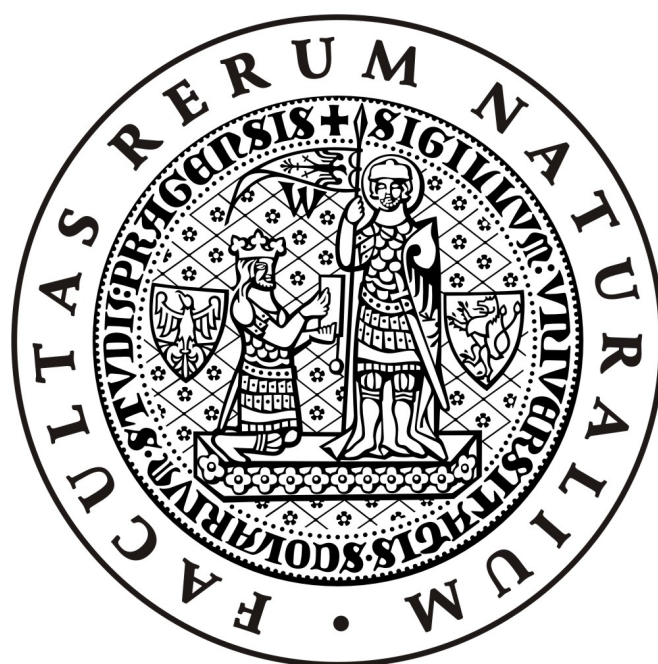


BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Katedra anorganické chemie



Tomáš David

**Deriváty kyseliny difosfonové pro kotvení na
biomolekuly**

Praha 2008

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracoval samostatně pod vedením RNDr. Vojtěcha Kubíčka, PhD. na katedře anorganické chemie a všechny použité prameny jsem řádně citoval.

V Praze dne

.....

Tomáš David

1. Obsah

1. Obsah	3
2. Úvod	4
2.1 Historický úvod	4
2.2 Fosfor a jeho role v organizmu	5
2.3 Geminální bis(fosfonáty)	5
2.3.1 Analoga pyrofosfátu	5
2.3.2 Biologické vlastnosti a medicínské aplikace	7
2.3.3 Obecné metody syntézy	12
2.4 Cíl práce	17
3. Experimentální část	18
3.1 Seznam použitých chemikálií	18
3.2 Metody charakterizace	20
3.3 Syntéza	22
3.3.1 1-(<i>p</i> -nitrobenzyl)methylenbis(fosfonová) kyselina (2)	24
3.3.2 1-(<i>p</i> -aminobenzyl)methylenbis(fosfonová) kyselina (3)	25
3.3.3 1-(<i>p</i> -isothiokyanátobenzyl)methylenbis(fosfonová) kyselina (4)	26
3.3.4 Konjugát 1-(<i>p</i> -isothiokyanátobenzyl)methylenbis(fosfonové) kyseliny s amoniakem (NH₃-BBPH)	26
3.3.5 Konjugát 1-(<i>p</i> -isothiokyanátobenzyl)methylenbis(fosfonové) kyseliny s glycinem (Gly-BBPH)	27
3.3.6 Konjugát 1-(<i>p</i> -isothiokyanátobenzyl)methylenbis(fosfonové) kyseliny s fluoresceinaminem (F-BBPH)	28
3.3.7 Konjugát 1-(<i>p</i> -aminobenzyl)methylenbis(fosfonové) kyseliny s fluoresceinisothiokyanátem (F-BBPH)	29
4. Výsledky a diskuze	30
4.1 Optimalizace syntézy 1-(<i>p</i>-aminobenzyl)methylenbis(fosfonové) kyseliny (3)	30
4.1.1 Tetraethyl 1-(<i>p</i> -nitrobenzyl)methylenbis(fosfonát) (1)	31
4.1.2 1-(<i>p</i> -nitrobenzyl)methylenbis(fosfonová) kyselina (2)	33
4.1.3 1-(<i>p</i> -aminobenzyl)methylenbis(fosfonová) kyselina (3)	35
4.2 Příprava 1-(<i>p</i>-isothiokyanátobenzyl)methylenbis(fosfonové) kyseliny (4)	37
4.3 Modelové konjugační reakce	37
5. Závěr	41
6. Příloha	42
7. Seznam zkratk	43
8. Seznam použité literatury	45

2. Úvod

2.1 Historický úvod

Fosfor je 11. nejrozšířenější prvek v zemské kůře [1]. Jeho chemie je velmi bohatá ať už z hlediska sloučenin anorganických nebo četných sloučenin organických. Počátky chemie fosforu sahají až do 17. století. Fosfor byl poprvé izolován roku 1669 H. Brandtem z lidské moči [1]. Byl to tak jediný prvek, který byl izolován nejprve z látky živočišného původu, poté z rostlin (1688, B. Albino) a teprve o století později byl nalezen v anorganickém minerálu (pyromorfit $Pb_3(PO_4)_2$, 1779, J. G. Gahn) [1,2].

V průběhu tohoto období a krátce poté bylo připraveno několik jednoduchých sloučenin (H_3PO_4 a P_4O_{10} v roce 1694 R. Boylem, PH_3 v roce 1783 P. Gengembrem, PCl_3 a PCl_5 v roce 1808 J. L. Gay-Lussacem a L. J. Thenardem). První organofosforová sloučenina (alkylfosfát) byla připravena v roce 1820 J. L. Lassaignem reakcí kyseliny fosforečné s alkoholem. Byl to ovšem průkopnický výzkum německého chemika K. A. A. Michaelise, který na přelomu dvacátého století objevil a charakterizoval řadu organofosforových sloučenin včetně metod jejich syntézy. Podobný význam mají práce ruského chemika E. Arbusova z téhož období. Oba jsou považováni za legendy organofosforové chemie a některé důležité reakce dnes nesou jejich jména [2,3].

Velký rozvoj organofosforové chemie po druhé světové válce byl spojen s využitím těchto látek jako insekticidů. V roce 1979 byla udělena G. Wittigovy Nobelova cena za výzkum reakcí karbonylových sloučenin s fosforovými ylidy [3,4]. Tento rozvoj však nadále pokračuje a byl navíc urychlen jak novými aplikacemi studovaných látek, tak zejména objevem NMR spektroskopie a využitím izotopu ^{31}P jako NMR aktivního jádra (vysoká citlivost, 100% přirozené zastoupení, jaderný spin $\frac{1}{2}$) [5].

Do roku 1970 bylo připraveno a studováno okolo 100 000 sloučenin obsahujících fosfor a mnoho z nich se dnes denně používá v chemii, medicíně, průmyslu, zemědělství a dalších odvětvích [2,6], např.:

- zemědělství: insekticidy, herbicidy, regulátory růstu rostlin
- medicína: sloučeniny s antibakteriálními, antivirovými a antirakovinovými účinky, sloučeniny pro léčbu kostních onemocnění
- katalýza: hydroformylace, hydrogenace, polymerace atd. pomocí fosfinových komplexů

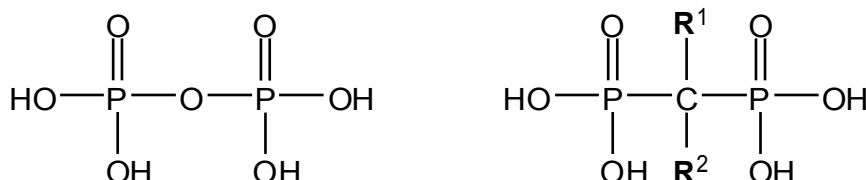
- stabilizační činidla v průmyslu plastů
- selektivní činidla pro extrakci kovů z rud
- zpracování jaderného paliva
- aditiva do produktů petrolejového průmyslu
- sloučeniny inhibující korozi
- zhášedla

2.2 Fosfor a jeho role v organismu

V lidském těle se fosfor vyskytuje jak ve formě anorganické, tak organické. Z anorganických sloučenin je to například hydroxyapatit $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$, který tvoří většinu zubní skloviny. Při náhradě $-\text{OH}$ skupiny fluoridem $-\text{F}$ dochází ke zvýšení odolnosti skloviny díky nižší rozpustnosti. Jiným příkladem je kostní tkáň tvořená především roztokem hydroxyapatitu a karbonáto-apatitového minerálu dahlitu $(\text{Na}, \text{Ca})_5(\text{PO}_4, \text{CO}_3)_3\text{OH}$ [1,7].

V organismech je fosfor také často ve fosfátové formě. Fosfáty jsou složkami ATP, fosfolipidových membrán, DNA, RNA, fosfoenolpyruvátu atd. [1,7].

Významnou roli při regulaci vápenatých iontů v těle hraje pyrofosfát (**Obrázek 1**).



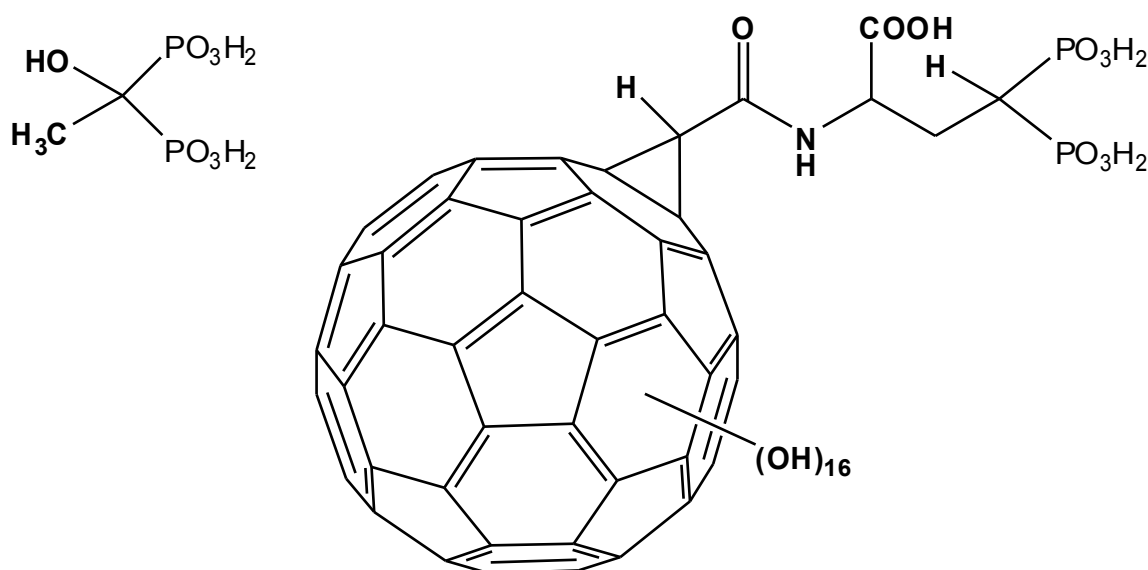
Obrázek 1. Pyrofosfát (*vlevo*) a obecný geminální bis(fosfonát) (*vpravo*).

2.3 Geminální bis(fosfonáty)

2.3.1 Analoga pyrofosfátu

Geminální bis(fosfonáty) (dále jen bis(fosfonáty)) patří mezi nejvíce studované bis(fosfonáty). Jsou to formální analoga pyrofosfátu, ve kterých je atom kyslíku ($\text{P}-\text{O}-\text{P}$) nahrazen atomem uhlíku ($\text{P}-\text{C}-\text{P}$). To vede k obecnému vzorci $\text{R}^1\text{R}^2\text{C}(\text{PO}_3\text{H}_2)_2$ (**Obrázek 1**), kde R reprezentuje obecný substituent (obě pozice na α uhlíku jsou ekvivalentní), přičemž substituent R^1 se může lišit od substituentu R^2 . Záměna atomu kyslíku za atom uhlíku tak umožňuje funkcionalizaci zbylých dvou poloh na α atomu uhlíku, což vede

k obrovské škále látek často velmi odlišných vlastností. Příkladem této rozmanitosti může být jedna z nejvíce prostudovaných sloučenin H_4hedp (1-hydroxy-1-methylmethylenbis(fosfonová) kyselina[†]), syntetizovaná poprvé v roce 1897, která obsahuje dva různé substituenty hydroxyl ($R^1 = OH$) a methyl ($R^2 = CH_3$) v kontrastu s látkou $C_{60}(OH)_{16}AMBP$ obsahující v postranním řetězci derivatizovaný hydrofilní fullerén C_{60} (**Obrázek 2**). První z uvedených látek je klinicky využívána např. jako radiodiagnostikum (^{99m}Tc , SPECT) [8], druhá byla úspěšně testována *in vitro* jako potenciální vektor vhodných radionuklidů ke kostní tkáni [9].



Obrázek 2. H_4hedp (vlevo) a $C_{60}(OH)_{16}AMBP$ (vpravo).

Jednou z výrazných vlastností bis(fosfonátů) oproti pyrofosfátům je jejich metabolická stabilita. V klinické praxi jsou bis(fosfonáty) nejdéle aplikovány jako anti-resorpční látky pro léčbu některých kostních onemocnění. Vhodná volba substituentů na α atomu uhlíku může výrazně ovlivňovat afinitu ke kostní tkáni, anti-resorpční schopnosti a zlepšovat tak požadovaný účinek [10]. O těchto účincích bude pojednáno dále. Molekuly bis(fosfonátů) dále vykazují, díky krátké vzdálenosti obou fosfonových funkcí, unikátní chemické a fyzikální vlastnosti [4,11], jako např. tvorbu termodynamicky stabilních komplexů, velkou afinitu k povrchům různých anorganických materiálů (např. hydroxyapatitu, uhličitanu vápenatého a oxidických materiálů – oxid titaničitý). Díky těmto vlastnostem byly již v minulosti bis(fosfonáty) využívány jako inhibitory koroze, aditiva do prů-

[†] Použité názvosloví neodpovídá pravidlům IUPAC. Pro zjednodušení a větší přehlednost textu bylo na bis(fosfonáty) obecného vzorce $R^1R^2C(PO_3H_2)_2$ nahlíženo jako na deriváty methylenbis(fosfonové) kyseliny.

myslových hnojiv či komplexační činidla v textilním průmyslu [12] a dodnes jsou aplikovány i v dalších odvětvích průmyslu, např. jako inhibitory krystalizace a usazování anorganických solí (uhličitan vápenatý, uhličitan hořečnatý...) v potrubí, kotlích a jiných zařízeních [2].

Důsledkem silné interakce mezi oběma fosfonovými skupinami je zvýšení bazicity celé molekuly. Zatímco fosfonová kyselina je slabá dvojsytná kyselina vykazující dva disociační stupně charakterizované disociačními konstantami $pK_1 \leq 2$ a $pK_2 = 5-6$, bis(fosfonová) kyselina vykazuje dva disociační stupně v kyselém prostředí, jeden disociační stupeň v neutrálním prostředí a jeden disociační stupeň v silně bazickém prostředí [13]. Přítomnost různých substituentů na α atomu uhlíku může výrazně ovlivnit acidobazické chování molekuly např. přítomnost aminoskupiny v postranním řetězci. Ta představuje další silně bazické protonizační místo, které snižuje hodnoty disociačních konstant (a tím zvedá kyselost) vlastní bis(fosfonové) skupiny (**Tabulka 1**).

Tabulka 1. Disociační konstanty vybraných bis(fosfonových) kyselin [13].

sloučenina	H ₄ mdp	H ₄ edp	H ₄ hedp	H ₄ cldp	H ₄ meth	H ₄ pam	H ₄ ale
elektrolytický kation	K ⁺	NR ₄ ⁺	K ⁺	K ⁺	K ⁺	K ⁺	K ⁺
R ¹	-H	-H	-OH	-Cl	-H	-OH	-OH
R ²	-H	-CH ₃	-CH ₃	-Cl	-NH ₂	-(CH ₂) ₂ NH ₂	-(CH ₂) ₃ NH ₂
pK ₁	1,6	1,4	1,7	1,7	neurčeno	neurčeno	neurčeno
pK ₂	2,77	2,88	2,6	2,21	1,4	2,55	2,72
pK ₃	6,83	7,22	6,88	5,82	5,18	5,83	8,73
pK ₄	10,2	11,7	10,90	8,84	8,85	9,9	10,5
pK ₅	---	---	---	---	11,03	10,8	11,6

2.3.2 Biologické vlastnosti a medicínské aplikace

Od doby prvních popsaných biologických účinků bis(fosfonátů) z roku 1968 [14] se začalo zkoumat mnoho dalších sloučenin. Řada z nich, zejména těch obsahujících dusík v postranním řetězci, je nyní denně používána k léčbě osteoporózy, Pagetovy nemoci a poruch metabolismu vápníku [4,11,15]. Pro bis(fosfonáty) platí, že po aplikaci a průchodu krevním řečištěm jsou adsorbovány zejména na hydroxyapatit – hlavní složku kostí. Fleisch *et.al.* [16,17] jako jeden z prvních pozoroval změny při utváření a rozpouštění krystalů fosforečnanu vápenatého *in vitro* působením bis(fosfonátů). Obecně se předpokládá, že velká afinita bis(fosfonátů) ke kostem je způsobena jejich inkorporací do hydroxyapatitu

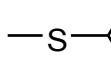

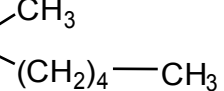

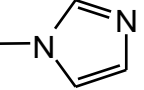
chemisorpcí probíhající na povrchu kostí [18]. Navíc pouze přítomnost P—C—P vazby v bis(fosfonátech) efektivně inhibuje resorpci kostní tkáně *in vivo*, zatímco jednoduché fosfonáty nebo sloučeniny obsahující např. P—C—C—P a P—N—P vazbu a v neposlední řadě estery všech výše popsaných látek (včetně esterů geminálních bis(fosfonátů)) jsou neúčinné, především díky nízké afinitě ke kostní tkáni [19,20].

Převládá názor, že cílem bis(fosfonátového) působení jsou osteoklasty (buňky zodpovědné za resorpci kostní tkáně), a jejich působení je zprostředkováno pomocí buněčných mechanismů na tkáňové, buněčné i molekulární úrovni [11,21]. Mezi obecné působení bis(fosfonátů) na buněčné úrovni patří zejména inhibice tvorby osteoklastů, inhibice soudržnosti osteoklastů s kostní maticí, zkracování doby života osteoklastů a přímá inhibice osteoklastové aktivity [22,23]. Mimoto adsorbované bis(fosfonáty) „chrání“ povrch kostí (brání rozpouštění hydroxyapatitu) a ovlivňují obecně funkci všech kostních buněk (osteocytů), které jsou odpovědné za růst a degradaci kostí. Organické skupiny vázané na α uhlíkový atom mohou specificky interagovat s receptory na povrchu či s enzymy uvnitř buněk, a výrazně tak ovlivnit odehrávající se biologické pochody. Vlastnosti bis(fosfonátů) pak mohou být jemně laděny. Některé komerčně dostupné bis(fosfonáty) používané k terapeutickým účelům jsou zobrazeny v **Tabulce 2** [3].

Podle mechanismu působení na kostní buňky se bis(fosfonáty) dělí do dvou hlavních skupin. Do jedné skupiny patří ty, které obsahují v postranním řetězci dusíkový atom a do druhé ty, které dusíkový atom neobsahují. Pouze bis(fosfonáty) obsahující dusíkový atom inhibují farnesyl-difosfát syntázu v metabolickém cyklu kyseliny mevalonové, což má za následek nejprve poruchy v působení kostních buněk a posléze jejich cílenou smrt (apoptózu), čímž se efektivně zabrání resorpci kostního povrchu. Bis(fosfonáty) neobsahující dusíkový atom jsou obvykle v kostních buňkách metabolizovány na methylenbis(fosfonátová) analoga ATP. Díky nehydrolyzovatelnosti P—C—P vazby se pak ukládají v buňkách a také vykazují známky cytotoxicity (rovněž způsobují apoptózu buněk) [24].

Účinnost bis(fosfonátů) na snížení resorpce kostní hmoty je velmi specifická pro každou sloučeninu. Podání velké dávky málo účinného bis(fosfonátu) sice relativně dobře sníží resorpci kostí, na druhou stranu však může výrazně narušit mineralizaci kostí. Jedním z kritérií výzkumu bis(fosfonátů) je proto snaha o vytvoření sloučeniny s vysokou antiresorpční schopností, ale zároveň bez výrazného vlivu na mineralizaci kostí [4].

Tabulka 2. Některé bis(fosfonáty) $R^1R^2C(PO_3H_2)_2$ používané v medicíně [3].

Komerční název	—R ¹	—R ²	Generace
Medronate (H ₄ mdp)	—H	—H	1
Clodronate (H ₄ cldp)	—Cl	—Cl	
Etidronate (H ₄ hedp)	—OH	—CH ₃	
Tiludronate	—H	—S—  —Cl	
Pamidronate (H ₄ pam)	—OH	—(CH ₂) ₂ —NH ₂	2
Aledronate (H ₄ ale)	—OH	—(CH ₂) ₃ —NH ₂	
Olpadronate	—OH	—(CH ₂) ₂ —N 	3
Ibandronate	—OH	—(CH ₂) ₂ —N 	
Risedronate	—OH	—(CH ₂) ₂ — 	
Zoledronate	—OH	—(CH ₂) ₂ — 	

Podle antiresorpční účinnosti se bis(fosfonáty) dělí na tři generace (**Tabulka 2**). První generace bis(fosfonátů) obsahuje v postranních řetězcích na α uhlíku pouze jednotlivé atomy, hydroxyl nebo jednoduché alkyly a aryly (Medronate, Etidronate, Clodronate, Tiludronate) a obecně vykazuje poměrně nízké antiresorpční schopnosti. Druhá generace bis(fosfonátů) obsahující v postranních alkylových řetězcích primární aminovou skupinu (Pamidronate, Aledronate) a je 10–100krát účinnější než první generace bis(fosfonátů). Dosud nejlepší antiresorpční schopnosti má třetí generace bis(fosfonátů), která obsahuje v postranních řetězcích terciární aminovou skupinu s alkylovými substituenty na dusíkovém atomu

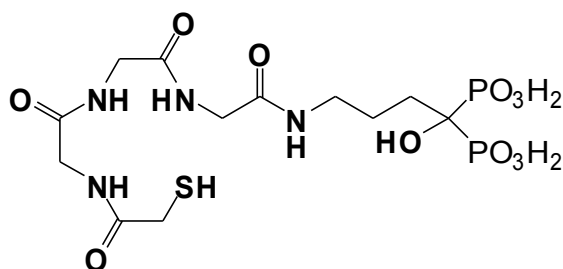
(Olpadronate, Ibandronate) nebo se zabudovaným dusíkovým atomem v heterocyklickém kruhu (Risedronate, Zoledronate). Bylo zjištěno, že jejich účinnost je až 10 000krát vyšší než účinnost první generace bis(fosfonátů) [3,4,18,25,26]. Jednoznačný a úplný vztah mezi strukturou a účinkem však nebyl doposud vyvozen zřejmě díky stále ještě nedostatečnému porozumění mechanismu působení bis(fosfonátů). Stále více se však vlastní efekt přisuzuje buněčnému působení na osteoklastech než čistě chemicko-fyzikálním účinkům při adsorpci na kostní tkáň [11,17].

Klinická farmakologie bis(fosfonátů) je charakterizována sice pomalou intestinální absorpcí, ale vysoce selektivním a dlouhodobým účinkem. I přes poměrně dlouhé setrvávání bis(fosfonátů) v organizmu jsou však jejich vedlejší účinky minimální [26].

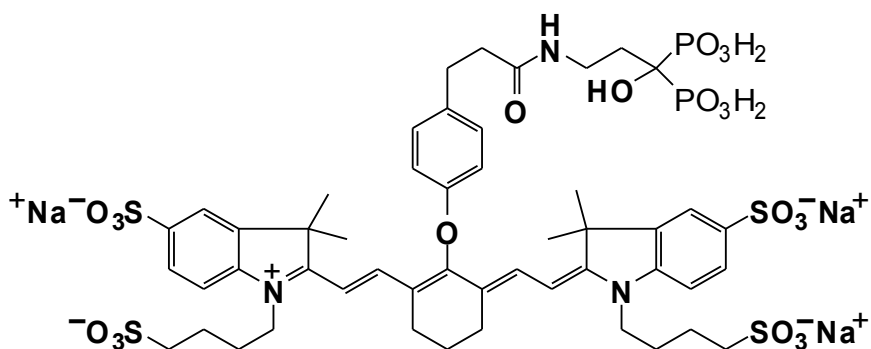
Kromě aplikace bis(fosfonátů) jako antiresorpčních látek mají velký význam jejich komplexy s radionuklidy zejména pro kostní diagnózy (^{99m}Tc , SPECT), terapie nebo paliativní léčbu (^{186}Re) kostních metastáz [27]. Je tomu tak díky specifické vazbě bis(fosfonátů) do míst růstu a patologických změn kostí [4]. Kromě toho řada nemocí (např. infarkt myokardu [28], cirhóza jater [29], rakovina prsu [30], mozková mrtvice [31] atd.) způsobuje abnormální kalcifikace v měkkých tkáních, ty pak mohou být zobrazovány díky specifické adsorpci komplexů bis(fosfonátů) s radionuklidy [32]. Tomografická scintigrafie (SPECT) pomocí ^{99m}Tc -bis(fosfonátových) komplexů* je jedna z nejvíce používaných metod pro zjištění kostních metastáz. Výhodou je možnost použití komplexů s velmi jednoduchými bis(fosfonáty) jako např. methylenbis(fosfonátem) (^{99m}Tc -MDP), který je stejně jako ^{99m}Tc dostupný pro většinu oddělení nukleární medicíny. Příkladem ligandu schopného vázat ^{186}Re je například MAG3-HBP (**Obrázek 3**) [33] obsahující v molekule seskupení merkaptoacetyl-glycylglycylglycinu a bis(fosfonátu) s hydroxylovou skupinou na α atomu uhlíku. Jeho výhodou oproti jednoduchým bis(fosfonátovým) komplexům je výrazně vyšší termodynamická i kinetická stabilita.

Nevýhodou výše zmíněných metod je ovšem práce z radioaktivními izotopy, které mohou způsobit zdravotní problémy všech osob, které s danými izotopy přijdou do styku. Proto jsou snahy o využití alternativních metod. Jednou z možností je metoda využívající schopnosti látek fluoreskovat v blízké infračervené oblasti (NIR). Takto byla např. syntetizována kontrastní látka obsahující bis(fosfonát) (Pamidronate) a fluorescenční barvivo

* Aquaionty těžkých kovů jsou pro organizmus velmi toxické, proto je třeba je aplikovat ve formě kineticky a termodynamicky stálých komplexů. Nižší stabilita některých komplexů je při aplikaci suplována obrovským nadbytkem volného ligandu.



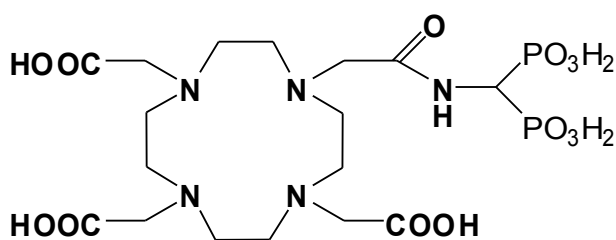
Obrázek 3. MAG3-HBP schopný komplexovat ^{186}Re .



Obrázek 4. Konjugát bis(fosfonátu) s fluorescenčním barvivem IRDye78.

(IRDye78) spojené amidickou vazbou (**Obrázek 4**). *In vivo* modely na bezsrstých myších ukázaly, že je možné pomocí diagnostické metody NIR zobrazit některé kostní tkáně dokonce s větším rozlišením než pomocí komplexu $^{99\text{m}}\text{Tc-MDP}$ [20]. Amidická vazba se ukázala být *in vivo* stálá po dobu přibližně 6 hodin [34].

Další alternativní metodou je tomografie magnetické rezonance (MRI). Z hlediska potenciálního využití pro MRI kostí je zajímavý ligand BPAMD (**Obrázek 5**), který je první molekulou svého druhu, kde je bis(fosfonová) skupina připojena k makrocyklu (taktéž pomocí amidické vazby). Do makrocyklické kavity je možné zakomplexovat Gd^{3+} ion za vzniku termodynamicky i kineticky stálého komplexu. *In vitro* testy komplexu $^{160}\text{Tb-BPAMD}$ na hydroxyapatitu prokázaly velmi vysokou afinitu k tomuto povrchu [35]. Z *in vivo* testů na potkanech s využitím $^{177}\text{Lu-BPAMD}$ se bohužel zdá, že koncentrace adsorbovaného komplexu na kostní tkáni je nízká a současná citlivost MRI není postačující k využití komplexu Gd-BPAMD jako kontrastní látky [36].



Obrázek 5. BPAMD schopný pevně vázat Gd^{3+} ion v makrocyklické kavitě.

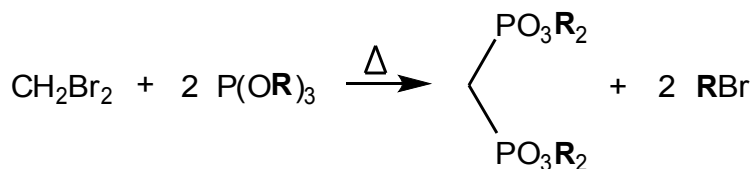
V současné době se bis(fosfonáty) studují především jako vektory léčiv a dalších látek, které mají specificky působit v blízkosti kostní tkáně. Příkladem může být bis(fosfonátový) lipozóm jehož hydrofobní dutina má nést léčivo [37]. Dalším příkladem jsou ve vodě rozpustné lineární polymery – nosiče obsahující bis(fosfonátové) skupiny jako „adresy“ do míst účinku. Léčivo má být pak kovalentně vázáno na polymerní nosič [22]. Dalším kandidátem je již zmiňovaný bis(fosfonát) obsahující v postranním řetězci derivatizovaný hydrofilní fulleren, který má sloužit především jako velice stabilní nosič radionuklidů [9]. S oblibou se využívá tzv. stavebních kamenů (building-blocks), tedy jednoduchých bis(fosfonátů), které lze snadno konjugovat s biomolekulami (např. peptidy), a tak jinak často nespecifické látky selektivně dopravovat a vázat na kostní tkáň.

2.3.3 Obecné metody syntézy

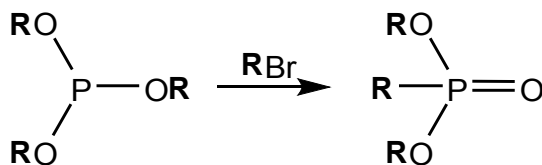
Snaha připravit specifické bis(fosfonáty) byla podnětem pro rozvoj mnoha syntetických strategií [38]. Vzhledem k pestrosti sloučenin a možnostem organické syntézy budou uvedeny pouze základní syntetické postupy modelových bis(fosfonátů) rozdělené do 4 podkapitol podle substituentů R^1 a R^2 na α atomu uhlíku. Zároveň jsou uvedeny reakce, kde vystupují významnější z těchto bis(fosfonátů) jako prekurzory pro další reakce.

Tetraalkyl methylenbis(fosfonát) – významný prekurzor ($R^1 = H, R^2 = H$)

Příkladem syntézy tetraalkyl methylenbis(fosfonátu), nejjednoduššího bis(fosfonátu), je Arbuzova reakce mezi dibrommethanem a trialkylfosfitem (Schema 1) [39,40]. Vznikající alkybromid musí být kontinuálně odstraňován z reakční směsi, neboť katalyzuje přesmyk trialkylfosfítu na bis(alkylester) alkylfosfonové kyseliny (Schema 2).

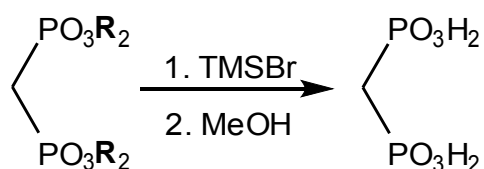


Schema 1. Syntéza tetraalkyl methylenbis(fosfonátu).



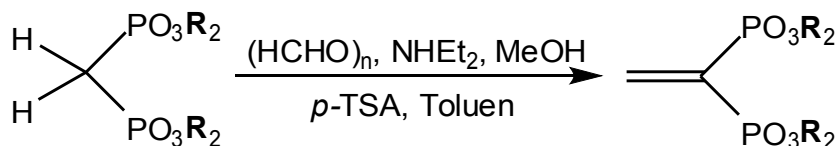
Schema 2. Nežádoucí přesmyk trialkylfosfítu na dialkylester alkylfosfonové kyseliny.

Vzniklý tetraalkyl methylenbis(fosfonát) je možno převést na methylenbis(fosfonovou) kyselinu [41] pomocí kyseliny katalyzované hydrolyzy, pyrolyzy nebo transesterifikací pomocí TMSBr s následnou hydrolyzou získaného trimethylsilylesteru protickým rozpouštědlem (**Schema 3**) [42,43]. Bazická hydrolyza fosfonátů obecně vede pouze k monoesterům [44].



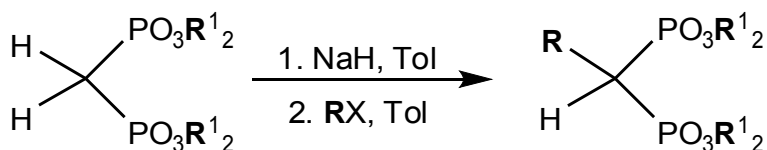
Schema 3. Transesterifikace bis(fosfonátového) tetraalkylesteru trimethylsilylbromidem a následná hydrolyza.

Tetraalkyl methylenbis(fosfonát) je důležitým prekurzorem pro další typy reakcí. Může sloužit např. k přípravě tetraethyl ethylen-1,1-bis(fosfonátu), což je klíčový prekurzor pro adiční reakce. Velkou výhodou je, že dovoluje připojení kýmých funkčních skupin k již připravené bis(fosfonové) skupině. Tetraalkyl ethylen-1,1-bis(fosfonát) lze připravit z tetraalkyl methylenbis(fosfonátu) podle **Schematu 4** [43].



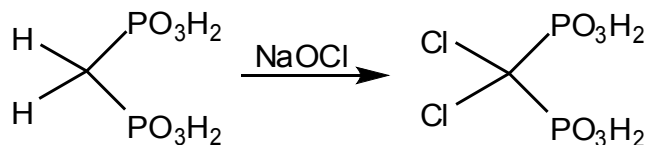
Schema 4. Syntéza tetraalkyl ethylen-1,1-bis(fosfonátu).

Reakcí hydridu sodného s tetraalkyl methylenbis(fosfonátem) připravíme methylen bis(fosfonátový) karbanion, který následně alkyací alkylhalogenidem poskytne tetraalkyl 1-alkylmethylenbis(fosfonát) (**Schema 5**) [25]. I touto reakcí lze cíleně substituovat již vytvořenou bis(fosfonátovou) molekulu, alkylace však často probíhá do druhého stupně za vzniku nežádoucího disubstituovaného bis(fosfonátu).



Schema 5. Alkylace methylenbis(fosfonátu).

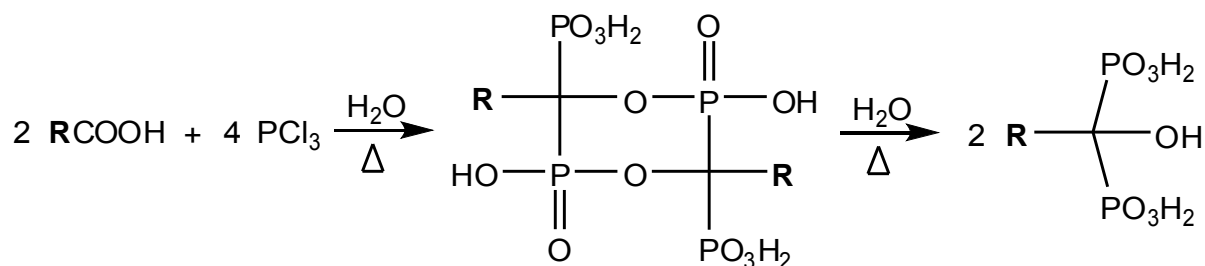
Halogenace methylenbis(fosfonové) kyseliny může být prováděna například reakcí s vodným roztokem chlornanu sodného jako chloračního činidla (**Schema 6**) za vzniku 1,1-dichloromethylenbis(fosfonové) kyseliny (H₄cldp) [45].



Schema 6. Syntéza 1,1-dichloromethylenbis(fosfonové) kyseliny.

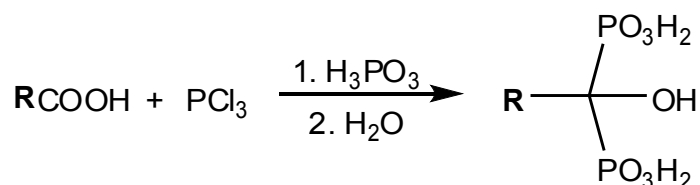
1-hydroxymethylenbis(fosfonáty) (R' = OH)

Bis(fosfonát) obsahující hydroxylovou skupinu navázanou na α atom uhlíku (H₄ale, H₄hedp, H₄pam atd.) vykazuje obecně vyšší afinitu ke kostní tkáni. Může být syntetizován například kondenzační reakcí mezi karboxylovou kyselinou a chloridem fosforitým [46], která vede k cyklickému intermediátu dále hydrolyzovatelnému na 1-hydroxymethylenbis(fosfonovou) kyselinu (**Schema 7**).



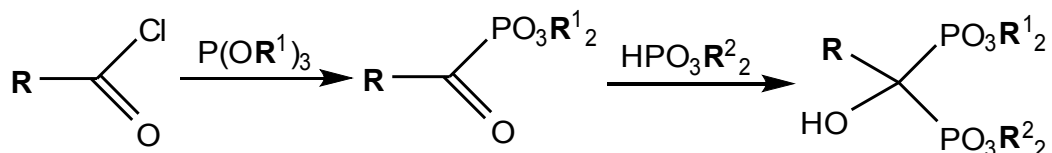
Schema 7. Syntéza 1-hydroxymethylenbis(fosfonové) kyseliny (i).

Obdobnou metodou přípravy 1-hydroxymethylenbis(fosfonové) kyseliny je reakce chloridu fosforitého s karboxylovými kyselinami v přítomnosti kyseliny fosforité (**Schema 8**) [47], chloridu fosforečného nebo chloridu fosforylu [48]



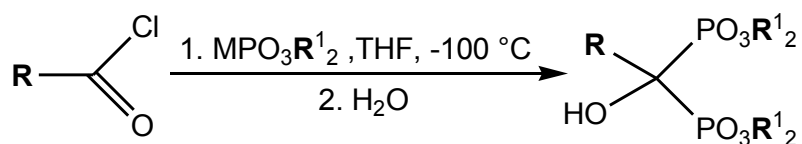
Schema 8. Syntéza 1-hydroxymethylenbis(fosfonové) kyseliny (ii).

Michaelisovou-Arbuzovou reakcí se dá nepřímo připravit tetraalkyl 1-hydroxymethylenbis(fosfonát), reakcí mezi chloridem karboxylové kyseliny a trialkylfosfitem za vzniku α -ketofosfonátu a následnou adicí dialkylfosfitu na C=O vazbu α -ketofosfonátu (**Schema 9**). Tato metoda má význam převážně při syntéze asymetrických esterů [49].

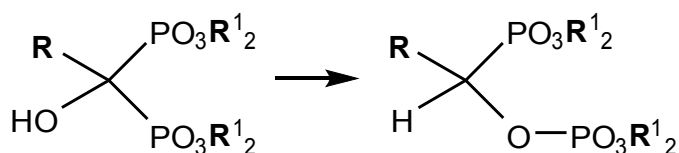


Schema 9. Syntéza tetraalkyl 1-hydroxymethylenbis(fosfonátu) (i).

Alternativním způsobem přípravy tetraalkyl 1-hydroxymethylenbis(fosfonátu) je jednokroková Michaelisova-Beckerova adice alkalické soli dialkylfosfitu na chlorid karboxylové kyseliny (**Schema 10**) [50]. Tato metoda je však limitována přeskupením bis(fosfonátu) na fosfono-fosfát (**Schema 11**) [51].



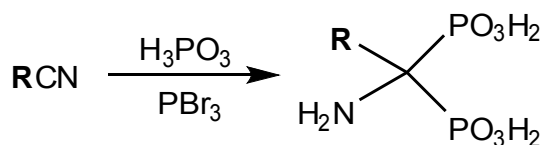
Schema 10. Syntéza tetraalkyl 1-hydroxymethylenbis(fosfonátu) (ii).



Schema 11. Přesmyk bis(fosfonátu) na fosfono-fosfát.

1-aminomethylenbis(fosfonáty) ($\text{R}^1 = \text{NH}_2$)

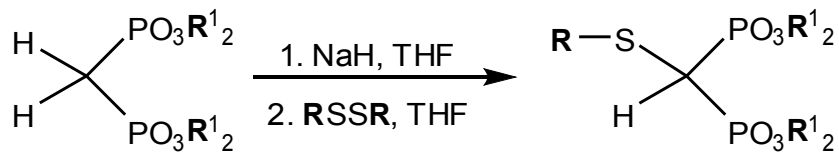
Reakcí nitrilů s kyselinou fosforitou a bromidem fosforitým lze připravit 1-aminomethylenbis(fosfonovou) kyselinu (**Schema 12**) [25].



Schema 12. Syntéza 1-aminomethylenbis(fosfonátu).

1-sulfanylmethylenbis(fosfonáty) ($R^1 = SR$)

Reakcí tetraalkyl methylenbis(fosfonátového) karbaniontu s disulfidy lze získat 1-sulfanylmethylenbis(fosfonáty) (**Schema 13**) [25].



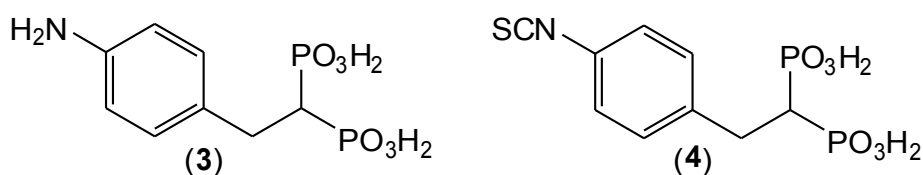
Schema 13. Syntéza tetraalkyl 1-sulfanylmethylenbis(fosfonátu).

V podobném výčtu by se dalo pokračovat, není to však předmětem této práce. Výše uvedený přehled má pouze nastínit některé obecné postupy přípravy geminálních bis(fosfonátů). Na závěr je třeba zmínit, že modelové syntézy vztahující se na přímé zavedení charakteristických skupin na α atom uhlíku nejsou ze syntetického hlediska příliš vhodné pro konjugační reakce, neboť přítomnost bis(fosfonové) skupiny výrazně snižuje reaktivitu blízkých funkčních skupin (např. $-\text{NH}_2$). Pro tento účel je mnohem výhodnější propojení funkční a bis(fosfonové) skupiny např. C_3 alkylovým řetězcem ($\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2)_2-\text{CH}(\text{PO}_3\text{H}_2)_2$), nebo přes disubstituované aromatické jádro ($\text{H}_2\text{N}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{CH}(\text{PO}_3\text{H}_2)_2$) [38].

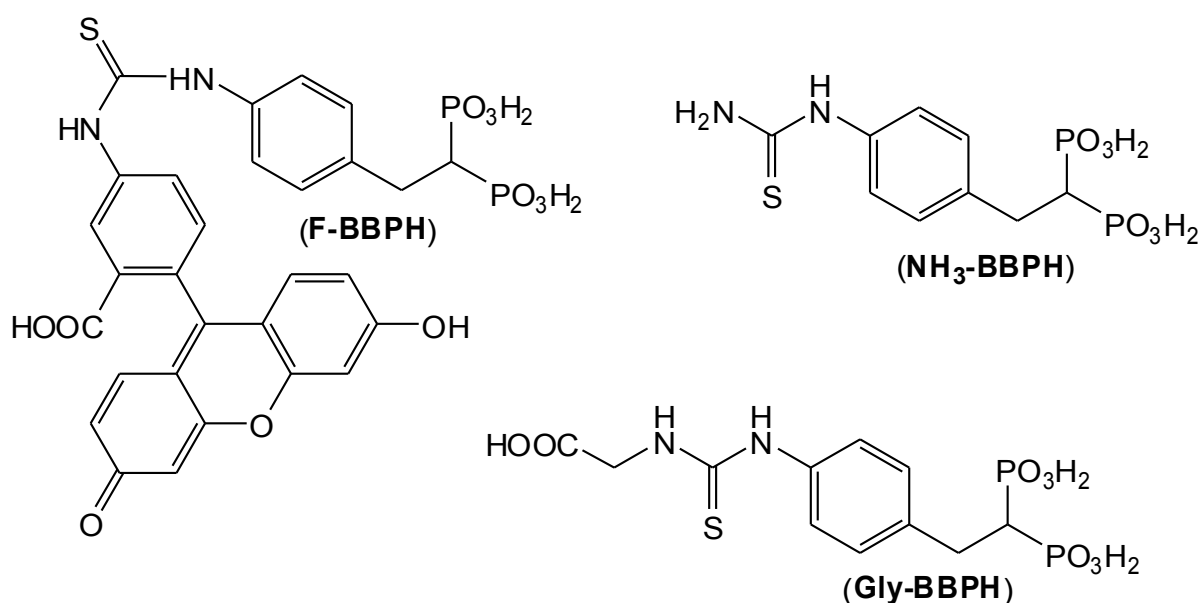
2.4 Cíl práce

Hlavním cílem této práce byla optimalizace syntézy 1-(*p*-aminobenzyl)methylenbis(fosfonové) kyseliny **3** [52] a příprava zcela nové 1-(*p*-isothiokyanátobenzyl)methylenbis(fosfonové) kyseliny **4** (**Obrázek 6**). Dalším cílem bylo studium konjugačních reakcí obou sloučenin **3** a **4** s modelovými látkami za vzniku thiomocovinové vazby (N—C(S)—N). V případě 1-(*p*-isothiokyanátobenzyl)methylenbis(fosfonové) kyseliny **4** byly zkoumány konjugační reakce s amoniakem (konjugát **NH₃-BBPH**), glycinem (konjugát **Gly-BBPH**) a s fluoresceinaminem (konjugát **F-BBPH**) (**Obrázek 7**). Důležitou alternativní cestou k syntéze **F-BBPH** byla reakce 1-(*p*-aminobenzyl)methylenbis(fosfonové) kyseliny **3** s fluoresceinisothiokyanátem.

Tyto modelové reakce mají posloužit jako zdroj informací pro konjugace se složitějšími látkami, např. s léčivy či jinými biomolekulami. Thiomocovinová vazba byla vybrána díky relativně snadné připravitelnosti, a zároveň díky poměrně bohatým zkušenostem s její chemií v naší pracovní skupině.



Obrázek 6. 1-(*p*-aminobenzyl)methylenbis(fosfonová) kyselina **3**
a 1-(*p*-isothiokyanátobenzyl)methylenbis(fosfonová) kyselina **4**.



Obrázek 7. Konjugáty **F-BBPH**, **NH₃-BBPH** a **Gly-BBPH**.

3. Experimentální část

3.1 Seznam použitých chemikálií[§]

Chemikálie

aktivní uhlí	Fluka
argon 5.6	Linde
amoniak (25% vodný roztok)	
benzofenon	Fluka
bromovodík (33% roztok v bezvodé AcOH)	Merck
chlorid sodný	
dibrommethan	Fluka
draslík	Ferak
fluoresceinamin (izomer 1)	Sigma-Aldrich
fluoresceinisothiokyanát (izomer 1)	M. Kačenka [53]
glycin	Reanal
hydrid sodný (60% suspenze v minerálním oleji)	Fluka
hydroxid sodný	Lach-Ner
kyselina chlorovodíková (36% vodný roztok)	
ninhydrin	
<i>p</i> -nitrobenzylbromid	Fluka
palladium (10% disperze v aktivním uhlí)	Sigma-Aldrich
sodík	Fluka
tetraethyl methylenbis(fosfonát)	V. Kubíček [39]
thiofosgen	Fluka
triethylamin	Lach-Ner
triethylfosfit	Fluka
trimethylsilylbromid	Across Organics
vodík 3.0	Linde

[§] Není-li uvedeno jinak, chemikálie jsou produkty firmy Penta (Lachema).

Rozpouštědla[&]

acetonitril
aceton
chloroform
diethylether
dichlormethan
ethanol - denaturovaný hexanem
methanol
tetrachlormethan
tetrahydrofuran (Na, K/benzofenon)
toluen (Na, K/benzofenon)
voda destilovaná

Deuterovaná rozpouštědla

D₂O (99,8% D) Chemotrade
CDCl₃ (99,8% D) Sigma-Aldrich

Iontoměniče a sorbenty

silikagel (Silicagel 60) Merck
XAD (Amberlite XAD-1180, 20–50 mesh) Fluka
slabý katex (Amberlite CG 50, 160–200 mesh) Fluka
silný katex (Dowex 50WX4-100, 50–100 mesh) Sigma-Aldrich
silný anex (Dowex 1, 100–200 mesh) Fluka

Mobilní fáze

MF₁: izokratická eluce THF:CH₂Cl₂ (1:2)

MF₂: gradientová eluce (H₂O → 25% vodný EtOH → 50% vodný EtOH → Me₂CO)

[&] Deoxygenace rozpouštědel byla provedena destilací pod argonem, již předcházela případná čisticí procedura uvedená v závorce [54].

3.2 Metody charakterizace

Spektroskopie NMR

^1H , ^{13}C , a ^{31}P NMR spektra byla měřena na spektrometrech Varian VNMRS 300 a Varian $^{\text{UNITY}}\text{INOVA}$ 400 na PřF UK. Pro měření byly použity 5 mm NMR kyvety. Teplota při měření byla 25°C . Rezonanční frekvence a standardy pro referenci uvádí **Tabulka 3**. Hodnoty chemických posunů jsou uváděny v ppm u ^1H s přesností na dvě desetinná místa, u ^{13}C a ^{31}P s přesností na jedno desetinné místo.

Tabulka 3. Měřená jádra, jejich rezonanční frekvence a standardy v NMR spektroskopii.

Měřené jádro	Rezonanční frekvence (MHz)		Standardy
	Varian VNMRS 300	Varian $^{\text{UNITY}}\text{INOVA}$ 400	
^1H	299,94	399,94	$t\text{-BuOH}$ $\delta_{\text{H}} = 1,25$ ppm;
^{13}C	75,4	100,6	$t\text{-BuOH}$ $\delta_{\text{C}} = 32,0$ ppm a 72,2 ppm
^{31}P	121,4	161,9	H_3PO_4 (e) $\delta_{\text{P}} = 0,00$ ppm

Při měření většiny ^{31}P a ^{13}C NMR spekter byl použit decoupling jader ^1H . Spektra byla měřena v čistých deuterovaných rozpouštědlech (CDCl_3 , D_2O), v nedeuterovaných rozpouštědlech nebo v jejich směsi, údaje pro konkrétní měření jsou uvedeny v návodech u příslušných látek v syntetické části.

Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektra byla měřena na spektrometru Bruker ESQUIRE 3000 s ESI („Electrospray Ionization“) jako zdrojem iontů a IT („Ion Trap“) detektorem. Získána byla spektra kladných (+) i záporných (–) iontů. Uvedeny jsou intenzivní signály, jež se podařilo interpretovat.

Rentgenová strukturní analýza

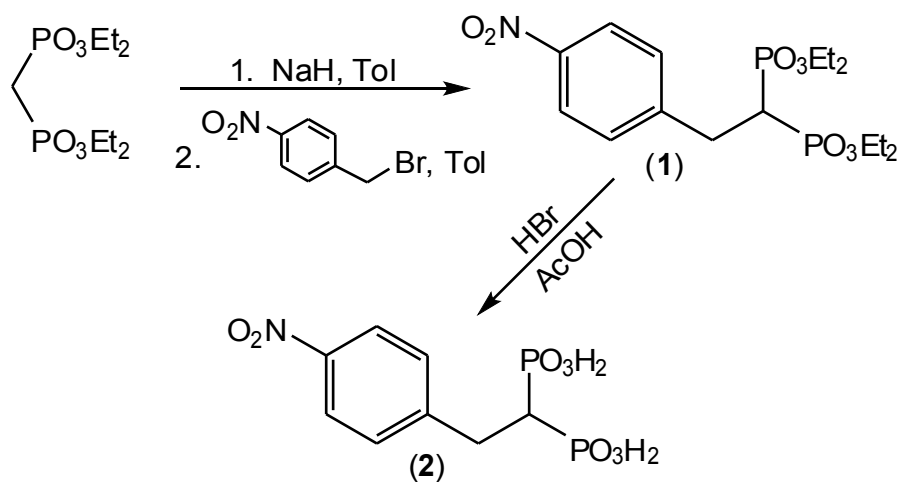
Difrakční data byla změřena při 150 K (Cryostream Cooler, Oxford Cryosystem) na přístroji NONIUS KAPPA CCD s Mo-K_α zářením ($\lambda = 0,71073$ Å) a analyzována v programu HKL DENZO [55]. Fázový problém byl řešen pomocí programu SIR92 [56]. Upřesnění parametrů bylo provedeno programem SHELXL97 [57].

Tenkovrstvá chromatografie (TLC)

Chromatografie na tenké vrstvě byly prováděny na hliníkových destičkách s vrstvou silikagelu a aluminy impregnované fluorescenčním barvivem (Merck 1,0554 F₂₅₄) a destičkách s celulózou (Silufol, sklárny Kavalier). Soustavy: **S**₁: EtOH – konc. NH₃–H₂O (5:2:5 – ETAV); **S**₂: THF – CH₂Cl₂ (1:2). Detekční metody: **D**₁: Rozprášení 0,5% roztoku ninhydrinu v EtOH na chromatogram dokonale zbavený rozpouštědel a následné vyvolání proudem vzduchu (50–70 °C) z horkovzdušné pistole; **D**₂: UV Lampa ($\lambda_1 = 254$ nm, $\lambda_2 = 366$ nm).

3.3 Syntéza

3.3.1 1-(*p*-nitrobenzyl)methylenbis(fosfonová) kyselina (**2**)



Schema 14. Syntéza 1-(*p*-nitrobenzyl)methylenbis(fosfonové) kyseliny (**2**).

K roztoku 2,00 g (50 mmol) 60% hydridu sodného v 50 ml toluenu byl v protiproudu argonu a za chlazení (0 °C) pomalu přikapán roztok 12,96 g (45,0 mmol) tetraethylmethylenbis(fosfonátu) v 35 ml toluenu. Po uvolnění vodíku a ohřátí směsi na RT (cca 2 h) byl jednorázově přidán roztok 6,48 g (30,0 mmol) *p*-nitrobenzylbromidu v 60 ml toluenu. Vzniklá hnědá olejová suspenze byla míchána 2 h při RT (monitorováno ^{31}P NMR spektroskopií). Reakce byla zastavena přidávkem EtOH. Reakční směs byla odpařena do sucha na RVO. K odparku bylo přidáno 50 ml H_2O a vzniklá směs byla extrahována 3 x 50 ml CHCl_3 . Spojené organické fáze byly odpařeny do sucha na RVO. Takto vzniklý odparek obsahující nitroderivát **1** (čistota 60 % podle ^{31}P NMR spektra) byl přímo hydrolyzován v 50 ml 33% roztoku HBr v bezvodé AcOH (4 d, monitorováno ^{31}P NMR spektroskopií). Reakční směs byla odpařena do sucha na RVO. Nadbytek HBr/AcOH byl odstraněn několikerým odpařením směsi s H_2O . Dále byla směs po přidávku H_2O zfiltrována za horka a čištěna chromatograficky na slabém katexu (v H^+ cyklu), kde byly její složky děleny izokraticky vodou na základě hydrofobní interakce. Nejprve byla eluována methylenbis(fosfonová) kyselina, poté výsledný produkt **2**. Odpařením na RVO bylo získáno 7,40 g volné kyseliny nitroderivátu **2** ve formě žlutého oleje (79 % výtěžek, počítáno na *p*-nitrobenzylbromid). Volnou krystalizací z vody byly připraveny nažloutlé destičkovité monokrystaly vhodné pro stanovení RTG analýzy.

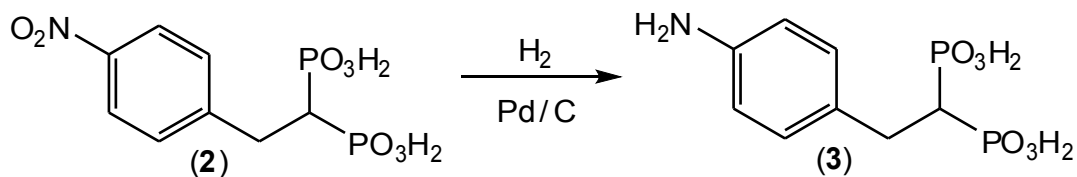
Charakterizace:

NMR (D₂O): ¹H δ 2,74 (CH-P, 1H, tt, ³J_{HH} = 6,40 Hz, ²J_{PH} = 23,2 Hz); 3,27 (CH₂, 2H, dt, ³J_{HH} = 6,40 Hz, ³J_{PH} = 16,4 Hz); 7,45 (CH-C-CH₂, 2H, d, ³J_{HH} = 8,80 Hz); 8,02 (CH-C-N, 2H, d, ³J_{HH} = 8,80 Hz); ¹³C {¹H} δ 33,2 (CH₂, 1C, s); 41,7 (CH-P, 1C, t, ¹J_{PC} = 127 Hz); 125,8 (CH-C-N, 2C, s); 132,1 (CH-C-CH₂, 2C, s); 148,4 (C-N, 1C, s); 150,4 (C-CH₂, 1C, t, ³J_{PC} = 7,54 Hz) ³¹P {¹H} δ 23,7 (P, 2P, s)

MS: (-) 291,9 (M-H₃O⁺); 309,9 (M-H⁺)

(+) 334,1 (M+Na⁺); 356,1 (M+2Na⁺-H⁺); 377,1 (M+3Na⁺-2H⁺)

3.3.2 1-(*p*-aminobenzyl)methylenbis(fosfonová) kyselina (**3**)



Schema 15. Syntéza 1-(*p*-aminobenzyl)methylenbis(fosfonové) kyseliny (**3**).

Do 100 ml baňky bylo naváženo 40 mg 10% Pd/C. Po vyfoukání argonem byl přidán roztok 400 mg (1,29 mmol) nitroderivátu **2** v 5 ml H₂O. Směs byla hydrogenována H₂ po dobu 24 h (pod balónkem) při RT. Produkt **3** se v reakční směsi vyloučil v podobě bílého prášku.

Filtrací byly odstraněny zbytky nedoreagovaného nitroderivátu **2**. K pevnému podílu obsahujícímu produkt **3** a Pd/C bylo na fritě přidáno 5 ml H₂O a vodný roztok Et₃N do rozpuštění produktu (pH ~ 6). Opětovnou filtrací se produkt (filtrát) oddělil od Pd/C. Produkt byl po přečištění na slabém katexu (H⁺ cyklus, eluce vodou) získán ve formě volné kyseliny. Odpařením na RVO bylo získáno 293 mg aminoderivátu **3** ve formě bílého prášku (81 % výtěžek, počítáno na nitroderivát **2**). Výsledný produkt byl volnou krystalizací z vody získán ve formě bezbarvých jehlicovitých krystalů vhodných pro stanovení RTG analýzy.

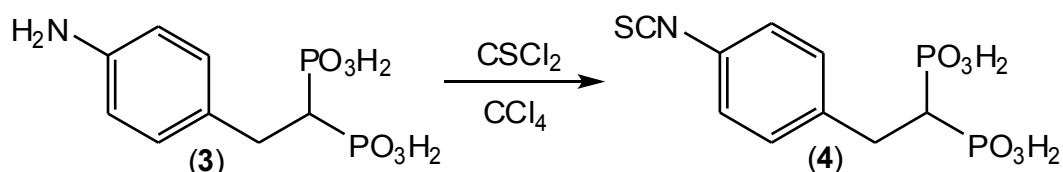
Charakterizace:

NMR (D₂O): ¹H δ 2,21 (CH–P, 1H, tt, ³J_{HH} = 6,40 Hz, ²J_{PH} = 21,6 Hz); 3,05 (CH₂, 2H, dt, ³J_{HH} = 6,40 Hz, ³J_{PH} = 15,6 Hz); 6,81 (CH–C–CH₂, 2H, d, ³J_{HH} = 8,40 Hz); 7,23 (CH–C–N, 2H, d, ³J_{HH} = 8,40 Hz); ¹³C {¹H} δ 17,0 (CH₂, 1C, s); 43,0 (CH–P, 1C, t, ¹J_{PC} = 114 Hz); 118,1 (CH–C–N, 2C, s); 131,3 (CH–C–CH₂, 2C, s); 135,0 (C–CH₂, 1C, t, ³J_{PC} = 7,64 Hz); 144,6 (C–N, 1C, s); ³¹P {¹H} δ 22,9 (P, 2P, s)

MS: (–) 261,9 (M–H₃O⁺); 279,9 (M–H⁺)

(+) 304,1 (M+Na⁺); 226,1 (M+2Na⁺–H⁺); 348,1 (M+3Na⁺–2H⁺)

3.3.3 1-(*p*-isothiokyanátobenzyl)methylenbis(fosfonová) kyselina (4)



Schema 16. Syntéza 1-(*p*-isothiokyanátobenzyl)methylenbis(fosfonové) kyseliny (4).

K 200 mg aminoderivátu **3** (0,62 mmol) bylo přidáno 10 ml H₂O a vodný roztok Et₃N do rozpuštění reaktantu (pH ~ 6). Hamiltonovou injekční stříkačkou bylo 140 μl (1,86 mmol) CSCl₂ přidáno do 10 ml CCl₄ a vzniklý roztok byl jednorázově přidán k vodné fázi. Reakční směs byla intenzivně míchána po dobu 16 h při RT.

Konec reakce byl detekován na *TLC* (**D**₁) (vymizení fialového zabarvení po reakci s ninhydrinem). Organická fáze byla oddělena a vodná fáze byla extrahována 2 x 10 ml CCl₄, a poté 2 x 10 ml Et₂O, a přečištěna na slabém katexu (odstraněn Et₃N). Odpařením do sucha na RVO bylo získáno 204 mg isothiokyanátu **4** v podobě bílého prášku (konverze > 99 % podle ³¹P a ¹H NMR spekter).

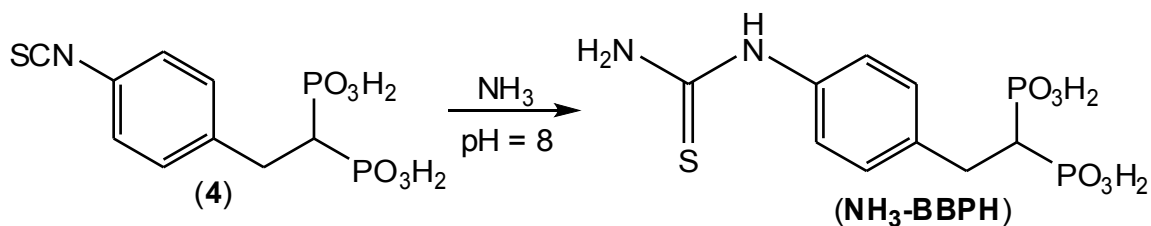
Charakterizace:

NMR (D₂O): ¹H δ 2,27 (CH–P, 1H, tt, ³J_{HH} = 6,90 Hz, ²J_{PH} = 21,6 Hz); 3,13 (CH₂, 2H, dt, ³J_{HH} = 6,90 Hz, ³J_{PH} = 15,6 Hz); 7,26 (CH–C–CH₂, 2H, d, ³J_{HH} = 6,30 Hz); 7,40 (CH–C–N, 2H, d, ³J_{HH} = 6,30 Hz); ¹³C {¹H} δ 33,5 (CH₂, 1C, s); 43,6 (CH–P, 1C, t, ¹J_{PC} = 114 Hz); 127,8 (CH–C–N, 2C, s); 130,5 (C–N, 1C, s); 132,4 (CH–C–CH₂, 2C, s); 135,2 (C=S, 1C, s); 144,0 (C–CH₂, 1C, t, ³J_{PC} = 7,85 Hz) ³¹P {¹H} δ 22,3 (P, 2P, s)

MS: (–) 303,8 (M–H₃O⁺); 321,8 (M–H⁺)

(+) 324,0 (M+H⁺); 346,0 (M+Na⁺); 367,9 (M+2Na⁺–H⁺); 389,9 (M+3Na⁺–2H⁺)

3.3.4 Konjugát 1-(*p*-isothiokyanátobenzyl)methylenbis(fosfonové) kyseliny s amoniakem (**NH₃-BBPH**)



Schema 17. Syntéza konjugátu 1-(*p*-isothiokyanátobenzyl)methylenbis(fosfonové) kyseliny s amoniakem (**NH₃-BBPH**).

Do 10 ml baňky bylo naváženo 10 mg isothiokyanátu **4** (31 μmol) a bylo přidáno 0,5 ml H_2O . Poté bylo upraveno pH na hodnotu 8 přidavkem NH_3 . Reakční směs byla 1 h míchána při RT. Odpařením na RVO byl získán konjugát **NH₃-BBPH** ve formě bílého prášku (konverze > 95 % podle ^{31}P a ^1H NMR spekter). Konjugát nebyl dále dočištěván.

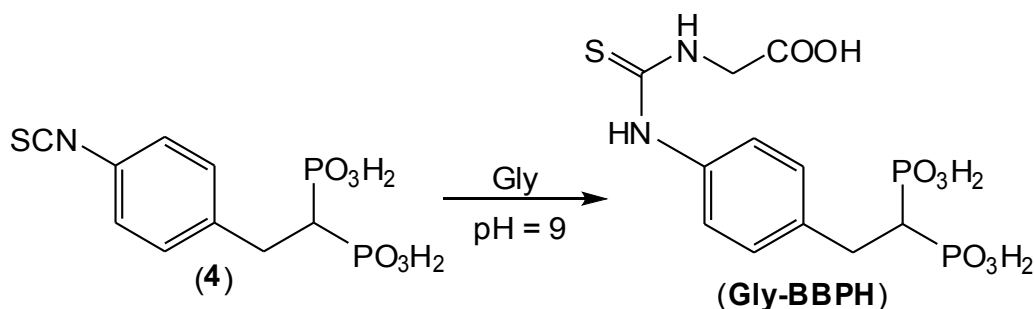
Charakterizace:

NMR (D_2O): ^1H δ 2,18 ($\text{CH}-\text{P}$, 1H, m); 3,12 (CH_2 , 2H, m); 7,21 ($\text{CH}-\text{C}-\text{CH}_2$, 2H, d, $^3J_{\text{HH}} = 8,09$ Hz); 7,46 ($\text{CH}-\text{C}-\text{N}$, 2H, d, $^3J_{\text{HH}} = 8,09$ Hz); ^{31}P $\{^1\text{H}\}$ δ 20,3 (*P*, 2P, s)

MS: (–) 320,9 ($\text{M}-\text{H}_3\text{O}^+$); 338,9 ($\text{M}-\text{H}^+$)

(+) 341,0 ($\text{M}+\text{H}^+$); 363,0 ($\text{M}+\text{Na}^+$); 384,9 ($\text{M}+2\text{Na}^+-\text{H}^+$)

3.3.5 Konjugát 1-(*p*-isothiokyanátobenzyl)methylenbis(fosfonové) kyseliny s glycinem (**Gly-BBPH**)



Schema 18. Syntéza konjugátu 1-(*p*-isothiokyanátobenzyl)methylenbis(fosfonové) kyseliny s glycinem (**Gly-BBPH**).

Do 10 ml baňky bylo naváženo 21 mg isothiokyanátu **4** (65 μ mol) a 5 mg (67 μ mol) glycinu. Poté bylo upraveno pH na hodnotu 9 přidavkem NaOH. Reakční směs byla 24 h míchána při RT. Odpařením na RVO byl získán konjugát **Gly-BBPH** ve formě světle červeného sklovitého materiálu (konverze > 95 % podle ³¹P a ¹H NMR spekter). Konjugát nebyl dále dočišťován.

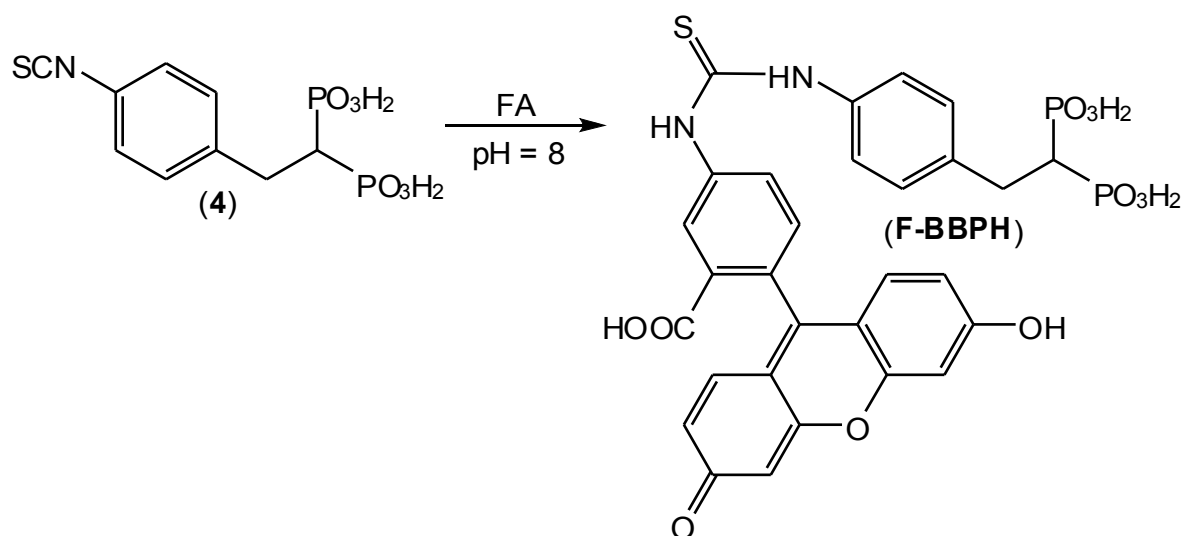
Charakterizace:

NMR (D₂O): ¹H δ 2,23 (CH-P, 1H, tt, ³J_{HH} = 6,90 Hz, ²J_{PH} = 21,3 Hz); 3,14 (CH₂-CH-P, 2H, dt, ³J_{HH} = 6,90 Hz, ³J_{PH} = 15,6 Hz); 4,05 (CH₂-N, 2H, s); 7,24 (CH-C-CH₂, 2H, d, ³J_{HH} = 8,40 Hz); 7,46 (CH-C-N, 2H, d, ³J_{HH} = 8,40 Hz); ¹³C {¹H} δ 33,6 (CH₂-CH-P, 1C, s); 43,8 (CH-P, 1C, t, ¹J_{PC} = 120 Hz); 50,7 (CH₂-N, 1C, s); 128,3 (CH-C-N, 2C, s); 132,5 (CH-C-CH₂, 2C, s); 136,4 (C-N, 1C, s); 144,0 (C-CH₂-CH, 1C, t, ³J_{PC} = 8,3 Hz); 174,9 (C=O, 1C, s); 182,0 (C=S, 1C, s); ³¹P {¹H} δ 19,1 (P, 2P, s)

MS: (-) 378,9 (M-H₃O⁺); 396,8 (M-H⁺)

(+) 399,1 (M+H⁺)

3.3.6 Konjugát 1-(*p*-isothiokyanátobenzyl)methylenbis(fosfonové) kyseliny s fluoresceinaminem (**F-BBPH**)



Schema 19. Syntéza konjugátu 1-(*p*-isothiokyanátobenzyl)methylenbis(fosfonové) kyseliny s fluoresceinaminem (**F-BBPH**).

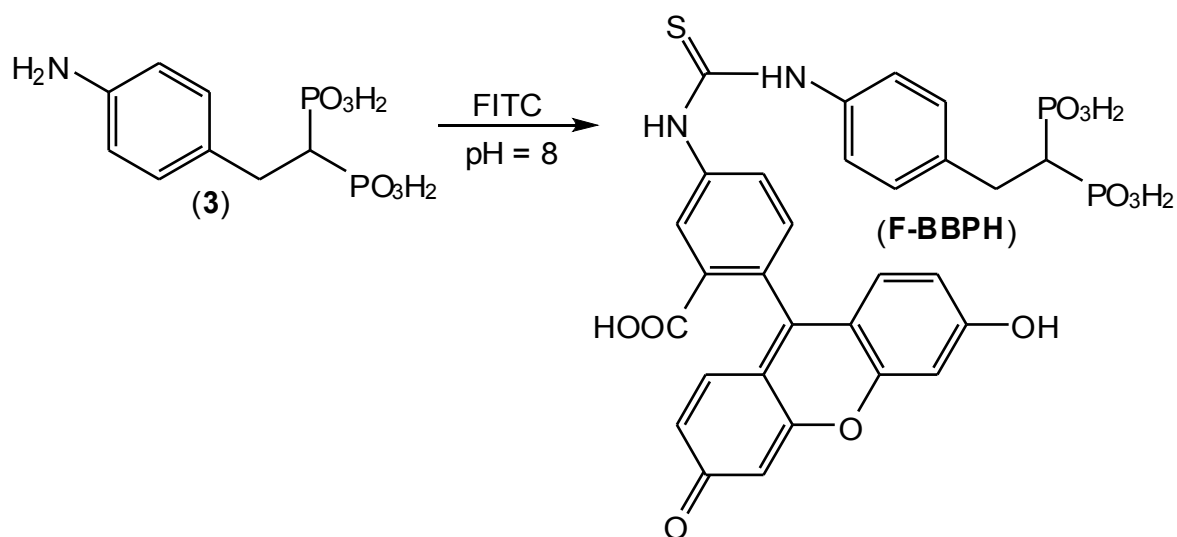
K odváženému množství 20 mg (62 μ mol) isothiokyanátu **4** a 22 mg (63 μ mol) FA byly přidány 2 ml H₂O. K vzniklé suspenzi byl za intenzivního míchání pomalu přidáván roztok NaOH do vzniku červeného roztoku (pH \sim 8). Reakční směs byla 5 h míchána při RT. Odpařením na RVO byl získán konjugát **F-BBPH** ve formě sytě červeného sklovitého materiálu (konverze > 80 % podle ³¹P NMR spektra). Konjugát nebyl dále dočištěván.

Charakterizace:

NMR (D₂O): ³¹P {¹H} δ 21,7 (P, 2P, s)

MS: (–) 668,9 (M–H⁺)

3.3.7 Konjugát 1-(*p*-aminobenzyl)methylenbis(fosfonové) kyseliny s fluoresceinisothiokyanátem (**F-BBPH**)



Schema 20. Syntéza konjugátu 1-(*p*-aminobenzyl)methylenbis(fosfonové) kyseliny s fluoresceinisothiokyanátem (**F-BBPH**)

K odváženému množství 20 mg (71 μmol) aminoderivátu **3** a 28 mg (72 μmol) FITC byly přidány 2 ml H_2O . K vzniklé suspenzi byl za intenzivního míchání pomalu přidáván roztok NaOH do vzniku červeného roztoku (pH \sim 8). Reakční směs byla 5 h míchána při RT. Odpařením do sucha na RVO byl získán konjugát **F-BBPH** ve formě sytě červeného sklovitého materiálu (konverze $>$ 99 % podle ^{31}P a ^1H NMR spekter). Konjugát nebyl dále dočištěván.

Charakterizace:

NMR (D_2O): ^1H δ 2,25 ($\text{CH}-\text{P}$, 1H, tt, $^3J_{\text{HH}} = 6,40$ Hz, $^2J_{\text{PH}} = 20,8$ Hz); 3,18 (CH_2 , 2H, dt, $^3J_{\text{HH}} = 6,40$ Hz, $^3J_{\text{PH}} = 15,6$ Hz); 6,64–6,66 (4H, m) 7,29 ($\text{CH}-\text{C}-\text{CH}_2$, 2H, d, $^3J_{\text{HH}} = 9,60$ Hz); 7,35 (3H, d, $^3J_{\text{HH}} = 8,40$ Hz); 7,52 ($\text{CH}-\text{CH}-\text{C}-\text{CH}_2$, 1H, d, $^3J_{\text{HH}} = 8,00$ Hz); 7,63 (1H, m); 7,77 (1H, m); ^{13}C $\{^1\text{H}\}^\ddagger$ δ 33,7 (CH_2 , 1C, s) 44,0 ($\text{CH}-\text{P}$, 1C, t, $^1J_{\text{PC}} = 112$ Hz); 176,5 ($\text{C}=\text{O}$, 1C, s) 182,7 ($\text{C}=\text{S}$, 1C, s); ^{31}P $\{^1\text{H}\}$ δ 21,7 (P, 2P, s)

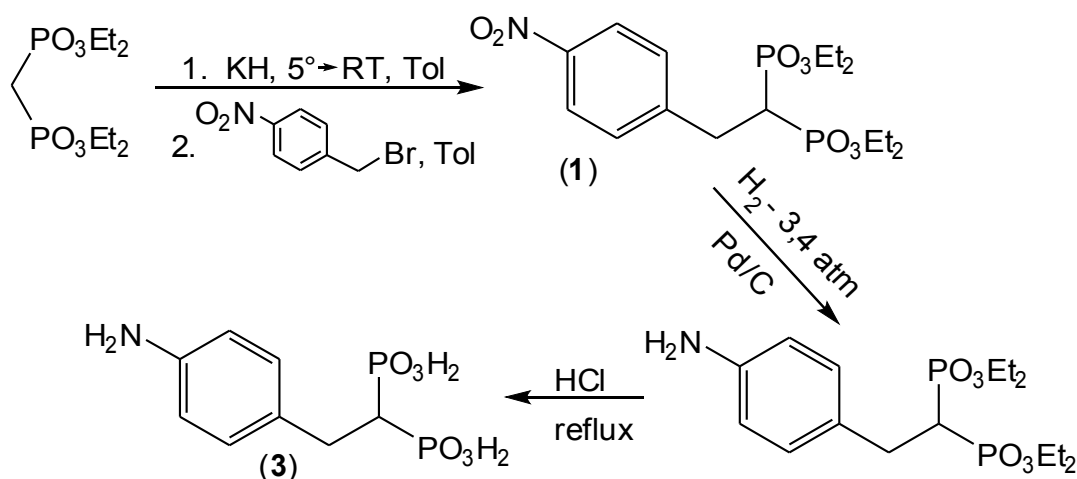
MS: (–) 651,0 ($\text{M}-\text{H}_3\text{O}^+$); 669,0 ($\text{M}-\text{H}^+$)

‡ Uvedeny jsou pouze signály, které byly plně přiřazeny.

4. Výsledky a diskuze

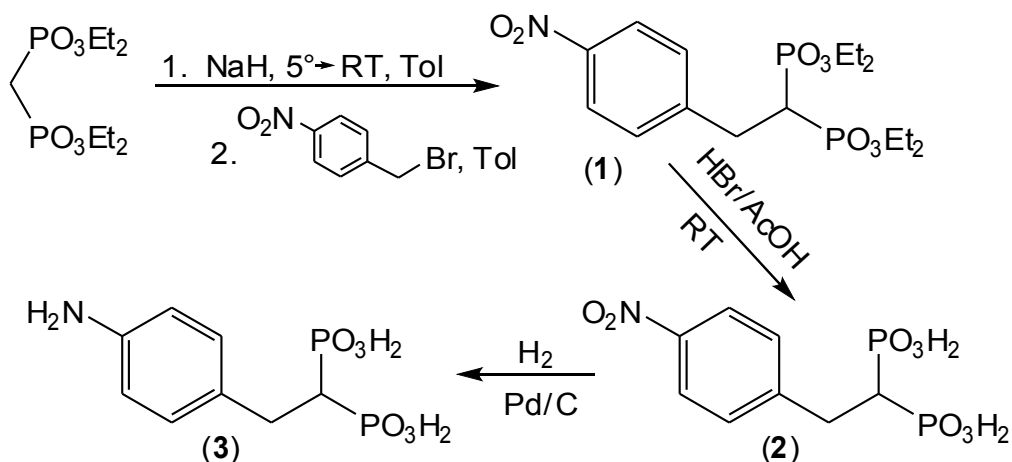
4.1 Optimalizace syntézy 1-(*p*-aminobenzyl)methylenbis(fosfonové) kyseliny (3)

Hlavním cílem této práce bylo optimalizovat syntézu 1-(*p*-aminobenzyl)methylenbis(fosfonové) kyseliny **3**, kterou v minulosti připravil a patentoval Benedict *et.al.* [52]. Jeho postup je znázorněn ve **Schematu 21**. Nejedná se sice o novou látku, nicméně výtěžek publikované syntézy je poměrně nízký (26 %).



Schema 21. Syntéza 1-(*p*-aminobenzyl)methylenbis(fosfonové) kyseliny (**3**) dle literatury [52].

Proto byl k přípravě 1-(*p*-aminobenzyl)methylenbis(fosfonové) kyseliny zvolen alternativní tříkrokový postup, který byl do jisté míry modifikací publikované syntézy (**Schema 22**).



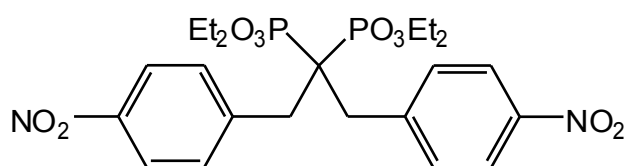
Schema 22. Syntéza 1-(*p*-aminobenzyl)methylenbis(fosfonové) kyseliny (**3**).

V prvním kroku byl připraven tetraethyl 1-(*p*-nitrobenzyl)methylenbis(fosfonát) **1** reakcí *p*-nitrobenzylbromidu s nadbytkem tetraethyl methylenbis(fosfonátu). V druhém kroku byly nejprve hydrolyzovány ethylesterové funkce pomocí roztoku bromovodíku v bezvodé kyselině octové, a poté byla vzniklá 1-(*p*-nitrobenzyl)methylenbis(fosfonová) kyselina **2** hydrogenována na 1-(*p*-aminobenzyl)methylenbis(fosfonovou) kyselinu **3**. Tím je zvolený postup výrazně odlišný od publikované syntézy, kde byl nejprve hydrogenován nitroderivát **2** na tetraethyl 1-(*p*-aminobenzyl)methylenbis(fosfonát), jenž byl dále hydrolyzován kyselinou chlorovodíkovou na aminoderivát **3**.

Alternativní metodou bylo dosaženo 64% výtěžku (přibližně 2,5 krát víc než v případě publikované syntézy).

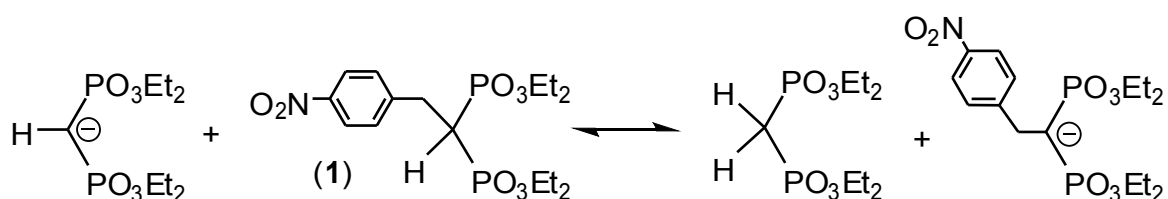
4.1.1 Tetraethyl 1-(*p*-nitrobenzyl)methylenbis(fosfonát) (**1**)

Syntéza nitroderivátu **1** (**Schema 14**) byla klíčovou a zřejmě nejobtížnější reakcí, neboť byla komplikována vznikem nežádoucího vedlejšího produktu tetraethyl 1,1-bis(*p*-nitrobenzyl)methylenbis(fosfonátu) (**Obrázek 8**).

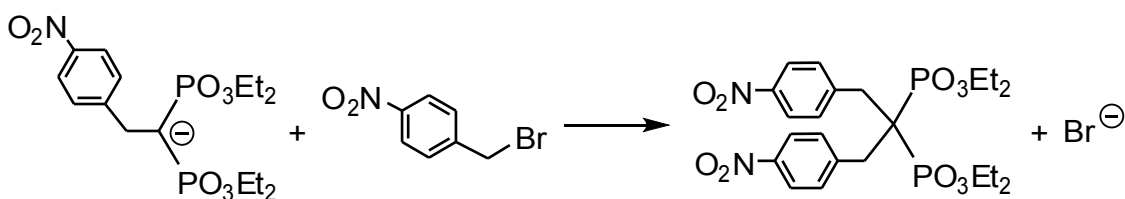


Obrázek 8. Vedlejší produkt tetraethyl 1,1-bis(*p*-nitrobenzyl)methylenbis(fosfonát).

Tetraethyl methylenbis(fosfonát) reaguje s hydridem sodným za vzniku sodného karbaniontu a uvolnění vodíku. Tento karbanion může reverzibilně reagovat s produktem **1** za vzniku výchozího tetraethyl methylenbis(fosfonátu) a monosubstituovaného sodného karbaniontu (**Schema 23**). Monosubstituovaný karbanion je silnějším nukleofilem než methylenbis(fosfonátový) karbanion, a ochotněji reaguje s *p*-nitrobenzylbromidem za vzniku nežádoucího disubstituovaného nitroderivátu (**Schema 24**).



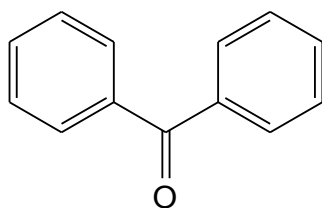
Schema 23. Vznik monosubstituovaného sodného karbaniontu.



Schema 24. Vznik nežádoucího disubstituovaného nitroderivátu.

Jeho vznik se dá omezit (nikoliv však úplně potlačit) použitím přebytku tetraethyl methylenbis(fosfonátu). Z definice reakční rychlosti úměrné součinu rychlostní konstanty a koncentrace reaktantu vyplývá, že zvyšováním nagenovaného množství methylenbis(fosfonátového) karbaniontu lze tlumit vliv silnější nukleofilní aktivity monosubstituovaného karbaniontu. Díky tomu *p*-nitrobenzylbromid reaguje přednostně s methylenbis(fosfonátovým) karbaniontem za vzniku produktu **1**. Je překvapující, že publikovaná syntéza se tímto problémem nezabývá, neboť uvedený molární poměr obou reaktantů je 1:1. Méně překvapujícím je z toho plynoucí důsledek – relativně nízký výtěžek. Na druhou stranu nezreagovaný tetraethyl methylenbis(fosfonát) představuje problém v podobě další špatně dělitelné látky z reakční směsi. Proto bylo potřeba pro snadnější čištění najít takový poměr reaktantů, aby vznikalo co nejméně disubstituovaného nitroderivátu, a zároveň aby v reakční směsi nezůstalo příliš mnoho nezreagovaného methylenbis(fosfonátu). Z vyzkoušených poměrů se nakonec nejvýhodnějším ukázal 50% přebytek methylenbis(fosfonátu), kdy disubstituovaného nitroderivátu opakovaně vznikalo přibližně 5–10 % (podle ^{31}P NMR spekter). Vlastní reakce byla prováděna pod argonovou atmosférou v suchém a deoxygenovaném rozpouštědle.

Čisté rozpouštědlo bylo nejprve několik hodin refluxováno s oxidem fosforečným, předestilováno, a poté znovu refluxováno s plátkou čerstvě nakrájeného sodíku (draslíku), a nakonec znovu předestilováno (vše pod argonovou atmosférou) [54]. Při poslední destilaci byl do rozpouštědla přidán přibližně 1 g benzofenonu (**Obrázek 9**), který je v přítomnosti sodíku redukován na intenzivně modře zbarvený ketylový radikál. Modré zbarvení indikuje kvantitativní odstranění kyslíku a vody z aparatury.



Obrázek 9. Benzofenon.

Vlastní výběr rozpouštědel (THF a toluen) neměl na průběh reakce zásadní vliv. Tendence THF snadno pohlcovat vzdušný kyslík a vlhkost při delším stání však vyžadovala novou destilaci před každou další syntézou. Toluen (který je navíc levnější než THF) zůstal v suchém a deoxygenovaném stavu mnohem delší dobu.

Použitím deoxygenovaných rozpouštědel se zároveň zamezilo vzniku hydroxidu sodného (reakcí NaH s kyslíkem), který na rozdíl od NaH není dostatečně silná báze pro deprotonizaci methylenbis(fosfonátu) za vzniku karbaniontu.

Nicméně i přes omezení vzniku disubstituovaného nitroderivátu bylo čištění produktu **1** pomocí veškerých zkoušených chromatografických metod neúspěšné. Izokratická sloupcová chromatografie na silikagelu (mobilní fáze **MF**₁) nevedla k oddělení i přesto, že *TLC* (**S**₂, **D**₂) známky dělení vykazovala (R_f di = 0,5; R_f mono = 0,7). Gradientová eluce na XADu (mobilní fáze **MF**₂) také očekávané dělení nepřinesla. Hydrofobní ethylesterové funkce, společné pro všechny tři látky, tedy byly zřejmě dominantní, a určovaly tak průběh chromatografií. Proto byla reakční směs obsahující tetraethylestery nitroderivátu **1** (60 % podle ³¹P NMR spektra), disubstituovaného nitroderivátu (přibližně 10 %) a nezreagovaného methylenbis(fosfonátu) (přibližně 30%) zhydrolyzována, aby byl potlačen dominantní vliv esterových funkcí, a podařilo se látky odseparovat ve formě volných kyselin.

4.1.2 1-(*p*-nitrobenzyl)methylenbis(fosfonová) kyselina (**2**)

Produkt **2** byl připraven kyselou hydrolyzou reakční směsi obsahující nitroderivát **1** (60% podle ³¹P NMR spektra) pomocí 33% roztoku bromovodíku v bezvodé kyselině octové při RT (**Schema 14**). Reakce probíhala bez výrazných problémů, některé drobnější komplikace budou diskutovány dále.

Původně byla reakční směs hydrolyzována konc. HCl (reflux, přes noc). V průběhu reakce však byla pozorována změna ze žlutého roztoku na kalně zelenou směs obsahující špatně definovatelné kusy žlutozelené sraženiny (a to i v případě hydrolyzy při nižší teplotě, 80 °C). Po odfiltrování makroskopických nečistot za horka byl získán již homogenní zelený roztok.

Zároveň byly vyzkoušeny další dvě hydrolytické metody. Kyselá hydrolyza roztokem 33% bromovodíku v bezvodé kyselině octové při RT byla výrazně pomalejší (4 d), byl však získán červený homogenní roztok. Po přidání vody došlo sice také k částečnému vysrážení některé ze složek systému, ale v mnohem menší míře než v případě hydrolyzy pomocí HCl.

Stejně jako v předchozím případě byla provedena filtrace za horka, aby se roztok obohatil o produkt **2**, který má ve vodě vysoký teplotní gradient rozpustnosti.

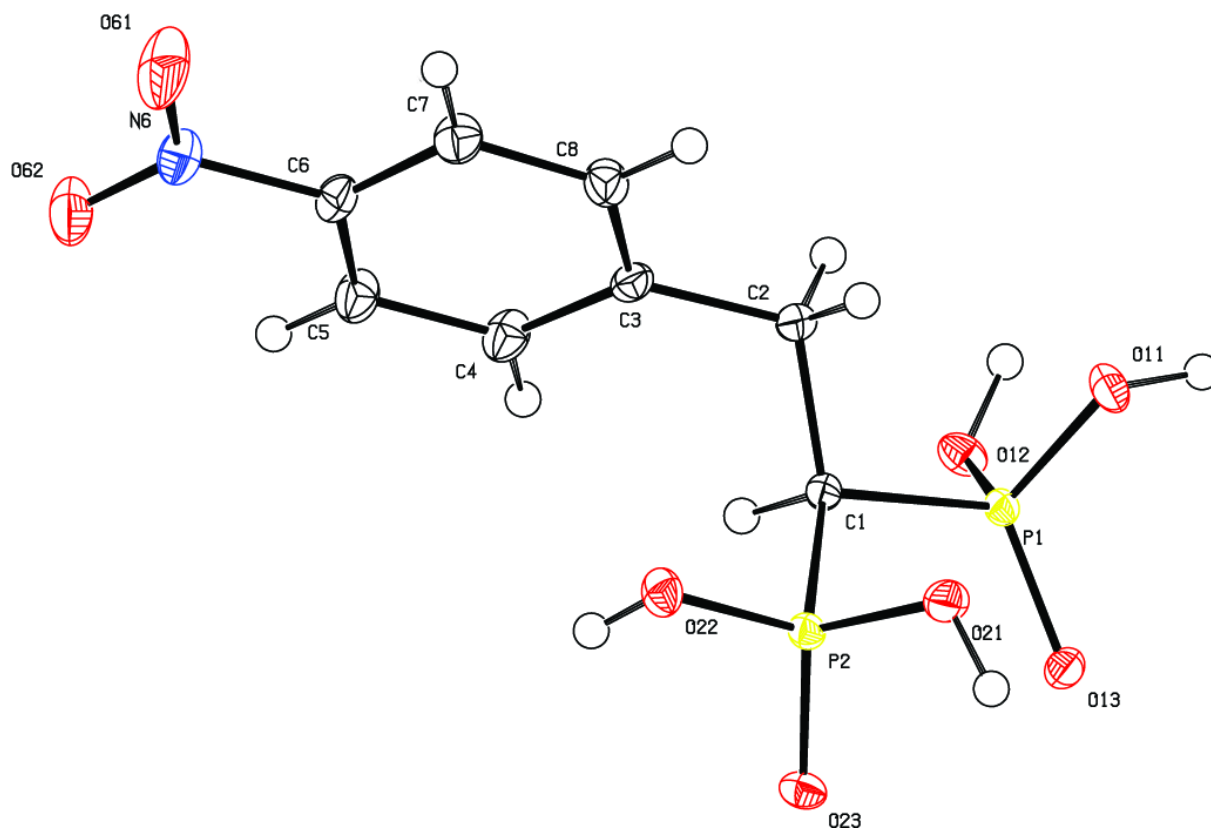
Poslední zmiňována hydrolyza již nepřinesla žádné výrazné zlepšení. Transesterifikace nadbytkem TMSBr při RT proběhla kvantitativně již po jednodenním míchání směsi nitroderivátu **1**. Hydrolyza trimethylsilylesterové funkce protickým rozpouštědlem probíhá okamžitě. Byl získán červený roztok obdobného vzhledu jako při použití HBr v AcOH. Po dalším odpaření a rozpuštění v H₂O opět došlo k vytvoření drobných částecek sraženiny jako u předchozí hydrolyzy. Z finančních důvodů byla nakonec upřednostněna časově náročnější hydrolyza pomocí roztoku HBr v bezvodé AcOH.

Na závěr lze říci, že všechny tři uvedené postupy vedly podle ³¹P NMR spekter ke stejnému výsledku – tj. kvantitativní hydrolyze nitroderivátu **1** a téměř stejným integrálním intenzitám všech hydrolyzovatelných složek.

Zhydrolyzovaná směs byla čištěna chromatograficky. Sloupcovou chromatografií na XADu (mobilní fáze MF₂) se podařilo izolovat nitroderivát **2**. Dělení na XADu je založeno na hydrofobních interakcích, na jejichž základě se podařilo zpomalit průchod produktu **2** (s jedním benzenovým jádrem) oproti methylenbis(fosfonové) kyselině, která byla eluována jako první. Zatímco dvě benzenová jádra disubstituovaného nitroderivátu (byla eluována poslední) interagovala se sorbentem nejsilněji. Přesto pouze přibližně 30 % dělené směsi se podařilo separovat a zbylých 70 % (včetně látek způsobujících zelené zabarvení) zůstalo na koloně a bylo vymyto v neoddělené podobě až 6 M HCl. Příčinou mohla být krystalizace či vysrážení některých složek na koloně. Dalším důvodem mohla být příliš silná hydrofobní interakce benzenových jader (již dříve pozorovaná v naší pracovní skupině u některých látek) v kombinaci s nízkou kapacitou XADu. Je tedy možné, že získaný nitroderivát **2** a disubstituovaný nitroderivát vytekli z kolony pouze díky překročení kapacity XADu.

Z těchto důvodů byla vyzkoušena chromatografie na slabém katexu (mobilní fáze H₂O), kde byla směs na základě hydrofobní interakce úspěšně separována. Ztráty na ionexu byly zároveň překvapivě malé (< 10%). Touto chromatografií bylo získáno 7,40 g nitroderivátu **2** v podobě žlutého oleje (79 % počítáno na *p*-nitrobenzylbromid).

Z takto izolovaného nitroderivátu **2** byly volnou krystalizací z vody připraveny nažloutlé destičkovité monokrystaly vhodné pro RTG analýzu. Látka krystalovala jako monohydrát (**Obrázek 10**). Vybrané RTG parametry nitroderivátu **2** jsou uvedeny v příloze.



Obrázek 10. Molekulová struktura monohydrátu 1-(*p*-nitrobenzyl)methylenbis(fosfonové) kyseliny (**2**). Molekula vody není pro jednoduchost zobrazena.

4.1.3 1-(*p*-aminobenzyl)methylenbis(fosfonová) kyselina (**3**)

Redukce nitroderivátu **2** byla provedena zaváděním plynného vodíku z balónku do reakční směsi v přítomnosti katalyzátoru Pd/C (**Schema 15**). Tato reakce tak není porovnatelná s hydrogenací podle literatury [52], neboť ta popisuje hydrogenaci ethylesterové formy nitroderivátu **1** a nikoliv volné kyseliny **2**.

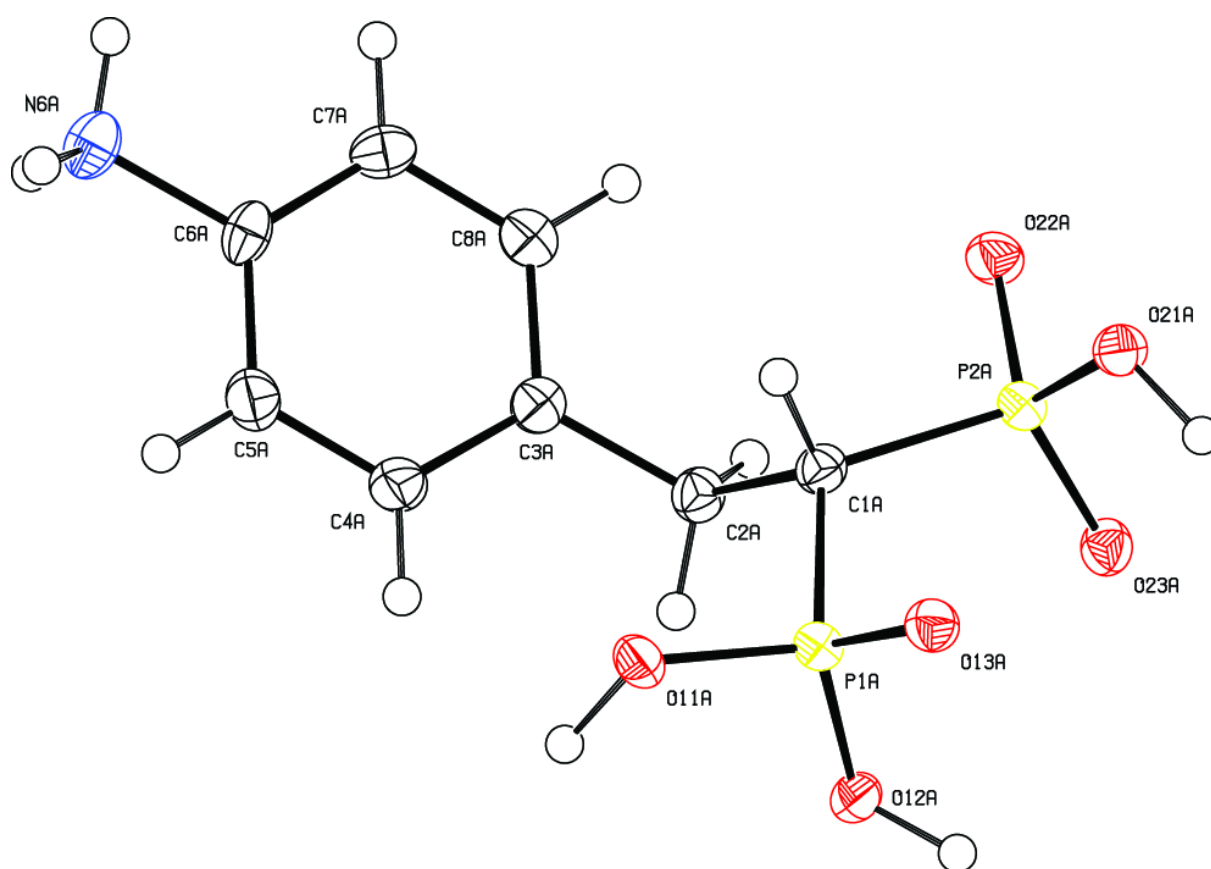
Ukázalo se, že volba vstupních podmínek měla rozhodující vliv na průběh reakce. Kvantitativní konverze bylo dosaženo hydrogenací vodíkem (mírný přetlak balónku) při RT po 24 h (> 90 %, monitorováno ^{31}P NMR spektroskopii). Vícedenní hydrogenace nebo hydrogenace za zvýšené teploty (85 °C) vedly ke vzniku rozkladných produktů.

Díky velmi omezené rozpustnosti při vlastním pH se aminoderivát **3** vyloučil v podobě bílého prášku z reakční směsi zatímco rozpustný nedoreagovaný nitroderivát **2** byl odstraněn filtrací. Komplikace ovšem nastala při oddělování katalyzátoru od produktu v dalším kroku. Vlastní pH volné kyseliny **3** bylo třeba upravit vodným roztokem Et_3N na 5–6 za vzniku rozpustné triethylamonné soli, která byla filtrací oddělena od Pd/C. Volná kyselina **3** byla získána elucí vodou ze slabého katexu, zatímco veškerý Et_3N byl zachycen na sloupci. Po

odpaření bylo získáno 293 mg aminoderivátu **3** v podobě bílého prášku (81 % výtěžek, počítáno na nitroderivát **2**)

Z takto izolovaného aminoderivátu **3** byly volnou krystalizací z vody připraveny bezbarvé jehlicovité monokrystaly vhodné pro RTG analýzu. Látka krystalizuje jako monohydrát (**Obrázek 11**). Z molekulové struktury je patrné, že aminoderivát **3** krystalizuje při vlastním pH (2–3) jako zwitterion (aminová skupina je protonizovaná, bis(fosfonátová) skupina nese jeden záporný náboj). Oproti nitroderivátu **2** je aminoderivát **3** ve vodě při vlastním pH prakticky nerozpustný. Do roztoku ho lze převést až zvýšením pH na 5–6.

Vybrané RTG parametry aminoderivátu **3** jsou uvedeny v příloze.



Obrázek 11. Molekulová struktura monohydrátu 1-(*p*-aminobenzyl)methylenbis(fosfonové) kyseliny (**3**). Molekula vody není pro jednoduchost zobrazena.

4.2 Příprava 1-(*p*-isothiokyanátobenzyl)methylenbis(fosfonové) kyseliny (**4**)

Dalším cílem práce byla příprava 1-(*p*-isothiokyanátobenzyl)methylenbis(fosfonové) kyseliny **4**, která byla syntetizována reakcí aminoderivátu **3** s thiofosgenem ve dvojfázovém systému CCl₄/H₂O (RT, 16 h; **Schema 16**). Výchozí aminoderivát **3** byl rozpuštěn přidavkem vodného roztoku Et₃N (pH ~ 6). Ihned po přidání halogenované fáze s CCl₄ byl roztok intenzivně míchán. Konec reakce byl indikován na TLC (**D**₁) vymizením fialového zabarvení vstupního aminoderivátu **3**.

Produkt **4** byl čištěn nejprve extrakcí mezi CCl₄/H₂O. Protože je thiofosgen omezeně rozpustný i ve vodě, byla provedena reextrakce vodné fáze etherem. Takto získaný isothiokyanát **4** (konverze > 99 % podle ³¹P NMR spektra) byl přečištěn na slabém katexu (odstraněn Et₃N). Odpařením na RVO byla odstraněna HCl (vznikající jako vedlejší produkt syntézy). Takto bylo získáno 204 mg isothiokyanátu **4** ve formě bílého prášku. Zatímco se však o kvantitativním odstranění Et₃N dá snadno přesvědčit ¹H NMR spektroskopií, k stanovení obsahu HCl v odparku by bylo třeba provést např. elementární analýzu. Ta však nemohla být kvůli malému množství produktu **4** zatím provedena. Z tohoto důvodu není uveden procentuální výtěžek reakce.

4.3 Modelové konjugační reakce

Cílem konjugačních reakcí bylo zavést bis(fosfonovou) skupinu na biomolekuly. Pro tento účel je výhodné použít bis(fosfonátu) jako tzv. building-block, který může být jednoduchou reakcí konjugován s řadou různých molekul obsahujících charakteristickou skupinu.

Z tohoto důvodu byl syntetizován aminoderivát **3**, jehož charakteristickou skupinou je NH₂. Z organické syntézy je známo, že primární aminová skupina[#] se může adovat na isothiokyanátovou skupinu za vzniku thiomocovinové vazby (N—C(S)—N). Aminoderivát **3** tak může být jako stavební kámen specificky konjugován s téměř libovolnou látkou obsahující ve svém řetězci organický isothiokyanát, což umožňuje spojení molekuly

[#]Zatímco primární aminy reagují s isothiokyanáty prakticky kvantitativně, sekundární aminy reagují podstatně hůře. Terciární aminy už nereagují s isothiokyanátovou skupinou vůbec. Díky tomu bylo možné např. rozpustit isothiokyanát **4** přidavkem Et₃N, aniž by došlo ke konjugaci.

bis(fosfonátu) s mnoha typy látek, např. bílkovinami, dendrimery, makrocykly, fluorescenčními barvivy, léčivy atd.

Zatímco přítomnost primární aminové skupiny je u řady biomolekul velmi běžná, její derivatizace na isothiokyanát bývá často obtížná či zcela nemožná. Proto byl zároveň připraven i druhý „building-block“ obsahující bis(fosfonát) – konkrétně 1-(*p*-isothiokyanátobenzyl)methylenbis(fosfonát) **4**, který může reagovat přímo s primárním aminem biomolekuly za vzniku thiomocovinové vazby.

Cílem této práce však bylo pouze studium modelových konjugačních reakcí. Isothiokyanát **4** byl konjugován s amoniakem (**NH₃-BBPH**) a s glycinem (**Gly-BBPH**). Klíčový konjugát **F-BBPH** byl připraven dvěma cestami – reakcí isothiokyanátu **4** s fluoresceinaminem a reakcí aminoderivátu **3** s fluoresceinisothiokyanátem.

Všechny konjugační reakce byly prováděny ve vodě za RT. Snahou bylo ponechat reagovat ekvimolární množství reaktantů. Konjugační reakce probíhají až po deprotonizaci aminové skupiny, proto bylo třeba vstupní pH upravit přidavkem NaOH. Výjimku tvoří konjugace s amoniakem, kde byl jeho nadbytek zároveň použit k úpravě pH. Podmínky a výsledky jednotlivých reakcí uvádí **Tabulka 4**.

Tabulka 4. Podmínky a výsledky konjugačních reakcí

Reaktanty	Produkt	pH ¹	<i>t_R</i> ² [h]	Konverze ³ [%]	<i>M_R</i> ⁴	MS(-) ⁵	Schema
4 + NH ₃	NH ₃ -BBPH	8	1	> 95	340,23	338,9	Schema 17
4 + Gly	Gly-BBPH	9	24	> 95	398,26	396,8	Schema 18
4 + FA	F-BBPH	8	5	> 80	670,52	668,9	Schema 19
3 + FITC	F-BBPH	8	5	> 99	670,52	669,0	Schema 20

¹vstupní reakční pH; ²reakční čas; ³konverze podle ³¹P a ¹H NMR; ⁴relativní molární hmotnost konjugátu;

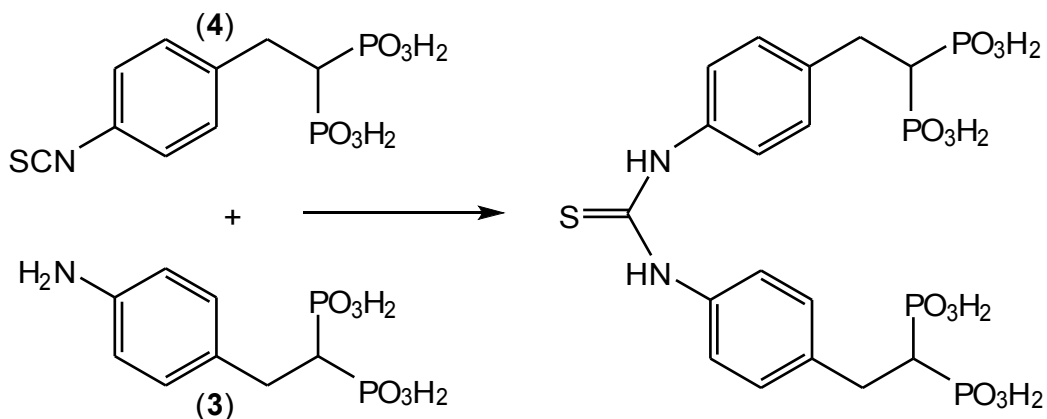
⁵nalezený signál v MS spektru (*M-H*⁺)

Z **Tabulky 4** je patrné, že všechny reakce probíhaly s vysokou konverzí (počítáno na vstupní bis(fosfonáty), monitorováno ³¹P a ¹H NMR spektroskopii). Konjugace s amoniakem byla prováděna pro otestování reaktivity isothiokyanátu **4**. Po 1 h byla reakce ukončena a vzniklý konjugát **NH₃-BBPH** (**Obrázek 7**) byl charakterizován pomocí ³¹P, ¹H NMR a MS spektroskopie.

Reakce s glycinem měla za cíl simulovat konjugace s peptidy. Produkt **Gly-BBPH** (**Obrázek 7**) byl plně charakterizován pomocí ³¹P, ¹H, ¹³C NMR a MS spektroskopie. V ¹³C NMR spektru byl nalezen důležitý signál thiomocovinové skupiny s charakteristickým

posunem (182,0 ppm). Po přidání volného glycinu ke vzorku **Gly-BBPH** byl v ^1H NMR spektru pozorován nový signál v alifatické oblasti s odlišným chemickým posunem (3,56 ppm) oproti signálu CH_2 skupiny konjugovaného glycinu (4,05 ppm). MS spektroskopie také potvrdila vznik konjugátu.

Klíčovým produktem konjugačních reakcí byl **F-BBPH (Obrázek 7)**, který má díky přítomnosti fluorescenčního barviva přímé potenciální využití (zejména pro stanovení adsorpčních parametrů jednoduchých bis(fosfonátů) pomocí kompetitivní sorpce na hydroxyapatit bez využití radionuklidů [58]). K jeho přípravě byly použity dvě komplementární cesty (**4** + FA a **3** + FITC). Reakce vycházející z aminoderivátu **3** však podle získaných dat probíhala lépe (téměř kvantitativní konverze) než reakce vycházející z isothiokyanátu **4** (konverze > 80 %). Z časových důvodů a zejména pro nedostatek výchozího bis(fosfonátu) **4** nemohla být reakce s FA opakována s cílem nalézt optimální podmínky pro vyšší konverzi. Produkt byl charakterizován jen na základě ^{31}P NMR a MS spektroskopie. Z dalších signálů vyskytujících se v ^{31}P NMR spektru předpokládáme přítomnost aminoderivátu **3** (vznikajícího bazickou hydrolyzou vodného roztoku isothiokyanátu **4**) a bis(fosfonátového) dimeru, jehož vznik popisuje **Schema 25**. V MS spektru byl nalezen signál produktu, byly však pozorovány i další nepřirazené signály. Další charakterizace nebyla provedena, neboť při pokusech o dočistění konjugátu došlo k jeho nevratné ztrátě.



Schema 25. Vznik nežádoucího bis(fosfonátového) dimeru.

Konjugace s aminoderivátem na druhé straně probíhala za stejných podmínek výrazně lépe. Produkt **F-BBPH** byl charakterizován ^{31}P , ^1H , ^{13}C NMR i MS spektroskopií. ^{31}P NMR spektrum poskytlo jediný signál. I přes relativně dobrou shodu v integrálních intenzitách signálů ^1H NMR spektra nebyly některé signály aromatické oblasti jednoznačně přiřazeny

konkrétnímu vodíkovému atomu fluoresceinové části konjugátu. Podobná komplikace se vyskytla i v ^{13}C NMR spektru, nicméně vznik konjugátu byl jako v případě **Gly-BBPH** potvrzen charakteristickým posunem signálu thiomocovinové vazby (182,7 ppm). Úplné přiřazení ^1H a ^{13}C NMR spektra by bylo možné s využitím 2D NMR spektroskopie. Z časových důvodů nebyla tato měření provedena. MS spektrum navíc vykazovalo pouze signály náležející konjugátu.

Vzhledem k tomu, že ve všech případech se jednalo o modelové reakce s cílem zjistit, zda tyto vůbec probíhají, nebylo potřeba získat konjugáty zcela čisté. Přesto byly zkoušeny některé dostupné čisticí operace (bohužel většinou neúspěšně).

Nečistoty přítomné v reakčních směsích lze rozdělit do dvou následujících skupin. Do první skupiny spadají nízkomolekulární nečistoty neobsahující bis(fosfonovou) skupinu (NaOH, HCl a nezreagované zbytky výchozích látek Gly, FA, FITC). K odstranění byla zkoušena chromatografie na ionexech (bohužel nelze využít běžné oxidické materiály jako např. silikagel vzhledem k ireverzibilní interakci s bis(fosfonátovou) skupinou). Silný aniont (v AcO^- cyklu) interagoval s **F-BBPH** také příliš silně. Z kolony se podařilo produkt eluovat až 6 M HCl, zřejmě za rozkladu thiomocovinové vazby. Čištění na slabém katexu nebylo prováděno, protože i když předpokládáme, že by nedošlo k hydrolyze thiomocovinové vazby, odstranily by se pouze případné zbytky Et_3N (které lze kvantifikovat z ^1H NMR spekter). Krystalizace nebyly vzhledem k malému množství konjugátů a také kvůli nedostatku času zkoušeny.

Do druhé skupiny patří bis(fosfonátové) nečistoty. Ty zahrnují jak výchozí bis(fosfonáty) **3** a **4**, tak bis(fosfonátový) dimer (**Schema 24**). Tyto nečistoty představují závažný problém, pokud má být výsledný konjugát přímo využit pro adsorpční studie (např. na hydroxyapatit, nanomateriály, atd.). Bis(fosfonátové) nečistoty by konkurovaly adsorpci a snižovaly by efektivní povrch sorbentu. Vzhledem k relativně vysoké konverzi je však těchto látek v reakčních směsích často zanedbatelné množství.

Na závěr lze dodat, že pro vlastní konjugační reakce s biomolekulami nepředstavují nízkomolekulární nečistoty včetně bis(fosfonátových) výrazný problém. Biomolekuly totiž bývají látky s relativní molární hmotností > 1000 a díky tomu mohou být snadno zbaveny nízkomolekulárních látek ultrafiltrací.

5. Závěr

Podářilo se optimalizovat syntézu 1-(*p*-aminobenzyl)methylenbis(fosfonové) kyseliny **3** s výtěžkem 64 % (2,5 krát vyšší výtěžek než publikovaný v literatuře [52]). Tento postup je však oproti publikované syntéze časově náročnější zejména kvůli některým nezbytným čistícím operacím (chromatografie, krystalizace) nebo výrazně delší době hydrolýzy esterových funkcí.

Úspěšně byla syntetizována zcela nová 1-(*p*-isothiokyanátobenzyl)methylenbis(fosfonová) kyselina **4**. Konverze byla podle ^{31}P a ^1H NMR spekter prakticky kvantitativní.

Dále byly studovány konjugační reakce bis(fosfonátů) **3** a **4** s modelovými sloučeninami za vzniku thiomocovinové vazby. Reakce isothiokyanátu **4** s amoniakem prokázala dostatečnou reaktivnost –NCS skupiny. Konjugace isothiokyanátu **4** s glycinem pak úspěšně simulovala konjugace s peptidy. Nejdůležitější konjugát **F-BBPH** byl úspěšně připraven reakcí aminoderivátu **3** s fluoresceinisoithiokyanátem (konverze > 99 %). Původní cesta k **F-BBPH** reakcí isothiokyanátu **4** s fluoresceinaminem nebyla na základě získaných dat zcela úspěšná (konverze > 80 %). Přesto se však domníváme, že obě reakce mohou vést při optimálních podmínkách k srovnatelnému cíli. Tyto podmínky však zatím nebyly zejména z časových důvodů nalezeny.

Domníváme se, že dosažené výsledky však plně postačují jako zdroj informací pro konjugace se složitějšími látkami např. s léčivy či jinými biomolekulami.

6. Příloha

V **Tabulce 5** jsou uvedeny vybrané RTG parametry monohydrátu 1-(*p*-nitrobenzyl)-metylenbis(fosfonové) kyseliny **2** a monohydrátu 1-(*p*-aminobenzyl)metylenbis(fosfonové) kyseliny **3**.

Tabulka 5. Vybrané krystalografické parametry.

	Nitroderivát 2	Aminoderivát 3
Vzorec	$C_8H_{13}N_1O_9P_2$	$C_8H_{15}N_1O_7P_2$
M_R	329,13	299,15
Barva a tvar	Nažloutlá destička	Bezbarvá jehlička
Rozměry [mm]	0,57 x 0,40 x 0,25	0,35 x 0,08 x 0,02
Soustava	Monoklinní	Monoklinní
Prostorová grupa	$P2_1/n$	$P2_1/c$
a [Å]	12,9704(2)	8,6409(2)
b [Å]	6,88830(10)	23,2676(7)
c [Å]	15,6311(3)	11,9193(3)
α [°]	90,00	90,00
β [°]	113,5613(9)	95,1284(18)
γ [°]	90,00	90,00
V [Å ³]	1280,12(4)	2386,82(11)
Z	4	8
D_c [g·cm ⁻³]	1,708	1,665
μ [mm ⁻¹]	0,385	0,392
$F(000)$	680	1248
Celkový počet difrakcí	2928	4704
Počet pozorovaných difrakcí ($I > 2\sigma(I)$)	2793	3336
Data; omezení; parametry	2928; 0; 182	4704; 0; 325
g.o.f.	1,053	1,030
R_1 ($I > 2\sigma(I)$); R_2 (všechna data)	0,0271; 0,0285	0,0422; 0,0733
wR_1 ($I > 2\sigma(I)$); wR_2 (všechna data)	0,0732; 0,0743	0,0936; 0,1079
Maximální změna / e.s.d.	0,001	0,000
Největší difrakční maxima; minima [$e \cdot \text{Å}^{-3}$]	0,415; -0,430	0,275; -0,504

7. Seznam zkratek

<i>Použitá zkratka</i>	<i>Význam</i>
AcOH	kyselina octová
D	deuterium
Et	ethyl
F-BBPH	konjugát 1-(<i>p</i> -isothiokyanátobenzyl)methylen- bis(fosfonové) kyseliny s fluoresceinaminem; konjugát 1-(<i>p</i> -aminobenzyl)methylenbis(fosfo- nové) kyseliny s fluoresceinisothiokyanátem
FA	fluoresceinamin (izomer 1)
FITC	fluoresceinisothiokyanát (izomer 1)
Gly-BBPH	konjugát 1-(<i>p</i> -isothiokyanátobenzyl)methylen bis(fosfonové) kyseliny s glycinem
H ₄ cldp	1,1-dichloromethylenbis(fosfonová) kyselina (Clodronate)
H ₄ hedp	1-hydroxo-1-methylmethylenbis(fosfonová) kyselina (Etidronate)
H ₄ edp	1,1-ethylenbis(fosfonová) kyselina
H ₄ mdp	methylenbis(fosfonová) kyselina
H ₄ meth	1-aminomethylenbis(fosfonová) kyselina
H ₄ pam	1-(2-aminoethyl)-1 hydroxomethylenbis(fosfo- nová) kyselina (Pamidronate)
H ₄ ale	1-(3-aminopropyl)-1-hydroxomethylenbis(fosfo- nová) kyselina (Aledronate)
IUPAC	mezinárodní unie pro čistou a užitou chemii (International Union of Pure and Applied Chemistry)
Ln	lanthanoid
Me	methyl
MS	hmotnostní spektrometrie (Mass Spectrometry)
MsCl	methylen sulfonyl chlorid

<i>Použitá zkratka</i>	<i>Význam</i>
MRI	tomografie magnetické rezonance (Magnetic Resonance Imaging)
NH ₃ -BBPH	konjugát 1-(<i>p</i> -isothiokyanátobenzyl)methylen-bis(fosfonové) kyseliny s amoniakem
NMR	nukleární magnetická rezonance (Nuclear Magnetic Resonance)
RT	laboratorní teplota
RVO	rotační vakuová odparka
SPECT	jednofotonová emisní počítačová tomografie (Single Photon Emission Computing Tomography)
THF	tetrahydrofuran
TLC	chromatografie na tenké vrstvě
Tol	toluen
TMS	tetramethylsilan
TMSBr	trimethylsilylbromid

8. Seznam použité literatury

- [1] Greenwood N.N., Earnshaw A.; *Chemie prvků*, Informatorium, Praha, **1993**
- [2] Quin L.D.; *A Guide to Organophosphorous Chemistry*, A John Wiley & Sons, **2000**
- [3] Kubíček V.; *PhD. Thesis*, Univerzita Karlova, Praha, **2007**
- [4] Fleisch H.; *Bisphosphonates in Bone Disease*, Academic Press, London, **2000**
- [5] Claridge T.D.W.; *High-Resolution NMR Techniques in Organic Chemistry*, Pergamon, Oxford, **1999**
- [6] a) Hilderbrand R.L.; *The Role of Phosphonates in Living Systems*, CRC Press, **1983**
b) Engel R.; *Synthesis of Carbon-Phosphorus Bond*, CRC Press, **1998**
- [7] Šimeček J.; *Bakalářská práce*, Univerzita Karlova, Praha, **2007**
- [8] Schwochau K.; *Technetium Chemistry and Radiopharmaceutical Applications*, Willey–VCH, Weinheim, **2000**
- [9] Gonzalez K.A., Wilson L.J., Wu W., Nancollas G.H.; *Bioorg. Med. Chem.* **2002**, *10*, 1991
- [10] Neville-Webbe H.L., Holen I., Coleman R.E.; *Cancer Treat. Rev.* **2002**, *28*, 305
- [11] Fleisch H.; *Endocr.Rev.* **1998**, *19*, 80
- [12] Blomen L.J.M.J.; History of the bisphosphonates: Discovery and history of the non-medical uses of bisphosphonates. In: Bijvoet O.L.M., Fleisch H.A., Canfield R.E., Russel R.G.G. (Eds.); *Bisphosphonate on Bones*, Elsevier, Amsterdam, **1995**, 111
- [13] Martell A.E., Smith R.M.; *Critical Stability Constants*; Plenum Press, New York, **1974–1989**, Vols. 1–6; NIST Standard Reference Database 46 (*Critically Selected Stability Constants of Metal Complexes*), Version 7.0, **2003**
- [14] Fleisch H., Russel R.G.G., Straumann F.; *Calcif. Tissue Res.* **1968**, *2*, 10
- [15] a) Russel G., Mueller G., Shipman C., Croucher P.; *Novartis Found.Symp.* **2001**, 232, 251 b) Watts N.B.; *Rheum. Dis. Clin. North Am.* **2001**, *27*, 197 c) Coleman R.E.; *Rev. Contemp. Pharmacother.* **1998**, *9*, 147
- [16] Fleisch H., Russell R.G.G., Straumann F.; *Nature* **1966**, *212*, 901
- [17] Fleisch H., Russel R.G., Francis M.D.; *Science* **1969**, *165*, 1262
- [18] Bagi C.M.; *Adv. Drug Delivery Rev.* **2005**, *57*, 995
- [19] Russel R.G.G., Muhlbauer R.C., Bisaz S., Williams D.A., Fleisch H.; *J. Calcif. Tissue. Res.* **1970**, *6*, 83
- [20] Zhang S., Geeti G., Uludağ H.; *Chem. Soc. Rev.* **2007**, *36*, 507

- [21] a) Rogers M.J., Gordon S., Benford H.L., Coxon F.P., Luckman S.P., Monkkonen J., Frith J.C.; *Cancer* **2000**, *12*, 2961 b) Boissier S., Magnetto S., Frappart L., Cuzin B., Ebetino F.H., Delmas P.D., Deliaisse J.M., Clezardin P.; *Cancer Res.* **1997**, *67*, 3890
- [22] Wang D., Miller S.C., Kopečková P., Kopeček J.; *Adv. Drug Delivery Rev.* **2005**, *57*, 1049
- [23] Fleisch H., Reszka A., Rodan G.A., Rogers M.; Bisphosphonates – mechanism of action. In: Bilezikian J.P., Raisz L.G., Rodan G.A. (Eds.); *Principles of Bone Biology*, 2nd Edition, Academic Press, San Diego, **2002**, 1361
- [24] a) Bergstrom J.D., Bostedro R.G., Masarachia P.J., Reszka A.A., Rodan G.; *Arch. Biochem. Biophys.* **2000**, *373*, 231 b) van Beek E., Pieterman E., Cohen L., Lowik C., Papapoulos S.; *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1999**, *264*, 108 c) Rogers M.J., Watts D.G., Russel R.C.G.; *Cancer* **1997**, *80*, 1652
- [25] Widler L., Jaeggi K.A., Glatt M., Müller K., Bachmann R., Bisping M., Born A.-R., Cortesi R., Guiglia G., Jeker H., Klein R., Ueli R., Schmid J., Schreiber G., Seltenmeyer Y., Green J.R.; *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 3721
- [26] Russell R.G.G., Rogers M.J.; *Bone* **1999**, *25*, 97
- [27] Deutsch E., Libson K., Jurisson S., Lindoy L.F.; *Prog. Inorg. Chem.* **1983**, *30*, 75
- [28] Macdonald W.B.G., Troedson R.G.; *Clin. Nucl. Med.* **2001**, *26*, 455
- [29] Kawamura E., Kawabe J., Hayashi T., Oe A., Kotani J., Torri K., Habu D., Shiomi S.; *Clin. Nucl. Med.* **2005**, *30*, 351
- [30] An Y.-S., Yoon J.-K., Lee M.-H., Joh C.-W. Yonn S.-N.; *Clin. Nucl. Med.* **2004**, *29*, 723
- [31] Mackie G.C.; *Clin. Nucl. Med.* **2003**, *28*, 851
- [32] Adzamli I.K., Gries H., Johnson D., Blau M.; *J. Med. Chem.* **1989**, *32*, 139
- [33] Ogawa K., Mukai T., Arano Y., Ono M., Hanaoka H., Ishino S., Hashimoto K., Nishimura H., Saji H.; *Bioconjugate Chem.* **2005**, *16*, 751
- [34] Zaheer A., Lenkinski E., Mahmood A., Jones A.G., Cantley L.C., Frangioni J.V.; *Nat. Biotechnol.* **2001**, *19*, 1138
- [35] Kubíček V., Rudovský J., Kotek J., Hermann P., vander Elst L., Muller R.N., Kolar Z.I., Wolterbeek H. T., Peters J.A., Lukeš I.; *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 16477
- [36] Vitha T., Kubíček V., Hermann P., Elst L.V., Muller R.N., Kolar Z.I., Wolterbeek H.T., Breeman W.A.P., Lukeš I., Peters J.A.; *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 677
- [37] Hengst V., Oussoren C., Kissel T., Storm G.; *Inter. Jour. Pharm.* **2007**, *331*, 224

- [38] Gittens S.A., Bansal G., Zernicke R.F., Uludag H.; *Adv. Drug Delivery Rev.* **2005**, 57, 1011
- [39] Kubíček V., Kotek J., Hermann P., Lukeš I.; *Eur. J. Inorg. Chem.* **2007**, 333
- [40] Harvey R.G., De Sombre E.R.; The Michaelis-Arbuzov and related reactions. In: Griffith E.J., Grayson M. (Eds.); *Topics in Phosphorous Chemistry*, Vol. 7., J.Wiley, New York **1972**, 57
- [41] a) Canavan A.E., Dowden B.F., Eaborn C.; *J. Chem. Soc.* **1962**, 331 b) Curry J.D., Nicholson D.A., Quimby O.T.; Oligophosphonates. In: Griffith E.J., Grayson M (Eds.); *Topics in Phosphorous Chemistry*, Vol. 7., J.Wiley, New York **1972**, 37
- [42] Takeuchi M., Sakamoto S., Yoshida M., Abe T., Isomura Y.; *Chem. Pharm. Bull.* **1993**, 41, 688
- [43] Degenhart C.R., Burdsall D.C.; *J. Org. Chem.* **1986**, 51, 3488
- [44] Lebdušková P., Hermann P., Helm L., Tóth E., Kotek J., Binnemans K., Rudovský J., Lukeš I., Merbach A.E.; *Dalton Trans.* **2007**, 493
- [45] Vepsäläinen J., Nupponen H., Pohjala E., Ahlgren M.; *J. Chem. Soc.* **1992**, 835
- [46] Von Blaser B., Worms K.-H., Germscheid H.-G., Wollmann K.; *Z. Anorg. Allg. Chem.* **1971**, 381, 247
- [47] Kiczynski G.R., Jobson R.B., Melillo D.G., Reinhold D.F., Grenda V.J., Zhinkai I.; *J. Org. Chem.* **1995**, 60, 8310
- [48] Blum H., Worms K.; *U.S. Patent* **1977**, 4054598
- [49] a) Nicholson D.A., Vaughn H.; *J. Org. Chem.* **1971**, 36, 3843 b) Nguyen L.M., Niesor E., Bentzen C.L.; *J. Med. Chem.* **1987**, 30, 1426 c) Bosies E., Gall. R.; *U.S. Patent* **1987**, 4687767 d) Bentzen C.L., Mong L.N., Niesor E., *U.S. Patent* **1983**, 4371527 e) Bentzen C.L., Mong L.N., Niesor E., *U.S. Patent* **1982**, 4309364
- [50] Lecouvey M., Leroux Y., *Heteroat. Chem.* **2000**, 11, 556
- [51] Ruel R., Bouvier J.P., Young R.N.; *J. Org. Chem.* **1995**, 60, 5209
- [52] Benedict J.J., Degenhardt C.R., Poser J.W.; *U.S. Patent* **1985**, 4830847
- [53] Pitra J., Zoula V.; *C.S. Patent*, 1980, 201892
- [54] Perrin D.D., Armarego W.L.F.; *Purification of Laboratory Chemicals*, 3rd Edition, Pergamon Press, Oxford, **1988**
- [55] a) Otwinovski Z., Minor W.; *HKL DENZO and Scalepack Program package*, Nonius BV, Delft, **1997** b) Otwinovski Z., Minor W.; *Methods Enzymol.* **1997**, 276, 307

- [56] Altomare A., Burla M.C., Camalli M., Cascarano G., Giacavazzo C., Guagliardi A., Polidori G.; *J. Appl. Crystallogr.* **1994**, *27*, 435
- [57] Sheldrick G.M.; *SHELXL97, Program for Crystal Structure Refinement from Diffraction Data*, University of Göttingen, Göttingen, **1997**
- [58] Vitha T., Kubiček V., Hermann P., Kolar Z.I., Wolterbeek H.T., Peters J.A., Lukeš I.; *Langmuir* **2008**, *24*, 1952

Poděkování

Na závěr své práce bych rád poděkoval svým školitelům – Vojtovi Kubíčkoví a Tomášovi Vithovi za trpělivost, ochotu i za drahocenný čas, který pro tuto práci obětovali.

Děkuji Miroslavu Lorentzovi za ochotu moji práci oponovat.

Dále děkuji Honzovi Kotkovi a Petrovi Hermannovi za mnoho cenných připomínek a rad; za vytvoření příjemného pracovního prostředí pak celému osazenstvu laboratoře „19“.

Speciální dík pak patří Rascalovi za velkou pomoc při umývání špinavého nádobí.