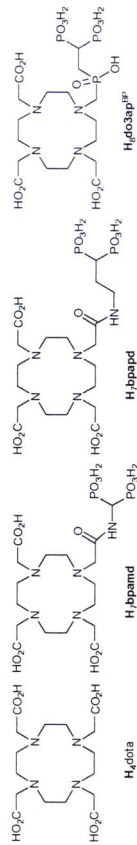


Shrnutí

Prezentovaná práce je pokračováním výzkumu, který započali Kubiček *et al.*¹ syntézou ligandu H₇bpamd (Obr. 1) a studiem jeho Gd(III) komplexu jako potenciální kontrastní látky k zobrazování kostní tkáně za pomoci nukleární magnetické rezonance (MRI). Cílem této práce byla syntéza dalších dvou makrocyclických ligandů (analogických H₄dota), H₇bpapd and H₄do3ap^{BP} (Obr. 1) s bis(fosfonovými) kyselinou v postranním řetězci. Dále pak srovnávací fyzikálně-chemická studie jejich komplexů s trojmočnými ionty lanthanoidů, které se váží na kosti a mohou být potenciálně využity v MRI, radiodiagnostice, radioterapii and k tlumení bolesti kostí.



Obr. 1 Diskutované ligandy.

Požadované ligandy byly připraveny podle Schématu 1 a 2. Všechny tři studované ligandy tvoří okta-koordinované komplexy s trojmočnými ionty lanthanoidů, deváté koordináční místo je obsazeno koordinovanou molekulou vody. Bis(fosfonová) skupina není koordinována k iontu lanthanoidu a zůstává připravena k dalšímu typu interakce (např. k adsorpci na hydroxyapatit (HA) nebo k interakci s jinými ionty kovů). I přes případnou interakci bis(fosfonové) skupiny zůstává molekula vody koordinována.

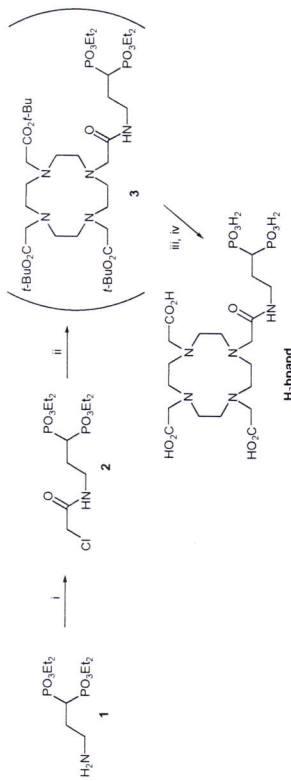


Schéma 1 Syntéza ligandu H₇bpapd (výtěžek 30 % vztaženo na *t*-Bu₂do3a-HBr). i) ClCH₂C(O)Cl, acetonitril, K₂CO₃, -50 °C to RT, 24 h; ii) *t*-Bu₂do3a-HBr, acetonitril, K₂CO₃, RT, 4 d; iii) CF₃COOH/CH₂Cl₂ (1:1), reflux, 12 h; iv) 30% HBr v bezvodé AcOH, RT, 24 h.

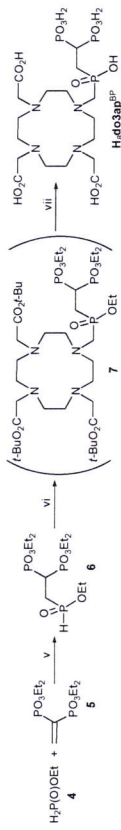


Schéma 2 Syntéza ligandu H₄do3ap^{BP} (výtěžek 75 % vztaženo na *t*-Bu₂do3a-HBr). (v) tetrahydrofuran, DIPEA, 25 °C, 12 h; (vi) *t*-Bu₂do3a-HBr, (CH₂O)_n, toluen, 90–100 °C, 15–24 h; (vii) 6 M HCl, reflux, 12 h.

Komplexy ligandu H₄dota and jeho derivátů s trojmočnými lanthanoidy vytváří v roztoku dva diastereomery: čtvercově antiprizmatický (SA) and zkřížený čtvercově antiprizmatický (TSA).² Prochirální atom fosforu fosfonové skupiny v postranním řetězci ligandu H₄do3ap^{BP} dává po koordinaci fosfonové skupiny vznik dalšímu centru chirality, což teoreticky vede ke čtyřem párum enantiomerních diastereomerů. Selektivní vznik pouze dvou diastereomerů z nich však napovídá, že se atom fosforu koordinované fosfonové skupiny vyskytuje výhradně v jedné z konfigurací (*R/S*). Bohužel se jí nepodařilo absolutně přiřadit. U komplexů daného ligandu s lanthanoidy na konci periody se objevuje velmi malá množství třetího diastereomeru.

U významně zastoupených diastereomerů Yb(III) komplexů studovaných ligandů, H₇bpamd, H₇bpapd a H₄do3ap^{BP}, byly stanoveny hodnoty p*K*_a (Tabulka 1). Hodnoty p*K*_a komplexů Yb-bpamd, Yb-do3ap^{BP} společně s p*K*_{a1} a p*K*_{a2} komplexu Yb-bpamd odpovídají obvyklým hodnotám bis(fosfonové) skupiny.³ Nadřadnou stranu, p*K*_{a3} a p*K*_{a4} komplexu Yb-bpamd jsou výrazně vyšší, což může být způsobeno stabilizací mono- a diprotonizované formy relativně silnými vodíkovými vazbami mezi fosfonátovými funkčními skupinami a makrocyklem.

Tabulka 1 Hodnoty p*K*_a bis(fosfonové) skupiny významně zastoupených diastereomerů (SA, TSA) ve vodném roztoku komplexů Yb-bpamd, Yb-bpapd a Yb-do3ap^{BP}, (25 °C). Molární frakce diastereomeru SA a TSA je uvedena v závorce. 'A' označuje plně deprotonovaný komplex. Náboje jsou vynechány pro jednoduchost. První dvě hodnoty p*K*_a komplexu Yb-do3ap^{BP} se nepodařilo stanovit.

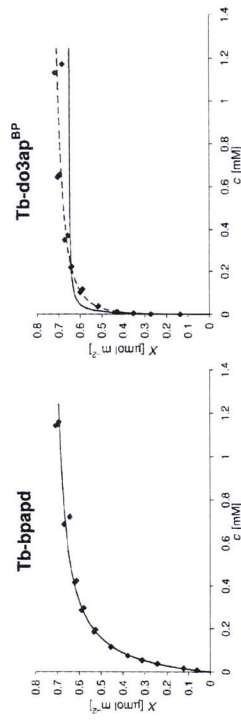
Rovnováha	Yb-bpamd		Yb-bpapd		Yb-do3ap ^{BP}	
	SA (100 %)	p <i>K</i> _a	SA (93 %)	p <i>K</i> _a	SA (56 %)	TSA (38 %)
H + H ₃ A ↔ H ₄ A	1.8	1.6	—	—	—	—
H + H ₂ A ↔ H ₃ A	4.9	4.1	—	—	—	—
H + HA ↔ H ₂ A	9.0	6.7	7.0	7.0	7.0	7.0
H + A ↔ HA	> 13	10.9	11.2	11.2	11.2	11.2

Účinnost potenciální CA pro MRI se obvykle vyjadřuje pomocí relaxivity *r*₁, což je relaxační rychlost protonů vody v 1 mM roztoku odpovídajícího Gd(III) komplexu. Gd(III)

komplex monofosfátu H_8do3ap^{BP} má významně vyšší 1H relaxivitu v roztoku ($^{298}r_1 = 7.4 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$) než $Gd(III)$ komplexy obou monoamidů, H_7bpamd ($^{298}r_1 = 5.3 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$) a H_7bpapd ($^{298}r_1 = 5.0 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$), při 20 MHz. Důvodem je výrazně lepší hodnota rezidenčního času τ_m koordinované molekuly vody komplexu $Gd-do3ap^{BP}$, dále vyšší hodnota rotačního korelačního času τ_c , a v neposlední řadě významný příspěvek druhé sféry molekul vody k celkové relaxivitě.

Relaxometrická studie s týmiž $Gd(III)$ komplexy, tentokrát však adsorbovanými na povrchu HA (model kostní tkáně), ukázala přibližně trojnásobný nárůst hodnoty r_1 . Tento nárůst je výsledkem omezené pohyblivosti (flexibility) nasorbovaného komplexu na povrch HA. Na základě těchto výsledků lze předpokládat, že studované látky by mohly být použity jako pozitivní kontrastní látky pro MRI.

Adsorpční schopnosti komplexů trojmocných lanthanoidů s ligandy H_7bpapd and H_8do3ap^{BP} byly studovány na $Tb(III)$ komplexech s obsahem radionuklidu ^{160}Tb . Komplexy obou ligandů vykazují velmi rychlou, reverzibilní adsorpci na povrch HA. Adsorpční chování studovaných komplexů bylo popsáno modelem podle Langmuira, kterému odpovídá adsorpce komplexů s ligandem H_7bpapd a modelem Langmuirův-Freundlichovým, který vyhovuje komplexum ligandu H_8do3ap^{BP} (Obr. 2). Adsorpční parametry jsou shrnuty v Tabulce 2. Maximální adsorpční kapacity X_m , všech komplexů odpovídají na základě molekulového modelování monomolekulárnímu pokrytí. Afinitní konstanty K komplexů $Tb-bpamd$ a $Tb-do3ap^{BP}$ jsou vyjimečně vysoké.



Obr. 2 Adsorption izotermu komplexů $Tb-bpamd$, $Tb-do3ap^{BP}$ na HA při 25 °C. Křivky reprezentují výsledky fitování experimentálních dat pomocí Langmuirova modelu (plná čára). Přerušovaná křivka představuje fitování podle Langmuirova-Freundlichova modelu.

Tabulka 2 Adsorpční parametry $Tb(III)$ komplexů studovaných ligandů. Pokud není uvedeno jinak, parametry byly získány pomocí Langmuirova modelu. Fixní parametry jsou v závorce.

Adsorpční parametr	$Tb-bpamd^1$	$Tb-bpapd$	$Tb-do3ap^{BP}$	$Tb-do3ap^{BF(7)}$
$X_m/10^{-6} [\text{mol m}^{-2}]$	0.62 ± 6	0.722 ± 10	0.652 ± 18	0.778 ± 18
$K/10^3 [L \cdot \text{mol}^{-1}]$	196 ± 11	14.1 ± 2	249 ± 44	129 ± 21
n	(1)	(1)	(1)	0.46 ± 3

¹ Langmuirův-Freundlichův model.

In vivo adsorpční vlastnosti, specifita pro kostní tkáň a retence v těle byla studována jednofotonovou emisní tomografií (SPECT) na Lewisových potkanech. Intravenózně byly aplikovány $Lu(III)$ komplexy ligandů H_7bpamd and H_7bpapd s obsahem radionuklidu ^{177}Lu (Obr. 3). Bylo potvrzeno, že oba komplexy jsou značně selektivní pro kostní tkáň, vykazují velmi ranou retenci na kostech obzvláště pak v místech novotvorby kostní tkáně. K vymývání ^{177}Lu -komplexů dochází převážně přes ledviny. Zdá se však, že je vymývání příliš pomalé, což není v souladu s možnou aplikací látek v MRI. Na druhé straně, pomalé vymývání může být výhodou pro paliativní léčbu kostí.

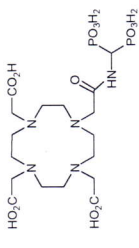
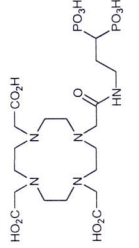
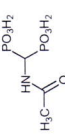

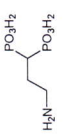
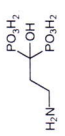



Obr. 3 γ -scintigrafický obrázek potkana 76 h po aplikaci $Lu-bpamd$ komplexu s ^{177}Lu .

Kromě výše uvedených výsledků týkajících se cílení kosti a potenciální aplikace studovaných látek v medicíně, jsme se také zaměřili teoreticky na modely popisující adsorpci dvou adsorbátů najednou. Některé modely popisující současnou adsorpci (tj. ko-adsorpci) dvou složek byly publikovány.⁴ Modely však vyžadují znalost adsorpčních parametrů dílčích složek a neumožňují využít jednu z látek jako 'průbu' pro studium druhé. Proto jsme navrhli nový fyzikálně-chemický model, založený na Langmuirově adsorpční izotermě, který je vhodný k nepřímému stanovení adsorpčních vlastností ko-adsorbujícího bis(fosfonátu). Pro tento účel byl jako sonda použit komplex $Tb-bpapd$ obsahující ^{160}Tb . Výsledky získané tímto modelem mohou být vyhodnoceny buď kvalitativně (a to jednoduchým porovnáním experimentálních dat několika systémů), stejně jako kvantitativně (hodnoty parametrů X_m a K je možno získat simultánním fitováním experimentálních dat). Model byl úspěšně testován na několika ko-adsorbujících bis(fosfonátech). Stanovené maximální adsorpční kapacity X_m a afinitní konstanty K jsou uvedeny v Tabulce 3. Lze očekávat, že kromě navržené 'průby'

(komplexu $^{160}\text{Tb-bpabd}$), může být podobným způsobem využit jakýkoli další 'jednoduchý' bis(fosfonát), který by byl značený (např. ^{14}C , ^{32}P) a vykazoval by adsorpční chování podle Langmuira. Pokud je tento předpoklad správný, vyřešil by se i problém obtížné dostupnosti ligandu H₇bpabd.

Tabulka 3 Adsorpční parametry několika bis(fosfonátů) získané simultánním fitováním dat ko-adsorpčních experimentů s využitím komplexu $^{160}\text{Tb-bpabd}$ jako próby. Model je založen na adsorpčním chování podle Langmuira ($n = 1$).

Konkurenční bis(fosfonát)	Adsorpční parametr $X_w / 10^{-6} [\text{mol m}^{-2}] K / 10^3 [\text{L mol}^{-1}]$
	H ₇ bpamd 0.609 ± 8 236 ± 39
	H ₇ bpabd 0.687 ± 63 29 ± 7
	H ₄ acmp2 1.19 ± 3 46 ± 5
	H ₄ amp2 2.00 ± 7 59 ± 13
	H ₄ app2 1.50 ± 6 16 ± 2
	H ₄ pam (pamidronate) 1.82 ± 7 44 ± 10
	H ₄ hedp (etidronate) 1.58 ± 5 53 ± 9

Dalším příspěvkem k předložené dizertační práci jsou zatím předběžné výsledky studia změny relaxivity r_1 komplexu Gd-do3ap^{BP} v reakci na přítomnost iontů kovu. Je známo, že bis(fosfonáty) silně chelatují dvojmocné a trojmocné ionty kovů. Bis(fosfonát), jakožto

jednotka, koordinuje často dva či více iontů kovu za tvorby koordinačních oligomerů and polymerů (COP) v roztoku i v pevné fázi.⁵ COP mohou obsahovat různý poměr kovu a ligandu. Vznik COP je především dán typem koordinovaného iontu kovu a jeho konstantami stability s bis(fosfonovou) skupinou.³ Tvorba COP byla v roztoku pozorována u komplexu Gd-do3ap^{BP} v přítomnosti dvojmocných iontů kovu (např. Zn²⁺, Ca²⁺, Mg²⁺). Jako doprovodný jev byl pozorován značný nárůst hodnoty r_1 (více než o 400 % při 20 MHz a 37 °C), což je důsledek zbrzdění a omezení volného pohybu molekul a jejich částí (Tabulka 4). Změny ¹H relaxivity jsou závislé na typu a koncentraci iontu kovu a na pH. Tento jev by mohl být aplikován ve vývoji *in vitro* a *in vivo* 'responsive' kontrastních látek. Proto jsou bis(fosfonátové) komplexy velice slibné pro další studium potenciálních kontrastních látek citlivých na pH a koncentraci iontu kovu.

Tabulka 4 ¹H relaxivity r_1 komplexu Gd-do3ap^{BP} měřena po přidavku vybraných endogenních dvojmocných iontů kovu. Veškeré vzorky byly měřeny ve vodných roztocích (2.0 mM Gd-do3ap^{BP}, 37 °C, pH = 7.1–7.4). Pro srovnání jsou uvedeny hodnoty r_1 komplexu Gd-do3ap^{BP} bez přidání iontu kovu.

Proton M ²⁺	Poměr M ²⁺ /Gd-do3ap ^{BP}	20 MHz r_1 [s ⁻¹ mM ⁻¹]	60 MHz
–	–	5.6	5.1
Mg	3	13.6	12.6
	10	17.9	17.0
Ca	3	20.6	18.6
	10	25.7	22.9
Zn	1	11.1	12.1
	3	22.4	21.3

Literatura

- 1 V. Kubiček, J. Rudovský, J. Kotek, P. Hermann, L. Vander Elst, R. N. Muller, Z. I. Kolar, H. T. Wolterbeek, J. A. Peters and I. Lukeš, *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, **127**, 16477–16485.
- 2 S. Aime, M. Botta, M. Fasano, M. P. M. Marques, C. F. G. C. Geraldes, D. Pubanz and A. E. Merbach, *Inorg. Chem.*, 1997, **36**, 2059–2068.
- 3 V. Kubiček, J. Kotek, P. Hermann and I. Lukeš, *Eur. J. Inorg. Chem.*, 2007, **2**, 333–344.
- 4 a) U. Rush, M. Borkovec, J. Daicic and W. H. J. van Riemsdijk, *Coll. Interface Sci.* 1997, **191**, 247–255; b) A. Derylo and M. Jaroniec, *Chem. Script.* 1982, **19**, 108–115; c) M. Jaroniec, A. Derylo and A. W. Marczewski, *Chem. Eng. Sci.* 1983, **38**, 307–311.
- 5 E. Mateczak-Jon and V. Videnova-Adrabinska, *Coord. Chem. Rev.*, 2005, **249**, 2458–2488.