu (látka **XV**) s využitím tohto typu ortogonálneho chránenia, aby bol zvýšený celkový výťažok syntézy. Hlavný rozdiel oproti spôsobu č. 1 je, že bis(fosfinátové) rameno je zavádzané na derivát cyklámu vo forme voľnej kyseliny (látka **XIV**), zatiaľ čo pri spôsobe č. 1 je zavádzané na dietyléster tohto derivátu.

4.4.1 Reakcia K

Odstránenie Cbz chrániacej skupiny v kyslom prostredí prebehlo presne podľa návodu.²³ Látka **XIV** bola vyčistená pomocou „flash“ chromatografie na reverznej fáze. H₃PO₃ vytiekla z kolóny pri elúcii vodou s prídavkom TFA, látka **XIV** následne pri elúcii acetonitrilom s prídavkom TFA vo forme trifluoroacetátu. V tejto forme bola použitá do nasledujúcej reakcie.

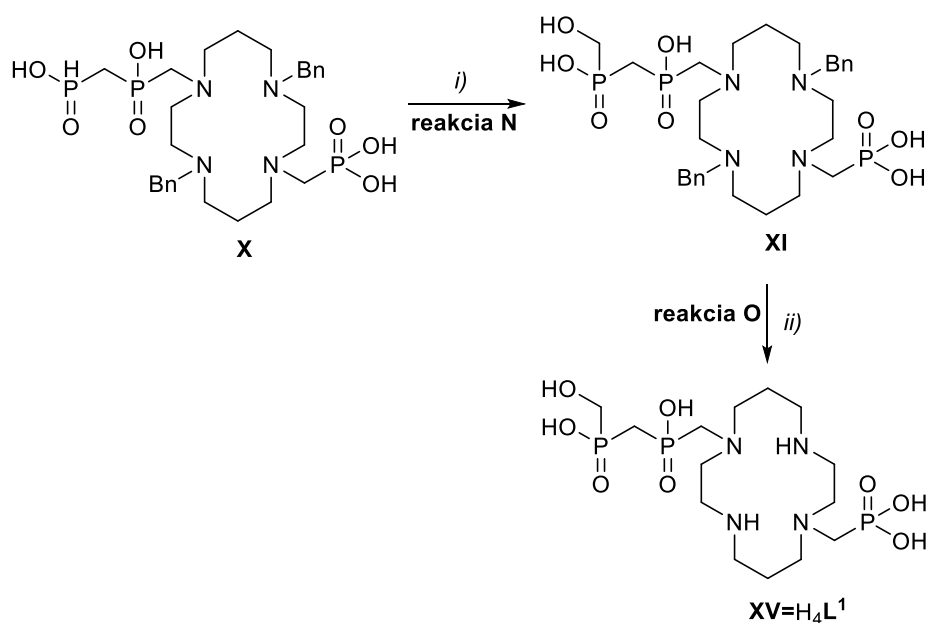
4.4.2 Reakcia L

Pri pokuse uskutočniť reakciu v rovnakých podmienkach ako s látkou **IX** (teda po pridaní 6M vodného roztoku HCl) bol na druhý deň pozorovaný vznik pevnej látky v reakčnej zmesi. Tieto biele kryštály predstavovali východiskovú látku **XIV**, ani zväčšenie objemu použitého rozpúšťadla (80 ml 6M vodného roztoku HCl) nestačilo na úplné rozpustenie kryštálov. Reakčná zmes bola ponechaná reagovať vo väčšom objeme, pričom sa podarilo dosiahnuť konverziu 80 %, ktorá sa ďalej zvyšovala len pomaly. Výrazným problémom pri tejto reakcii bol vznik vedľajšieho produktu, dochádzalo totiž k *N*-metylácii na doposiaľ nezreagovanej, a teda jedinej voľnej aminoskupine cyklu. Tento *N*-metylovaný produkt nebol izolovaný, ale bol zistený pomocou HPLC/MS. Táto bočná reakcia nebola pozorovaná pri syntéze ligandu spôsobom č. 1 z dietylésteru fosfonovej kyseliny (látky **IX**). Reakčná zmes bola odparená a bol prisýpaný veľký nadbytok paraformaldehydu (50 ekvivalentov), čím začalo dochádzať k následnej **reakcií N**, *P*-hydroxometylácií.

4.4.3 Reakcia M

Pri testovaní **reakcie L** boli zistené problémy (vznik vedľajšieho produktu, problémy s dosiahnutím konverzie 100%, dlhá doba reakcie), ktoré boli zapríčinené tým, že východisková látka **XIV** bola vo forme voľnej kyseliny. Následne sme sa pokúsili získať východiskovú látku vo forme dietylésteru (látky **IX**). Aby však mohlo byť využité ortogonálne chránenie cyklu s väčším výťažkom, bolo potrebné látku **IX** pripraviť z látky **XIII** odstránením chrániacej skupiny Cbz pri zachovaní benzylových skupín (ide o prepojenie spôsobu č. 1 a spôsobu č. 2 zavedenia bis(fosfinátového) ramena). Táto reakcia bola uskutočnená na základe postupu uvedeného v diplomovej práci²³ ale z podstatne väčšieho množstva. Bolo zistené, že reakcia trvala dlhšie ako v pôvodne uvedenom postupe (sedem hodín miesto dvoch hodín). Rovnako bolo zistené, že po ôsmich hodinách reakcie začalo dochádzať k odstráneniu jednej z benzylových chrániacich skupín, preto bolo dôležité reakciu včas zastaviť.

4.5 Syntéza cieľového ligandu



Obrázok 4.7. Schéma prípravy cieľového ligandu – i) (H₂C=O)_n, 6M HCl, 80 °C, ii) H₂, 10 % Pd-C, AcOH, H₂O

Aby bolo možné v poslednom kroku reakčnej schémy odstrániť benzylové chránenie ligandu hydrogenáciou s využitím paládia, bolo nutné aby sa v reakčnej zmesi nenachádzala zlúčenina s P–H väzbou, aby nedošlo k otráveniu katalyzátora. Produkt reakcie látka X obsahovala P–H väzbu, rovnako ako nadbytočná metylén-bis(fosfinová) kyselina. Z tohto dôvodu bolo nutné modifikovať bis(fosfinové) rameno *P*-hydroxometyláciou na atóme fosforu. Bolo zistené, že pri rovnakej teplote v akej prebiehala fosfo-Mannichova reakcia so zavádzaním bis(fosfinátového) ramena (60 °C), hydroxometylácia prebiehala v minimálnej miere. K tejto reakcii došlo až pri zvýšenej teplote (80 °C) v nadbytku paraformaldehydu (pri použití 8 ekvivalentov).

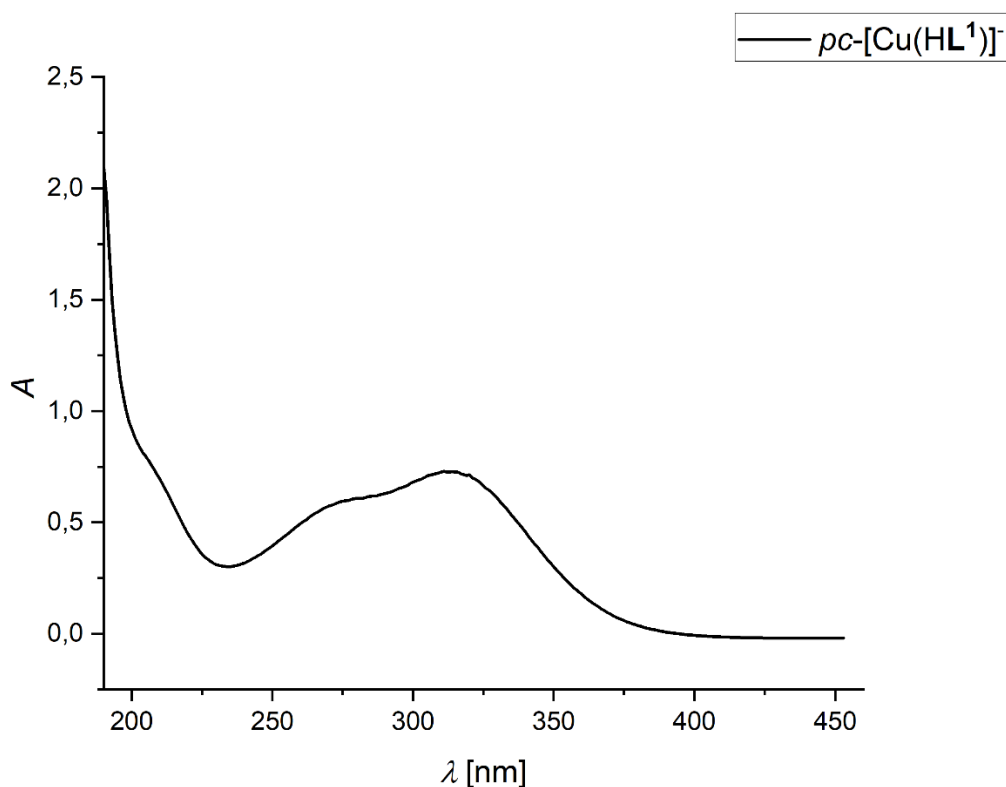
Reakčná zmes musela byť pred hydrogenáciou čistená, zvolilo sa čistenie pomocou preparatívnej „flash“ chromatografie na reverznej fáze, ktorým sa odstránili nečistoty nahromadené počas predchádzajúcich reakcií. Vďaka malému rozdielu v štruktúre by bolo veľmi obtiažne oddeliť látku X od látky XI, preto je treba dôsledne dbať na to, aby pri *P*-hydroxometylácii bola vždy dosiahnutá konverzia 100 %. Na čistenie bol použitý gradient opísaný ako metóda M3.

Hydrogenačné odstránenie chrániacich benzylových skupín prebiehalo kvantitatívne v kyslom prostredí zabezpečenom kyselinou octovou. Konverzia 100 % bola potvrdená pomocou HPLC/MS. Reakcia mohla byť odstavená už po jednom dni. V prípade, že reakčná

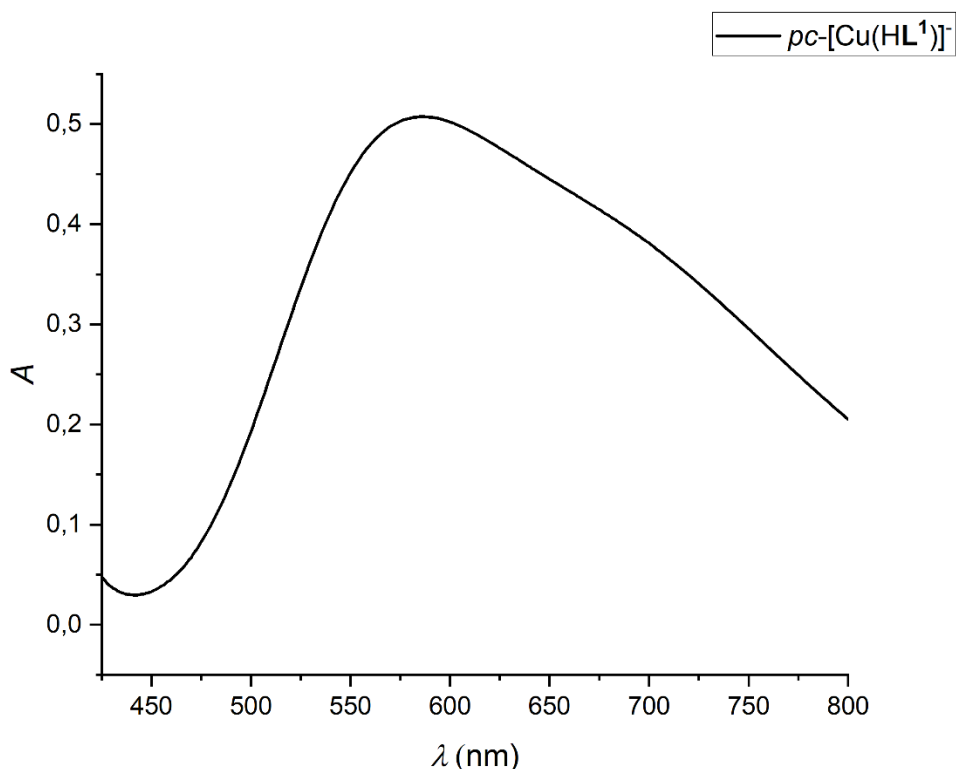
zmes bola ponechaná reagovať dlhšie dochádzalo k rozkladu produktu. Keďže východisková látka **XI** bola do hydrogenačnej reakcie použitá po vyčistení vo forme trifluoroacetátu, mal výsledný produkt (látka **XIV**= H_4L^1) tiež formu trifluoroacetátu.

4.6 Med'naté komplexy

V rámci tejto práce bol pripravený med'natý komplex cieľového ligandu (látka H_4L^1) s vodným roztokom $CuCl_2$. Koordináciu hneď po zmiešaní ligandu so soľou naznačovalo intenzívne modré sfarbenie roztoku, čo tiež naznačovalo vznik pentakoordinovaného izoméru^{18,31} $pc-[CuHL^1]^-$. Komplex bol charakterizovaný pomocou HPLC/MS a UV-Vis spektroskopie (Graf 4.1. a Graf 4.2.).



Graf 4.1. UV-Vis spektrum pentakoordinovaného komplexu s absorbným LMCT pásom ($\approx 240\text{--}370$ nm).



Graf 4.2. UV-Vis spektrum pentakoordinovaného komplexu s d–d prechodom.

Bola snaha vykryštalizovať pripravený meďnatý komplex, ale tento pokus nebol úspešný. Štruktúra pripravenej koordinačnej zlúčeniny sa dá usudzovať na základe podobných meďnatých komplexov, ktoré boli pripravené a charakterizované, príkladom je 1,8-bis(fosfonát) cyklám (H_4te2p)¹⁸, bis(fosfinát) cyklám (H_2te1PP).³¹ Pri týchto komplexoch bol pozorovaný vznik dvoch izomérov. Pentakoordinovaný komplex (*pc*) vždy vznikol za laboratórnej teploty a pri vyššej teplote prechádzal na hexakoordinovaný komplex *trans*-O,O.

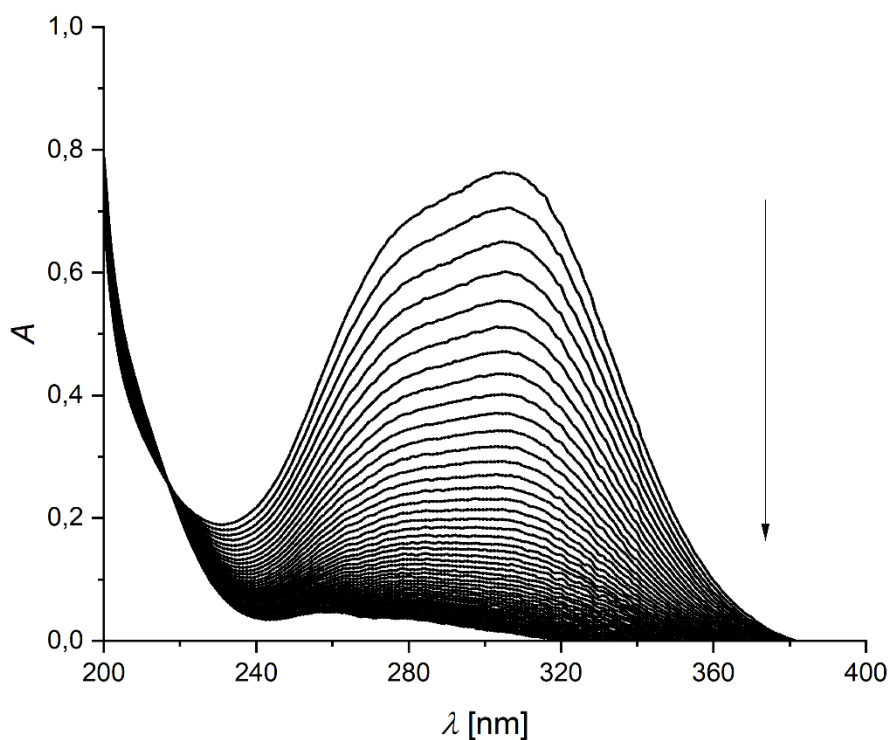
Modrý komplex $pc-[Cu(te2p)]^{2-}$ vznikol už pri laboratórnej teplote, meďnatý ión je koordinovaný štyrmi atómami dusíka cyklámu a jedným kyslíkom fosfonátového ramena, druhá fosfonátová skupina nie je koordinovaná.¹⁸ Výsledný komplex mal tvar medzi trigonálnou bipyramídou a tetragonálnou pyramídou.

Analogicky sa dá usudzovať, že pri podmienkach prípravy vznikol modrý komplex $pc-[CuHL^1]^-$ pripraveného ligandu. Zmeraný bol absorbný LMCT pás s maximom pri 311 nm. Široký pás, ktorý odpovedá d–d prechodom je zaznamenaný vo viditeľnej oblasti s maximom pri 586 nm.

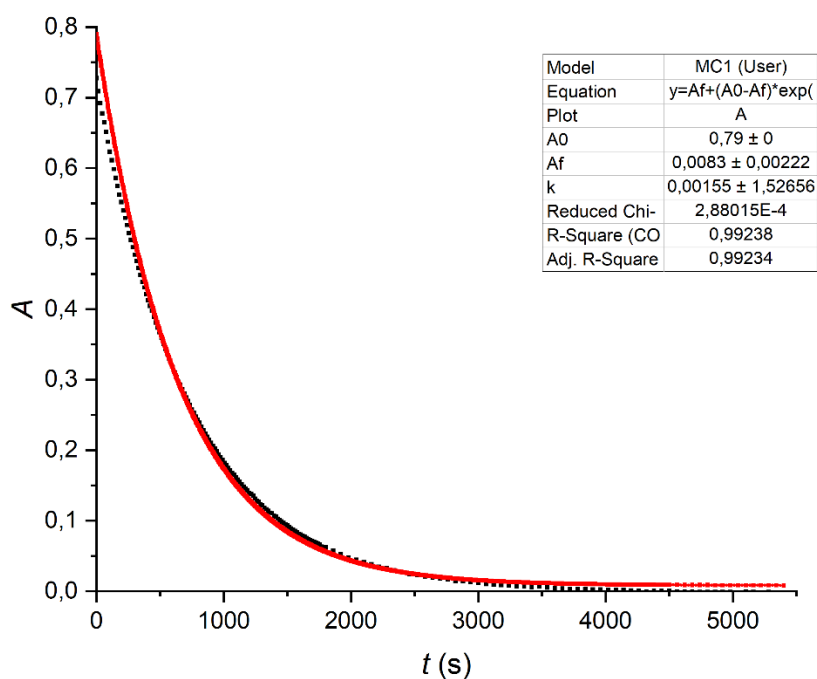
4.7 Disociačné kinetiky

Kyslo katalyzovaná disociácia bola študovaná spektrofotometricky na pentakoordinovanom komplexe. Merania prebiehali pri konštantnej iónovej sile $I(\text{Na,H})\text{ClO}_4 = 5,0 \text{ M}$ pri teplote $25,0 \pm 0,1 \text{ }^\circ\text{C}$, pričom sa menila koncentrácia HClO_4 . V grafe 4.3. je uvedený príklad meraných absorbancií pri vlnovej dĺžke 311 nm v čase pre disociáciu pri koncentrácii HClO_4 5,0 M.

Po naprotonovaní fosfonátovej skupiny sa ďalší protón naviaže na atóm dusíka, na ktorom je zavedené bis(fosfinátové) rameno a dôjde k vyviazaniu iónu medi z komplexu.



Graf 4.3. Disociácia komplexu v kyslom prostredí ($25 \text{ }^\circ\text{C}$, $c(\text{HClO}_4) = 5,0 \text{ M}$). Spektrá boli odčítané po 60 s v intervale 1 h.



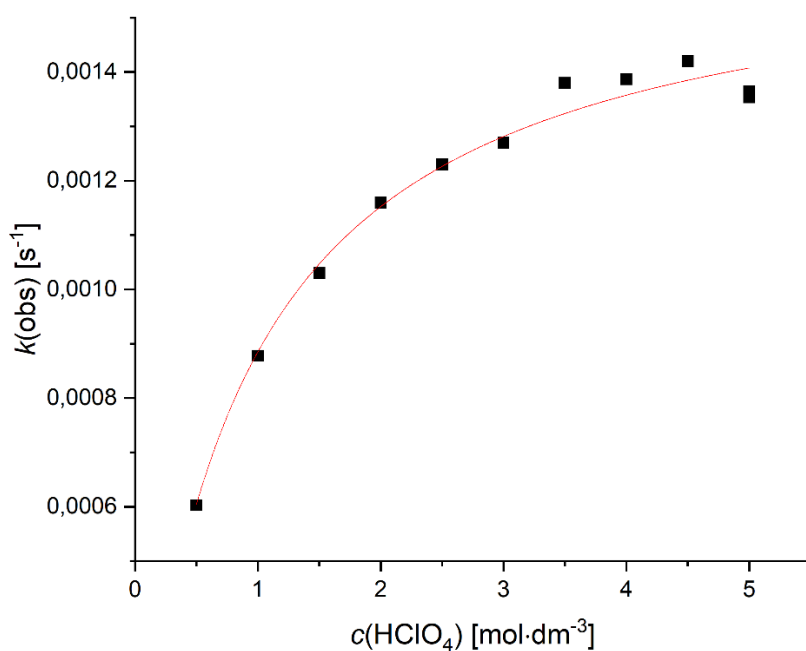
Graf 4.4. Príklad disociácie komplexu v kyslom prostredí (25 °C, $c(\text{HClO}_4) = 5,0 \text{ M}$) v čase pri vlnovej dĺžke, ktorá odpovedá LMCT prechodu.

Závislosti absorbancie na čase pri jednotlivých koncentráciách HClO_4 pri vlnovej dĺžke 311 nm boli preložené rovnicou odpovedajúcou kinetike (pseudo) 1. poriadku (4.1.).

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

pričom A je absorbancia, A_∞ je koncová absorbancia, A_0 je počiatočná absorbancia, k_{obs} je pozorovaná rýchlostná konštanta a t je čas.

Dáta z meraní disociačných kinetík pri rôznych koncentráciách kyseliny boli spracované a do grafu bola vynesená závislosť rýchlostnej konštanty k_{obs} na koncentrácii HClO_4 (graf 4.5.). Tieto dáta boli preložené rovnicou (4.2.)¹⁸

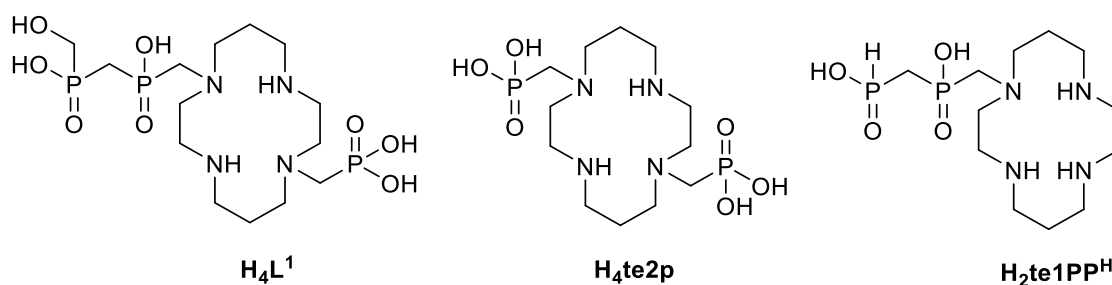


Graf 4.5. Závislosť pozorovaných rýchlostných konštánt disociácie komplexu v kyslom prostredí (25 °C, $I(\text{Na,H})\text{ClO}_4 = 5,0 \text{ M}$) na koncentracíi HClO_4 .

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

kde k_{obs} je pozorovaná rýchlostná konštanta, k_0 je rýchlostná konštanta disociácie bez asistencie protónu, k_1 je rýchlostná konštanta kyslo katalyzovanej disociácie a K_H je protonizačná konštanta, $[\text{H}^+]$ je koncentrácia protónov.

Získané parametre sú uvedené v tabuľke 4.1.



Obr. 4.8. Pripravený cieľový ligand a porovnávané ligandy v rámci disociačných kinetík

Tabuľka 4.1. Vypočítané parametre kyslo katalyzovanej disociácie pre komplex pc -[CuHL¹] a porovnanie výsledkov s literatúrou^{18,31}

Komplexy	k_l [s ⁻¹]	K_H [M ⁻¹]	$t_{1/2}$ [min] ¹
pc -[CuL ¹] ²⁻	$(16,5 \pm 0,3) \cdot 10^{-4}$	$1,16 \pm 0,01$	9
pc -[Cu(te2p)] ²⁻	$(8,5 \pm 0,3) \cdot 10^{-4}$	$1,9 \pm 0,1$	20
pc -[Cu(te1PP ^H)] ⁻	$(25,9 \pm 0,4) \cdot 10^{-4*}$	$1,92 \pm 0,07*$	5*

¹ pri $c(\text{HClO}_4) = 5,0 \text{ M}$

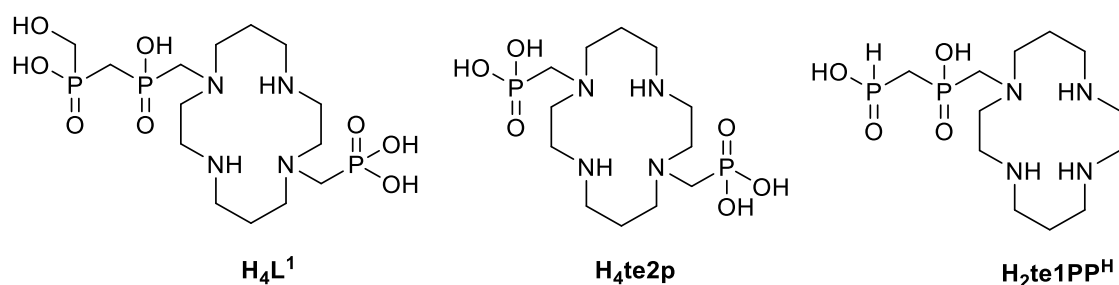
*merania vykonané pri 60 °C

Z uvedených hodnôt k_l je zrejmé, že komplex s ligandom syntetizovaným v rámci tejto diplomovej práce má mierne nižšiu kinetickú inertnosť oproti komplexu [Cu(te2p)]²⁻ a mierne vyššiu inertnosť oproti komplexu [Cu(te1PP^H)]⁻. To sa odzrkadľuje aj na hodnotách polčasu rozpadu ich med'natých komplexov. Hodnoty sú však vo všeobecnosti porovnateľné a všetky komplexy je možné pokladať za vysoko kineticky inertné.

5 Záver

V rámci tejto diplomovej práce bol pripravený nový cieľový ligand a bola optimalizovaná syntetická cesta k tomuto ligandu. Syntéza zahŕňala ortogonálne chránenie cyklámu a následné zavádzanie pendantných ramien.

Pripravený bol pentakoordinovaný komplex ligandu s meďnatým iónom. Tento komplex bol charakterizovaný pomocou UV-Vis a HPLC. Preštudovaná bola jeho disociácia v kyslom prostredí. Komplex ligandu H_4L^1 vykazoval porovnateľnú kinetickú inertnosť ako komplexy príbuzných ligandov H_4te2p a H_2te1PP^H , a teda mohol by byť vhodný pre využitie v rádiomedicíne.



Obr. 5.1. Pripravený cieľový ligand a porovnávané ligandy

6 Zoznam použitých skratiek

Ac – acetyl

Boc – *t*-butyloxykarbonyl

Bn – benzyl

Cbz – benzyloxykarbonyl

CT – charged transfer

DCM – dichlórmetán

DEP – dietylfosfit

DIIPA – diizopropylamín

Et – etyl

ESI – elektrónová sprejová ionizácia (electrospray ionization)

EZ – elektrónový záchyt

HPLC – vysokoúčinná kvapalinová chromatografia (high performance liquid chromatography)

LMCT – pás prenosu náboja z ligandu na kov (ligand-to-metal charged transfer)

Me – metyl

MF – mobilná fáza

MS – hmotnostná spektrometria (mass spectrometry)

NMR – nukleárna magnetická rezonancia

PET – positron emission tomography

Ph – fenyl

py – pyridín

qNMR – kvantitatívne NMR

R_f – retardačný faktor

RT – laboratórna teplota (room temperature)

RVO – rotačná vákuová odparka

SPECT – single-photon emission computed tomography

Su – sukcinimid

TFA – kyselina trifluóroctová

TLC – tenkovrstvová chromatografia (thin layer chromatography)

TMS – tetrametylsilán

UV – ultrafialový

UV-Vis – ultrafialovo-viditeľný

7 Použitá literatúra

- (1) Wadas, T. J.; Wong, E. H.; Weisman, G. R.; Anderson, C. J. *Chem. Rev.* **2010**, *110* (5), 2858–2902.
- (2) Pimlott, S. L.; Sutherland, A. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *40* (1), 149–162.
- (3) Omami, G.; Tamimi, D.; Branstetter, B. F. *Imaging Sci. Dent.* **2014**, *44* (4), 325–332.
- (4) Havránek, E. *Rádiofarmaká*, Univerzita Komenského v Bratislave, **2017**, ISBN: 978-80-223-4139-4
- (5) Chatterjee, S.; Lesniak, W.; Nimmagadda, S. *Mol. Imaging* **2017**, *16*, 153601211771845.
- (6) Salih, S.; Alkatheeri, A.; Alomaim, W.; Elliyanti, A. *Molecules* **2022**, *27* (16), 5231.
- (7) Blower, P. J.; Lewis, J. S.; Zweit, J. *Nucl. Med. Biol.* **1996**, *23* (8), 957–980.
- (8) Curiumpharma (**2022**) FDA Approval of a Generic Version of DaTscan™
<https://www.curiumpharma.com/2022/04/05/curium-announces-fda-approval-of-a-generic-version-of-datscan-ioflupane-i-123-injection-in-the-u-s/> (cit. 6.5.2023).
- (9) Chhabra, A.; Thakur, M. L. *Biomedicines* **2022**, *10* (11), 2787.
- (10) Clarity Pharmaceuticals Ltd. (**2023**): 67Cu-SARTATE™ Clinical Trial, [online],
<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04023331>, (cit. 16.5. 2023)
- (11) Paúrová, M.; Havlíčková, J.; Pospíšilová, A.; Vetrík, M.; Císařová, I.; Stephan, H.; Pietzsch, H.-J.; Hrubý, M.; Hermann, P.; Kotek, J. *Chem. – Eur. J.* **2015**, *21* (12), 4671–4687.
- (12) Pandya, D. N.; Kim, J. Y.; Park, J. C.; Lee, H.; Phapale, P. B.; Kwak, W.; Choi, T. H.; Cheon, G. J.; Yoon, Y.-R.; Yoo, J. *Chem. Commun.* **2010**, *46* (20), 3517–3519.
- (13) Chapman, J.; Ferguson, G.; Gallagher, J. F.; Jennings, M. C.; Parker, D. Copper and *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* **1992**, *3*, 345–353.
- (14) Bass, L. A.; Wang, M.; Welch, M. J.; Anderson, C. J. *Bioconjug. Chem.* **2000**, *11* (4), 527–532.
- (15) Kotek, J.; Vojtíšek, P.; Císařová, I.; Hermann, P.; Jurečka, P.; Rohovec, J.; Lukeš, I. *Collect. Czechoslov. Chem. Commun.* **2000**, *65* (8), 1289–1316.
- (16) Lukeš, I.; Kotek, J.; Vojtíšek, P.; Hermann, P. *Coord. Chem. Rev.* **2001**, *216–217*, 287–312.
- (17) J. Stigers, D.; Ferdani, R.; R. Weisman, G.; H. Wong, E.; J. Anderson, C.; A. Golen, J.; Moore, C.; L. Rheingold, A. *Dalton Trans.* **2010**, *39* (7), 1699–1701.

- (18) Kotek, J.; Lubal, P.; Hermann, P.; Císařová, I.; Lukeš, I.; Godula, T.; Svobodová, I.; Táborský, P.; Havel, J. *Chem. – Eur. J.* **2003**, *9* (1), 233–248.
- (19) Svobodová, I.; Lubal, P.; Plutnar, J.; Havlíčková, J.; Kotek, J.; Hermann, P.; Lukeš, I. *Dalton Trans.* **2006**, *43*, 5184–5197.
- (20) Blahut, J. *Bifunkční chelatanty dvojmocné mědi*, bakalářská práce (Praha, **2011**)
- (21) Fensterbank, H.; Berthault, P.; Larpent, C. *Eur. J. Org. Chem.* **2003**, *2003* (20), 3985–3990.
- (22) Royal, G.; Dahaoui-Gindrey, V.; Dahaoui, S.; Tabard, A.; Guillard, R.; Pullumbi, P.; Lecomte, C. *Eur. J. Org. Chem.* **1998**, *1998* (9), 1971–1975.
- (23) Hörnerová, A. *Bifunkční ligandy na bázi cyklamu pro selektivní komplexace iontů kovů*, diplomová práce (Praha, **2022**).
- (24) Bellouard, F.; Chuburu, F.; Kervarec, N.; Toupet, L.; Triki, S.; Mest, Y. L.; Handel, H. *J. Chem. Soc. Perkin 1 Trans* **1999**, *23*, 3499–3505.
- (25) Bucher, C.; Royal, G.; Barbe, J.-M.; Guillard, R. *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40* (12), 2315–2318.
- (26) David, T.; Procházková, S.; Havlíčková, J.; Kotek, J.; Kubíček, V.; Hermann, P.; Lukeš, I. *Dalton Trans.* **2013**, *42* (7), 2414–2422.
- (27) Chrappa, M. *Syntéza nesymetricky substituovaných derivátov cyklámu*, bakalářská práce (Praha, **2021**).
- (28) Urbanovský, P. *Complexes of Cyclen-Based Macrocyclic Ligands with a Phosphinate Pendant Arm*, dizertační práce (Praha, **2020**).
- (29) Moedritzer, K.; Irani, R. R. *J. Org. Chem.* **1966**, *31* (5), 1603–1607.
- (30) Mangl, O. *Selektivní chránění pentaerythryl-tetraaminu*, bakalářská práce (Praha, **2013**).
- (31) David, T.; Kubíček, V.; Gutten, O.; Lubal, P.; Kotek, J.; Pietzsch, H.-J.; Rulíšek, L.; Hermann, P. *Inorg. Chem.* **2015**, *54* (24), 11751–11766.