

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Jan Kubinec

Koordinální vlastnosti monoamidu NOTA

Coordination properties of NOTA monoamide

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: doc. RNDr. Vojtěch Kubiček, Ph.D.

Praha 2016

Prohlášení

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

Jsem si vědom toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 18.8.2016

Abstrakt

Tato práce se zabývá přípravou monoamidu makrocyklu NOTA, který byl úspěšně připraven a plně charakterizován. Potenciometricky byly studovány acidobazické vlastnosti a stanoveny čtyři hodnoty pK_a , které jsou nižší než hodnoty ligandu NOTA. Dále byly studovány koordinační vlastnosti s vybranými ionty z první řady přechodných kovů. Byly stanoveny konstanty stability vzniklých komplexů, které jsou také nižší než stejné komplexy s ligandem NOTA.

Klíčová slova: makrocyclické komplexy, pozitronová emisní tomografie, termodynamická stabilita, formační kinetika, radiofarmaka

Abstract

The aim of this thesis was to prepare monoamide of macrocycle NOTA, which was successfully prepared and fully characterized. Acid-base properties were investigated by potentiometric titration and four protonation constants were found, which are lower than pK_a 's of NOTA ligand. Coordination properties with selected ions from the first row of transition metals were investigated. Stability constants of studied complexes are also lower than the same complexes with NOTA ligand.

Key words: macrocyclic complexes, positron emission tomography, thermodynamic stability, formation kinetic, radiopharmaceuticals

Obsah

1. Úvod	7
1.1 Radiologie a přehled zobrazovacích technik	7
1.2 SPECT metoda	8
1.3 PET metoda	9
1.4 Galium	11
1.5 Ligandy pro galium	12
1.5.1 Ligandy acyklické	12
1.5.2 Ligandy se základním skeletem TACN	13
1.5.3 Ligandy se základním skeletem cyklenu	14
1.6 Cíle a motivace práce	15
2 Experimentální část	16
2.1 Použité chemikálie	16
2.2 Metody charakterizace	16
2.2.1 Nukleární magnetická resonance (NMR).....	16
2.2.2 Hmotnostní spektrometrie (MS).....	16
2.2.3 Chromatografie na tenké vrstvě (TLC).....	16
2.2.4 Elementární analýza	17
2.2.5 Potenciometrická titrace	17
2.3 Syntéza	18
2.3.1 1-benzyl-1,4,7-triazacyklononan (1) (BnTACN).....	18
2.3.2 Di- <i>tert</i> -butyl 1-benzyl-1,4,7-triazacyklononan-4,7-diacetát (2)	19
2.3.3 Di- <i>tert</i> -butyl 1,4,7-triazacyklononan-1,4-diacetát (NO ₂ AtBu) (3)	19
2.3.4 2-chloro- <i>N,N</i> -diethylacetamid (4).....	20
2.3.5 Di- <i>tert</i> -butyl 7-(2-(diethylamino)-2-oxoethyl)-1,4,7-triazonan-1,4-diacetát (5).....	21
2.3.6 Kyselina 7-(2-(diethylamino)-2-oxoethyl)-1,4,7-triazonan-1,4-dioctová (H ₂ L)	22
3 Diskuze	23
3.1 Syntéza	23
3.2 Potenciometrické titrace	25
3.2.1 Acidobazické vlastnosti.....	25
3.2.2 Koordinační vlastnosti	26

3.2.3	Stabilita ligandu	31
4	Závěr.....	32
5	Literatura	33

Seznam zkratek

H ₃ NOTA	kyselina 1,4,7-triazacyklononan-1,4,7-trioctová
CT	computed tomography (počítačová tomografie)
MRI	magnetic resonance imaging (magnetická rezonance)
PET	positron emission tomography (pozitronová emisní tomografie)
SPECT	single photon emission computed thomography (jednofotonová emisní tomografie)
H ₄ DOTA	kyselina 1,4,7,10-tetraazacyklododekan-1,4,7,10-tetraoctová
H ₅ DTPA	kyselina diethyltriaminpentaoctová
H ₄ EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
TACN	1,4,7-triazacyklononan
NMR	nukleární magnetická rezonance
BnTACN	1-benzyl-1,4,7-triazacyklononan
Bn	benzyl
RT	laboratorní teplota
RVO	rotační vakuová odparka
NO ₂ AtBu	1,4-bis(tert-butyl-acetyl)-1,4,7-triazacyklononan
H ₂ L	kyselina 7-(2-(diethylamino)-2-oxoethyl)-1,4,7-triazonan-1,4-dioctová

1. Úvod

Rakovina je celosvětovým problémem, což dokládají čísla z American Cancer Society, která říkají, že v roce 2012 byla rakovina diagnostikována 14,1 milionu pacientů a přitom 8,2 milionu pacientů zemřelo na následky rakoviny. Statisticky tedy může za každé sedmé úmrtí na světě, což je více než HIV, tuberkulóza a malárie dohromady.¹ Tato fakta nutí vědecké pracovníky vyvíjet sofistikovanější metody pro zobrazování nežádoucího rakovinného bujení a jeho terapie. Pro aplikaci *in vivo* se hojně využívají makrocyclické sloučeniny a jejich deriváty, které mají velký potenciál pro využití jako radiofarmakum. Organické ligandy poskytují silnou koordinačně kovalentní vazbu na centrální atom radioizotopu. Při kombinaci použití vhodných radioizotopů, ligandů a detekce ionizujícího záření se jedná o velmi účinnou zobrazovací techniku.

1.1 Radiologie a přehled zobrazovacích technik

Radiologie je soubor metod, které využívají ionizující záření pro zobrazení či terapii pacientů. Do radiologických vyšetření se začleňují i techniky založené na neionizujících principech, které mají za úkol také nedestruktivně zobrazit vnitřní prostředí pacienta.

Prvním úspěšným pokusem o zobrazení se proslavil Wilhelm Conrad Röntgen, který ke konci 19. století objevil rentgenovo záření, které procházelo i materiály, kterými světlo neprochází. Vzniká dopadem urychlených elektronů za pomoci vysokého napětí na kovový terč, ze kterého se uvolňuje záření o vlnové délce 0,1 – 10 nm. Pokud vystavíme lidské tělo tomuto záření, které detekujeme pomocí fotografické desky nebo jiného detektoru, zjistíme, že kosti absorbují záření více než ostatní tkáň, a proto se tato technika používá při vyšetřování tvrdých tkání. Rentgenové zobrazování je nejpoužívanější technikou v medicíně. Rentgenové vyšetření může být modifikováno například podáním kontrastní látky silněji absorbující záření než vyšetřovaná tkáň. Významnou inovací rentgenového vyšetření je takzvaná „počítačová tomografie“ známější jako CT (computed tomography). Jejím základem je „tunel“, ve kterém je rentgenka pohybující se po obvodu a scintilační detektory sbírající údaje o prošlém záření. Velkou výhodou této metody je vysoká citlivost a 3D obraz, který je počítačem

poskládaný z jednotlivých snímků. Zástupce technik neuvádějících ionizující záření, je ultrazvukové vyšetření, jehož podstatou jsou vysokofrekvenční vlny. Používá se při sledování prenatálního vývoje jedince v matčině těle. Jednou z citlivých metod pro zobrazování tkání je MRI (magnetic resonance imaging). Tělo pacienta je vystaveno silnému magnetickému poli, které působí na částice s nenulovým spinem. Nejhojněji zastoupený prvek s nenulovým spinem je vodík, který při určité frekvenci změny svého spinu na opačný. Frekvence je převedena počítačem na signál, jehož intenzita závisí na lokaci částice v těle. Signál je posléze převeden na obraz, který se v počítači může prohlížet z různých rovin. Pro zlepšení kontrastu se pacientovi může vpravit do krevního oběhu chelát gadolinia.² Velmi citlivé techniky zobrazování, které používají radiofarmaka jako zdroj kontrastu jsou PET a SPECT.

1.2 SPECT metoda

Jedna z metod mapujících distribuci radiofarmaka v těle jedince je Single Photon Emission Computed Tomography (jednofotonová emisní tomografie). Radiofarmakum má na sobě navázaný radionuklid, který emituje γ záření (fotony) o specifické energii. Fotony z těchto zářičů jsou usměřovány kolimátorem do detektoru. Pomocí SPECT je získáván, po převedení signálů počítačem podle určitého algoritmu, 3D obraz vyšetřovaného. Pokud je SPECT vyšetření kombinováno s MRI nebo CT, lze určit přesné množství radioaktivity v orgánech *in vivo*.³

Tabulka 1: Vybrané γ zářiče používané ve SPECT vyšetřeních^{4,5,6}

Radionuklid	$T_{1/2}$	Zdroj	Vyšetření v
^{67}Ga	61,9 h	$^{68}\text{Zn}(p, 2n)^{67}\text{Ga}$, cyklotron	imunologie gastroenterologie,
$^{99\text{m}}\text{Tc}$	6 h	$^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$, generátor	kardiologie
^{123}I	13 h	$^{123}\text{Te}(p, n)^{123}\text{I}$, cyklotron	neurologii
^{111}In	2,8 dne	$^{111}\text{Cd}(p, n)^{111}\text{In}$, cyklotron	imunologii
^{201}Tl	3 dny	$^{203}\text{Tl}(p, 3n)^{201}\text{Pb} \rightarrow ^{201}\text{Tl}$	kardiologii

1.3 PET metoda

PET je zkratka z anglického Positron Emission Tomography. Je to zobrazovací technika využívající jako radionuklidy atomy s přebytkem protonů, která sleduje distribuci radiofarmaka v organismu. Tyto radionuklidy podléhají β^+ rozpadu. Používají se nuklidy s krátkým poločasem rozpadu, aby radioaktivita nezatěžovala organismus po příliš dlouhou dobu. Radioizotopy se připravují v základě třemi cestami. Dostupná a nenáročná cesta je pomocí generátoru, kde vzniká žádaný izotop samovolným radioaktivním rozpadem. Druhá, relativně dostupná, metoda přípravy nuklidů je pomocí cyklotronu, kde produkt vzniká ostřelováním terčového jádra částicemi. Nejméně dostupnou přípravou radiologicky využitelných nuklidů je reaktor.⁷

Pozitron uvolněný rozpadem jádra obsaženého ve farmaku po uražení určité dráhy, kterou definuje získaná energie po rozpadu, anihiluje s elektronem za vzniku navzájem antiparalelního fotonického záření s energií 511 keV. Dráha pozitronu ve tkáni může být různá a může dosahovat až 16 mm, což snižuje přesnost určení akumulovaného radiofarmaka. Tento limit bývá částečně eliminován kombinací s CT vyšetřením nebo použitím radiofarmak, které mají nízké energie pozitronů. Detektor zachytává pouze γ -záření, které dopadne v čase s maximálním rozdílem 3–15 ns a v opačném směru (maximální odchylka $0,5^\circ$), čímž eliminujeme pozitrony vychýlené ze své dráhy. Detektory jsou složeny buď z lutecium orthosilikátu, lutecium yttrium orthosilikát nebo gadolinium orthosilikát apod. Toto dělá z PET nejmodernější nástroj v diagnostice tumorových onemocnění.^{7,8}

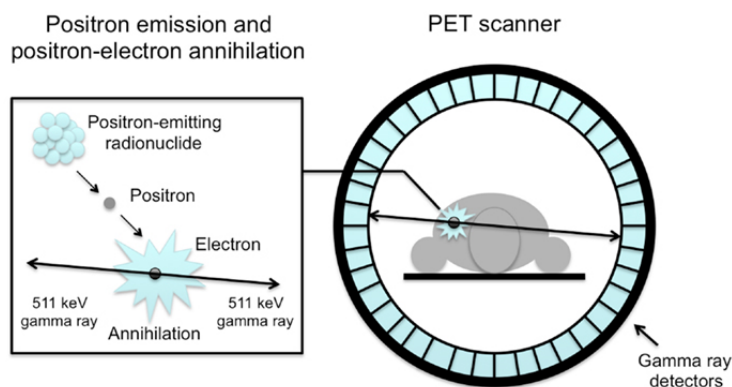
Dnes nejpoužívanějším radiofarmakem pro PET vyšetření je ^{18}F FDG (fluorodeoxyglukóza), která se používá přibližně v 90% případů. Všechny buňky používají více či méně ke svému životu glukózu jako zdroj energie. Tumorové tkáně vykazují rychlý růst a jednu anomálii ve svém metabolismu. Rakovinné buňky nevyužívají citrátový cyklus probíhající v mitochondriích a regenerace NADH na NAD^+ probíhá přeměnou pyruvátu na laktát. Zisk energie probíhá pouze z glykolýzy. Toto chování tumorových tkání se nazývá „Warbourgův efekt“. Z těchto důvodů se začala využívat glukóza značená atomem ^{18}F (^{18}F FDG – 18-fluorodeoxyglukóza).⁹

Zdrojem pozitronů v současných kontrastních látkách jsou také ionty kovů. Tyto volné ionty se distribuují v těle převážně pomocí difuze, tudíž radiofarmakum

neposkytuje požadovaný kontrast. Volné ionty kovů bývají často toxické, takže jejich volný pohyb po organismu by byl nežádoucí. Pro zamezení toxicity se kovy vážou do komplexních sloučenin s ligandy, které poskytují vysoce termodynamicky stabilní a kineticky inertní sloučeniny. Ligandem často bývá makrocyclická sloučenina, jejíž vazba s kovem poskytuje žádané vlastnosti. Makrocyclické ligandy mohou být modifikovány postranními řetězci. Velmi často to bývá acetát, protože vzniklá koordinačně kovalentní vazba utvoří pětičlenný kruh, který stabilizuje vazbu centrálního kovu a ligandu. Na acetátové pendantní rameno se pomocí amidové vazby vážou přímo nebo pomocí linkeru aktivní biomolekuly, které specifikují distribuci radiofarmaka v organismu.

Aktivní biomolekulou může být například peptid nebo protein. Tento způsob cílení je vhodný pro některé tumorové tkáně, které nadměrně produkují určité peptidy a jsou jimi i regulované. Výhodné jsou zejména kvůli své modifikovatelnosti radionuklidem na mnohých místech peptidu. Pro stabilitu radiofarmak s peptidovým aktivním centrem je stěžejní *in vivo* stabilita, protože v organismu se vyskytuje mnoho peptidáz a proteáz, které jsou schopné rozložit peptidovou složku radiofarmaka. Stabilita je zvyšována zavedením d-aminokyseliny do řetězce nebo substitucí postranního řetězce některé aminokyseliny neobvyklým substituentem. Tyto druhy kontrastních látek se běžně značí ^{18}F , ^{64}Cu nebo ^{68}Ga .¹⁰

Typickým příkladem jsou analogy somatostatinu, protože tumorové buňky mají mnoho somatostatinových receptorů. Zkoumané aktivní biomolekuly tohoto typu byly například TOC a RGD. RGD je tripeptid argininu, glycinu a aspartátu, který bývá nadměrně exprimován některými tumory, které mají aktivované endotelové buňky. Tento tripeptid je součástí $\alpha_v\beta_3$ integrinů, které slouží jako receptory pro extracelulární proteiny s touto sekvencí. TOC je peptid obsahující [Tyr3]-octreotid, který se s vysokou afinitou váže na somatostatinové receptory. Zkoumáno bylo využití na makrocycly H₄DOTA.¹¹



Obrázek 1: Schématický princip PET metody¹²

Tabulka 2: Vybrané β^+ zářiče pro PET vyšetření^{13,14,15}

Radionuklid	$T_{1/2}$ [min]	Zdroj
^{18}F	109,8	$^{18}\text{O}(p, n)^{18}\text{F}$, cyklotron
^{64}Cu	12,7	$^{64}\text{Ni}(p, n)^{64}\text{Cu}$, cyklotron
^{68}Ga	67,7	$^{68}\text{Ge}(\beta^-)^{68}\text{Ga}$, generátor
$^{110\text{m}}\text{In}$	69,2	$^{110}\text{Sn}(\beta^-)^{110}\text{In}$, generátor
^{134}La	6,5	$^{134}\text{Ce}(\beta^-)^{134}\text{La}$, generátor

1.4 Galium

Galium (protonové číslo 31) je stříbrolesklý kov 13. skupiny, který získal pojmenování podle latinského názvu pro Francii (Gallia). Elektronová konfigurace $[\text{Ar}] 3d^{10}4s^24p^1$ předurčuje tento prvek k náboji +III a méně častěji +I. Svými chemickými vlastnostmi se podobá hliníku. Tento kov lze nalézt v malé míře spolu se sfaleritem, odkud se také poprvé izoloval.¹⁶

Pro radiomedicínské aplikace se používají zejména izotopy ^{67}Ga pro SPECT vyšetření, který se připravuje na cyklotronu ostřelováním jádra ^{68}Zn protony. Druhý izotop ^{68}Ga se připravuje pomocí $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ generátoru pro PET vyšetření. Výhoda tohoto radionuklidu je zejména v tom, že diagnostické zařízení se obejde bez cyklotronu a ^{68}Ga poskytuje vysoké pozitronové výtěžky (cca 90%).¹⁷ ^{68}Ge v generátoru se rozpadá elektronovým záchytem s poločasem 271 dní. Generátor může být eluován poměrně

často, protože maximálního výtěžku je dosaženo během několika hodin. Vzniklé ^{68}Ga naadsorbované na SnO_2 se eluuje pomocí 1M HCl. Vzhledem k relativně dlouhému poločasu rozpadu mateřského nuklidu se může generátor používat skoro rok.¹⁸ Významnost ^{68}Ga stoupá a je jedním z nejdůležitějších PET izotopů používaných v klinické praxi.

Při využití Ga^{3+} , jako radionuklidu produkujícího pozitrony, *in vivo*, je nutno zajistit kineticky inertní vazbu k ligandu, protože se komplex dostane do prostředí v němž se vyskytuje mnoho konkurenčních iontů a látek, které mají afinitu ke galitému iontu a snaží se ho vyvázat z radiofarmaka. Vysokou tendenci ke transchelataci radiofarmaka s centrálním atomem galia má zejména transferrin.¹⁹

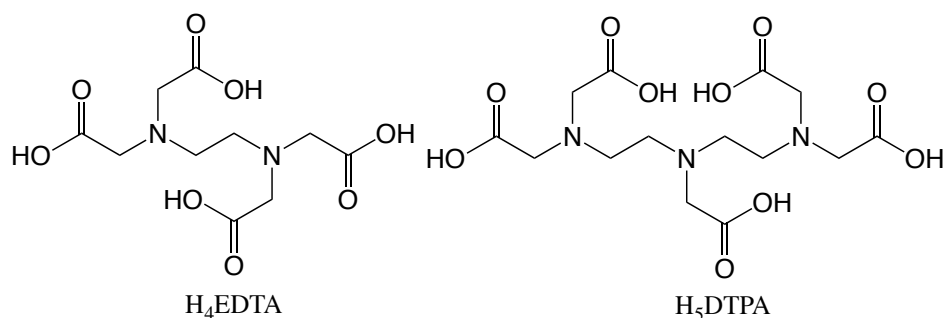
1.5 Ligandy pro galium

Galium pro radiofarmakologické aplikace se váže do komplexních sloučenin zajišťující pevnou a stabilní vazbu, protože volné ionty kovů mají vysokou toxicitu a mohly by být vázány biomolekulami, které by akumulovaly radioizotopy v organismu. Ga^{3+} je tvrdá lewisovská kyselina a tvoří termodynamicky stabilní komplexy s tvrdými lewisovskými bázemi koordinující se kyslíkem nebo dusíkem. Tento kov se chová podobně jako Fe^{3+} , takže preferuje okolí šesti donorových atomů.²⁰

Termodynamická stabilita a kinetická inertnost je důležitá při charakterizaci komplexních sloučenin. Pro klinické použití, je výhodné, aby radiofarmaka měla vysokou termodynamickou stabilitu, kvůli zamezení disociace ligandů. Důležitá je kinetická inertnost při aplikaci *in vivo*, kde u kineticky inertní komplexní částice je ještě snížena nebo zamezena možnost disociace komplexu například stericky nebo vytvořením chelátového kruhu.

1.5.1 Ligandy acyklické

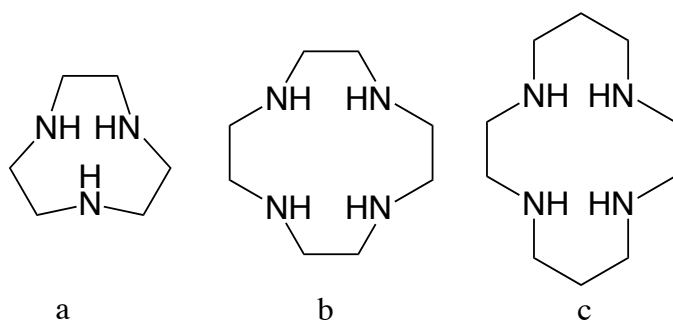
Ligandy, které mají acyklický charakter se podobají H_4EDTA nebo H_5DTPA . Ramena ligandů používaných pro chelataci iontů v radiofarmakách mohou mít některá ramena modifikována atomy síry. Komplexy s galiem vykazují dobrou termodynamickou stabilitu srovnatelnou s makrocyclickými ligandy, ale mají výrazně nižší kinetickou inertnost, což velmi limituje jejich plošné použití v klinických aplikacích.¹⁷ S výhodou se dají využít pro komplexování radionuklidů s krátkou dobou života, ale pro klinickou aplikaci jsou spíše nevhodné.



Obrázek 2: Vybrané acyklické chelátory

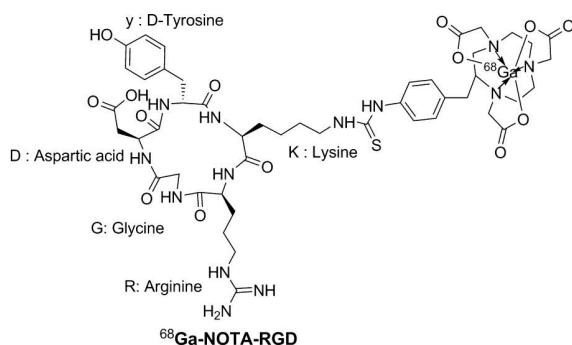
1.5.2 Ligandy se základním skeletem TACN

Vysoce termodynamicky stabilní a kineticky inertní se ukázaly makrocyclické komplexy Ga^{3+} na bázi 1,4,7-triazacyklononanu (TACN) a kyseliny 1,4,7-triazacyklononan-1,4,7-trioctové (H_3NOTA). Stabilita je zajišťována vhodným průměrem kavity TACN cyklu a sterickou ochranou pendantními rameny, která brání nukleofilním částicím v ataku komplexu, jeho následnému rozpadu a transchelataci jinou molekulou. Derivatizace základního makrocyclu upravuje vlastnosti výsledné molekuly, protože ovlivňuje biodistribuci, lipofilitu, preferenci cesty vylučování a především kinetickou inertnost a stabilitu komplexu.²¹ Syntetizovány byly bifunkční deriváty TACN s různými pendantními skupinami pro Ga^{3+} .¹⁹ Komplexace iontu $^{68}Ga^{3+}$ molekulou H_3NOTA probíhá při laboratorní teplotě, do 10 minut a s 95% radiochemickou čistotou. Komplex je stabilní v reakční směsi, fosfátovém pufru a lidské plasmě během 4,5 hodinové inkubace.²²



Obrázek 3: Základní skelety makrocyclických ligandů (a – TACN – 1,4,7-triazacyklononan; b – Cyklen – 1,4,7,10-tetraazacyklododekan; c – Cyklam - 1,4,8,11-tetraazacyclotetradekan)

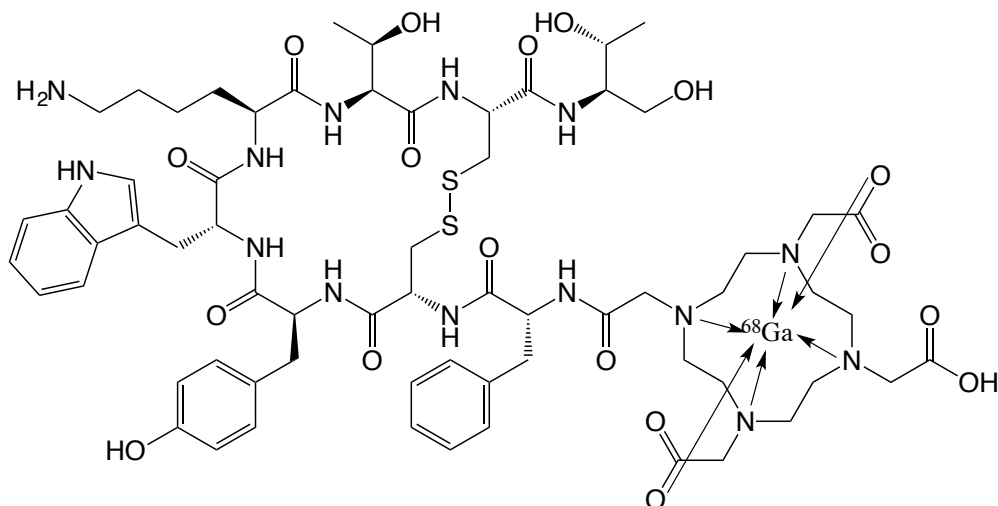
Z mnoha aktivních biomolekul byl jedním ze zkoumaných RGD. Jako radiologicky aktivní část byl použit derivát skeletu H₃NOTA s centrálním atomem ⁶⁸Ga. Zkoumané byly cyklické i lineární analogy RGD jako aktivní části molekuly radiofarmak.²³ Radiofarmakum ⁶⁸Ga-NOTA-RGD má potenciál být kontrastní látkou pro aterosklerotické onemocnění a pro rakovinu prostaty. Kladem je, že příprava ⁶⁸Ga-NOTA-RGD trvá přibližně 35 minut, ale problémem pro širší klinickou aplikaci může být nižší kontrast a citlivost oproti masivně využívané ¹⁸FDG.^{24,25}



Obrázek 4: Struktura ⁶⁸Ga-NOTA-RGD

1.5.3 Ligandy se základním skeletem cyklenu

Hojně využívaným makrocylem je i H₄DOTA (kyselina 1,4,7,10-tetraazacyklododekan-1,4,7,10-tetraoctová), která je postavená na kostře cyklenu a derivatizovaná čtyřmi acetáty. Má podobný efekt jako H₃NOTA, kdy zvyšuje termodynamickou stabilitu a kinetickou inertnost komplexů galia oproti analogům H₅DTPA (kyselina diethylentriaminpentaoctová). H₄DOTA má větší kavitu, tudíž poskytuje stabilnější komplexy s ionty kovů s větším atomovým poloměrem.²⁶ Popsáno je mnoho případů, kdy se Ga³⁺ používá s derivatizovaným ligandem na skeletu H₄DOTA. Tento makrocyclus obsahuje 8 donorových atomů, které se mohou účastnit koordinačně kovalentní vazby. Galium je schopno koordinovat pouze šest donorových atomů, tudíž zůstanou dvě pendantní ramena makrocyclu H₄DOTA volná. Tato ramena mohou být využita pro navázání bioaktivních látek, které determinují distribuci v organismu.¹⁹ Komplexace galitého ionu ligandem H₄DOTA v porovnání s ligandem H₃NOTA vyžaduje mnohem vyšší teplotu, což limituje použití ligandů s navázanými proteiny nebo protilátkami.²⁷ Nejznámějším a nejpoužívanějším derivátem obsahujícím ⁶⁸Ga je DOTA-TOC.

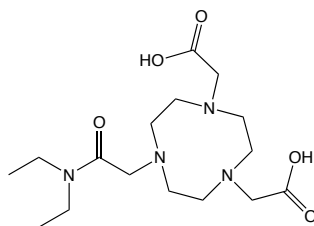


Obrázek 5: Struktura ^{68}Ga -DOTA-TOC

1.6 Cíle a motivace práce

Vývoj nových ligandů použitelných pro komplexaci iontů pro PET je intenzivně zkoumán. Pro specifickou distribuci v organismu jsou součástí nosičů radionuklidů i bioaktivní látky, které bývají napojeny na makrocyklus prostřednictvím amidické vazby. Výzkum se primárně soustředí na syntetickou a aplikační část vývoje nových radiofarmak, o nichž je publikováno mnoho článků, ale publikací poskytujících data popisující chemické vlastnosti těchto látek je minimum.

Cílem práce je syntéza monoamidu makrocyklu NOTA, protože ligandy se základním skeletem TACN poskytují ideální velikost kavity makrocyklu pro Ga^{3+} a přechodné kovy (viz. obrázek 6). Dále byly pomocí potenciometrických titrací studovány acidobazické a koordinační vlastnosti s vybranými ionty z první řady přechodných kovů.



Obrázek 6: Struktura cílového ligandu

2 Experimentální část

2.1 Použité chemikálie

Chemikálie využitá k syntéze byly získány od komerčních firem (Lach-ner, Aldrich, Fluka).

2.2 Metody charakterizace

2.2.1 Nukleární magnetická resonance (NMR)

Všechna NMR spektra byla měřena na přístrojích na PŘF UK. Spektra ^1H byla měřena na spektrometrech Varian VNMRS 300 (rezonanční frekvence: ^1H 299,9 MHz) a Bruker Avance (III) 600 (rezonanční frekvence: ^1H 600,2 MHz). Spektra ^{13}C byla měřena na přístroji Bruker Avance (III) 600 (rezonanční frekvence: ^{13}C 150,9 MHz). Spektra ^{71}Ga byla měřena na přístroji VINOVA 400 (rezonanční frekvence: ^{71}Ga 129 MHz). Měření byla prováděna ve standardních kyvetách s průměrem 5 mm v čistých deuterovaných rozpouštědlech (D_2O , CDCl_3) při teplotě 25°C . Chemické posuny jsou udávány v ppm a jsou zaokrouhleny na dvě desetinná místa.

2.2.2 Hmotnostní spektrometrie (MS)

Hmotnostní spektra byla měřena na spektrometru Bruker ESQUIRE 3000 s iontovým zdrojem ESI (electrospray ionization) a s IT detekcí (ion trap) hmotnostních fragmentů. Spektra charakterizovaných látek byla měřena v pozitivním (+) a negativním (-) módu. Jsou uvedené pouze intenzivní signály, které se podařilo interpretovat.

2.2.3 Chromatografie na tenké vrstvě (TLC)

Tenkovrstevná chromatografie byla prováděna na hliníkových destičkách pokrytých vrstvou stacionární fáze (silicagel nebo alumina), která byla impregnována fluorescenčním barvivem (Merck 1,0554 F₂₅₄).

Detekční činidla:

Dragendorffovo činidlo (roztok A: 1,7 g $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ve 100 ml směsi $\text{H}_2\text{O}:\text{AcOH}$ (80:20); roztok B: 40,0 g KI ve 100 ml H_2O ; smíseno 5 ml roztoku A, 5 ml roztoku B, 20 ml koncentrované AcOH, 70 ml H_2O)

AMC (0,5 g $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$, 12,0 g $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 250 ml 10% H_2SO_4)

2.2.4 Elementární analýza

Elementární analýza byla měřena na pracovišti Helmholtz-Zentrum Dresden Rossendorf. Výsledky jsou uvedeny v charakterizaci ve formě: „teoretická hodnota“ („stanovená hodnota“) jako hmotnostní procenta.

2.2.5 Potenciometrická titrace

Všechny titrace byly prováděny v cele, která byla termostatovaná na konstantní teplotu $25 \pm 0,1^\circ\text{C}$. Konstantní iontová síla byla zajištěna pomocí $I(\text{NMe}_4\text{Cl}) = 0,1 \text{ M}$. Titrace probíhaly v rozmezí pH cca 1,4 – 12 a v inertní atmosféře, které bylo dosaženo zavedením proudu argonu nad titrovaný roztok. Počáteční objem byl vždy $\sim 5 \text{ ml}$ při koncentraci $\sim 0,004 \text{ M}$ titrovaného ligandu nebo v poměru ligandu s kovem 1:1. Titračním roztokem byl $\text{NMe}_4\text{OH} \sim 0,3 \text{ M}$ přesně. Potenciál roztoku byl měřen skleněnou kombinovanou argenchloridovou elektrodou GK 240B na pH metru PHM 240. Roztok titračního činidla byl přidáván automatickou byretou ABU 900 o objemu 2 ml. Titrace každého systému byla opakována třikrát až čtyřikrát. Počet bodů v titračním měření byl mezi 40 – 60 v závislosti na nastavení titrace. Z naměřených experimentálních dat byly za pomoci programu OPIUM získány protonizační konstanty titrovaného ligandu a konstanty stability jednotlivých systémů kov:ligand. Tento program využívá k prokládání experimentálních bodů křivkou tzv. funkci nelineární regrese s matematicko-statistickou metodou nejmenších čtverců. Parametry elektrody byly zjišťovány experimentálně použitím kalibrační titrace za využití funkce:

$$E = E_0 + S \cdot \log[\text{H}^+] + J_A \cdot [\text{H}^+] + J_B \cdot K_w / [\text{H}^+],$$

kde E_0 je standardní elektrodový potenciál, S je Nernstova směrnice, J_A a J_B jsou koeficienty popisující kyselou a bazickou chybu měřící elektrody a K_w je iontový součin vody. Jelikož jsou kalibrační parametry v čase proměnné, tak kalibrační titrace byla prováděna před každou i po každé titraci.

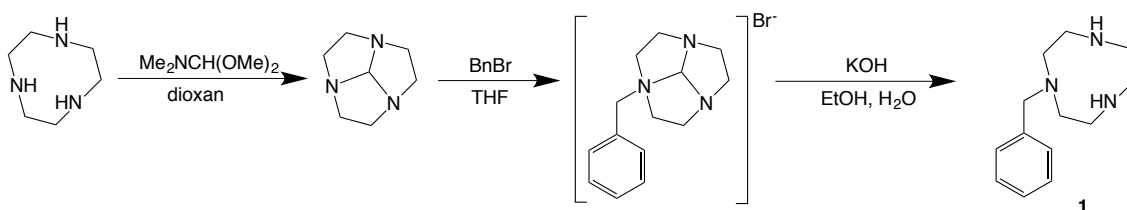
Z titrací byly programem vypočtené celkové rovnovážné konstanty stability β . Protonizační konstanta ligandů je dána vztahem $\beta_{\text{hl}} = [\text{H}_\text{h}\text{L}_\text{l}] / [\text{H}]_\text{h} \cdot [\text{L}]_\text{l}$ a konstanta stability systému kov:ligand vztahem $\beta_{\text{mhl}} = [\text{M}_\text{m}\text{H}_\text{h}\text{L}_\text{l}] / [\text{M}]_\text{m} \cdot [\text{H}]_\text{h} \cdot [\text{L}]_\text{l}$ (pro názornost nejsou uvedena nábojová čísla jednotlivých participujících částic). Vztah mezi celkovou konstantou β a konsektivní konstantou $\text{p}K_a$ je pak obecně definován jako $\text{p}K_n = \log\beta_n - \log\beta_{(n-1)}$.

Hodnota iontového součinu vody ($pK_w = 13,81$ pro $I(\text{NMe}_4\text{Cl}) = 0,1 \text{ M}$ při 25°C) a hodnoty konstant stability systémů $\text{M}^{2+}-\text{OH}^-$ byly převzaty z literatury.²⁸

2.3 Syntéza

2.3.1 1-benzyl-1,4,7-triazacyklononan (1) (BnTACN)²⁹

Produkt získán ve formě 1-benzyl-1,4,7-triazacyklononan $\cdot 3 \text{ HCl}$.



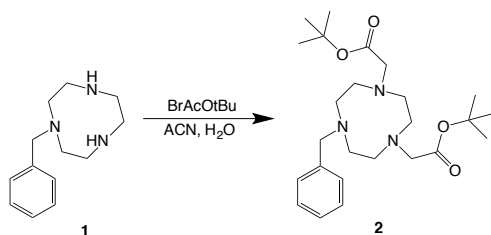
Za stálého míchání byl rozpuštěn TACN (7,7 mmol; 1,0 g) v 1,4-dioxanu (11 ml) a bylo přidáno $\text{Me}_2\text{NCH}(\text{OMe})_2$ (9,8 mmol; 1,3 ml). Směs byla refluxována 3 hodiny. Po ochlazení na laboratorní teplotu byla směs odpařena na RVO do oranžové kapaliny, která byla rozpuštěna v tetrahydrofuranu (10 ml) a pomalu byl přikapán benzylbromid (10 mmol; 1,2 ml) ve směsi s tetrahydrofuranem (30 ml). Za intenzivního míchání byla směs nechána při RT 14 hodin. Sraženina byla odfiltrována přes fritu S3 a promyta tetrahydrofuranem. Zfiltrovaná sraženina byla rozpuštěna ve směsi H_2O (10 ml), ethanolu (20 ml) a KOH (51 mmol; 2,9 g) a roztok byl refluxován pod zpětným chladičem 3 dny. Poté byl roztok odpařen na RVO, odparek rozpuštěn v H_2O (40 ml) a extrahován chloroformem (3x40 ml). Organické frakce byly spojeny a odpařeny. Odparek byl rozpuštěn v kyselině chlorovodíkové (6M; 20 ml) a směs byla odpařena dosucha. Odparek byl rozpuštěn v minimálním množství isopropanolu a pomalu převrstven diethyletherem. Stáním v chladu se vyloučila bílá sraženina, která byla zfiltrována přes fritu S3. Další podíly byly získány opakovanou krystalizací. Látka (1) byla vysušena v exikátoru nad P_2O_5 a získána ve formě bílého prášku (1) $\cdot 3 \text{ HCl}$ (1,2 g; 47 %).

Charakterizace:

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, D_2O , $\text{pD} = 1,38$) δ 7,59 – 7,36 (CH-**arom.**, m, 5H), 3,94 (N-**CH**₂-Ph, s, 2H), 3,64 (NH-**CH**₂-**CH**₂-NH, s, 4H), 3,27 – 3,21 (**CH**₂-**CH**₂-N-Bn, m, 4H), 3,12 – 3,01 (**CH**₂-N-Bn, m, 4H).

TLC: SiO_2 (THF:MeOH: NH_3 5:1:1); detekce AMC; $R_f = 0,5$.

2.3.2 Di-*tert*-butyl 1-benzyl-1,4,7-triazacyklononan-4,7-diacetát (2)²⁹

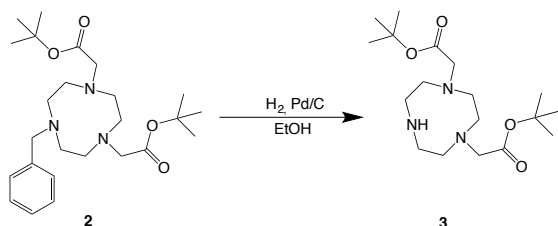


Roztok BnTACN·3 HCl (0,38 mmol; 100 mg) v NaOH (8 ml, 2M roztok) byl po 5 minutách míchání extrahován dichlormethanem (3 x 15 ml). Organická fáze byla promyta nasyceným roztokem NaCl a sušena MgSO_4 . Získaná látka byla rozpuštěna ve směsi ACN/ H_2O (4:1; 5 ml). K reakční směsi byl přidán *tert*-butylbromoacetát (0,78 mmol; 152 mg) a K_2CO_3 (0,78 mmol; 108 mg). Reakční směs byla zahřívána po dobu 12 hod na 50°C . Druhý den byla reakční směs naředěna vodou (10 ml) a extrahována dichlormethanem (3 x 15 ml). Organická fáze byla sušena MgSO_4 , filtrována, zahuštěna na RVO a dělena sloupcovou chromatografií (SiO_2 ; EtOH \Rightarrow EtOH:konc. NH_3 10:1 \Rightarrow EtOH:konc. NH_3 3:2). Látka (**2**) byla získána ve formě žlutého oleje (120 mg; 70%).

Charakterizace:

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7,69 – 7,57 + 7,32 (arom., m, 5H), 4,40 (N- CH_2 -Ph, s, 0H), 3,49 (N- CH_2 - CH_2 -N, s, 4H), 3,41 (N- CH_2 - CH_2 -N, s, 4H), 3,26 (N- CH_2 -COOtBu, s, 2H), 2,91 (N- CH_2 - CH_2 -N, s, 4H), 2,74 (N- CH_2 - CH_2 -N, s, 4H), 1,41 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$, s, 18H).

2.3.3 Di-*tert*-butyl 1,4,7-triazacyklononan-1,4-diacetát (NO_2AtBu) (**3**)²⁹



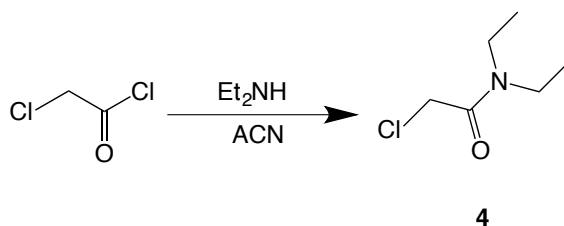
Látka (**2**) (0,13 mmol; 60 mg) byla rozpuštěna v absolutním EtOH (3,7 ml), bylo přidáno 10% Pd/C (10 mg) a směs byla míchána při 50°C po dobu 24 hodin pod vodíkovou atmosférou. Katalyzátor byl odfiltrován přes filtrační papír a roztok byl odpařen na RVO do nažloutlého oleje. Odparek byl rozpuštěn v minimálním množství

EtOH a čištění sloupcovou chromatografií (SiO₂; EtOH ⇒ EtOH:konc. NH₃ 10:1 ⇒ EtOH:konc. NH₃ 3:2). Produkt (**3**) získán ve formě nažloutlého oleje (32 mg; 73 %).

Charakterizace :

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 3,36 (N-CH₂-COOtBu s, 4H), 3,29 (N-CH₂-CH₂-NH, bs, 4H), 3,04 (N-CH₂-CH₂-NH, bs, 4H), 2,91 – 2,81 (N-CH₂-CH₂-N, bs, 4H), 1,43 (C(CH₃)₃, s, 18H).

2.3.4 2-chloro-*N,N*-diethylacetamid (**4**)



Do baňky byl navážen bezvodý Na₂CO₃ (98 mmol; 10,5 g), přilít suchý ACN (100 ml) a do této směsi byl vstříknut chloroacetylchlorid (51,4 mmol; 4,0 ml). Směs byla chlazená směsí EtOH a suchého ledu. Dále byl přikapán roztok ACN (50 ml) s Et₂NH (16 mmol; 1,6 ml) a směs byla míchána při RT 21 hodin. Na₂CO₃ byl odfiltrován filtračním papírem. Roztok byl odpařen na RVO do nažloutlé kapaliny. Kapalina byla rozpuštěna v minimálním množství dichlormethanu a dělena sloupcovou chromatografií (SiO₂; hexan:EtOAc 3:1). Frakce obsahující produkt byly spojeny a odpařeny do světle žluté kapaliny (2,18 g; 92%).

Charakterizace:

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 4,08 (Cl-CH₂, s, 2H), 3,40 (N-CH₂-C, m, , 4H), 1,25 (C-CH₃, t, ³J_{HH} = 7,1 Hz, 3H), 1,16 (C-CH₃, t, ³J_{HH} = 7,1 Hz, 3H).

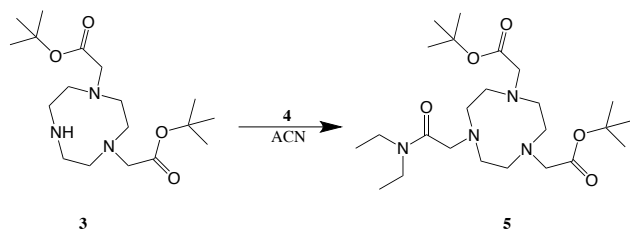
¹³C NMR (151 MHz, CDCl₃) δ 165,68 (C(O)N), 42,45 (Cl-CH₂), 41,26 (N-CH₂-CH₃), 40,58 (N-CH₂-CH₃), 14,36 (N-CH₂-CH₃), 12,63 (N-CH₂-CH₃).

TLC: SiO₂ (HEX:EtOAc 5:1); detekce AMC; R_f = 0,25

MS: (+) 171,8 [M+Na]⁺

2.3.5 Di-*tert*-butyl 7-(2-(diethylamino)-2-oxoethyl)-1,4,7-triazonan-1,4-diacetát

(5)



Do baňky byl navážen NO₂AtBu (**3**) (5,6 mmol; 2,0 g), vyžihaný K₂CO₃ (10, mmol; 0,7 g). Byl přilít suchý ACN (60 ml) a přikapána látka (**4**) (6,7 mmol; 1,0 g). Směs byla míchána při laboratorní teplotě po dobu 2 dnů a znovu byla přidána látka (**4**) (1,33 mmol; 0,2 g) a směs byla míchána 24 hodin při laboratorní teplotě. Reakční směs rozdělena sloupcovou chromatografií (Al₂O₃, hexan:EtOAc 2:1 ⇒ CH₂Cl₂:MeOH 50:1 ⇒ CH₂Cl₂:MeOH 20:1 ⇒ CH₂Cl₂:MeOH 10:1). Frakce obsahující produkt byly spojeny a odpařeny na RVO. Produkt (**5**) byl izolován ve formě oranžového oleje (2,06 g; 78 %).

Charakterizace:

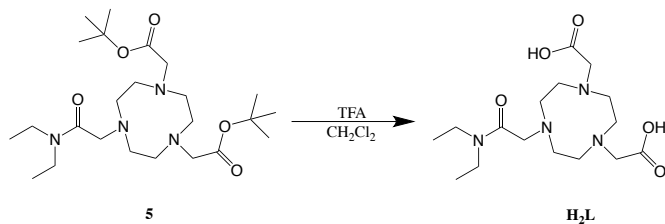
¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 3,60 – 3,53 (N-CH₂-COOtBu, m, 4H); 3,51 (N-CH₂-CON, s, 2H), 3,48 (N-CH₂-CH₃, d, ³J_{HH} = 4,8 Hz, 4H); 3,42 – 3,32 (N-CH₂-CH₂-N, m, 4H), 3,13 – 2,99 (N-CH₂-CH₂-N, m, 4H), 2,97 – 2,77 (N-CH₂-CH₂-N, m, 4H), 1,43 (C(CH₃)₃, s, 18H), 1,22 (N-CH₂-CH₃, t, ³J_{HH} = 7,1 Hz, 3H), 1,12 (N-CH₂-CH₃, t, ³J_{HH} = 7,1 Hz, 3H).

¹³C NMR (151 MHz, CDCl₃) δ 170,13 (COOtBu, s, 2C); 164,41 (C(O)N, s, C); 81,69 (C(CH₃)₃, s, 2C); 56,35 (N-CH₂-CON, s, C); 56,04 (N-CH₂-COO, s, 2C); 52,73 (N-CH₂-CH₂-N, s, 2C); 50,41 (N-CH₂-CH₂-N, s, 2C); 47,33 (N-CH₂-CH₂-N, s, 2C); 41,44 (N-CH₂-CH₃, s, C); 40,34 (N-CH₂-CH₃, s, C); 28,16 (C(CH₃)₃, s, 6C); 14,07 (C-CH₃, s, C); 12,91 (C-CH₃, s, C).

TLC: Al₂O₃ (CH₂Cl₂:MeOH 20:1), detekce Dragendorff, R_f = 0,6

MS: (+) 471,2 [M+H]⁺

2.3.6 Kyselina 7-(2-(diethylamino)-2-oxoethyl)-1,4,7-triazonan-1,4-dioctová (H₂L)



V baňce byla rozpuštěna látka (**5**) (2,06 g; 4,38 mmol) v CH₂Cl₂ (50 ml), byla přidána CF₃COOH (50 ml) a roztok byl míchán při RT 24 hodin. Roztok byl odpařen na RVO a třikrát kodedistilován s vodou. Purifikace byla prováděna na sloupci silného kationtového iontoměniče (Dowex 50; H⁺ cyklus; 100 ml; 10% pyridin ⇒ 5% NH₃). Frakce obsahující produkt byly odpařeny na RVO a opakovaně kodedistilovány s vodou. Sytě žlutohnědý olej byl rozpuštěn v malém množství vody a směs s aktivním uhlím byla zahřata nad horkovzdušnou pistolí. Po vychladnutí bylo uhlí zfiltrováno přes papír a následně skrz mikrofiltr. Voda byla odpařena na RVO a žlutý olej rozpuštěn v malém množství MeOH a převrstven Et₂O. Stáním se vyloučil bílý prášek, který byl zfiltrován na fritě S4 a promyt Et₂O. Produkt (**H₂L**) byl získán ve formě bílého prášku (1,38 g; 84 %).

Charakterizace:

¹H NMR (600 MHz, D₂O) δ 3,92 (N-CH₂-CON, s, 2H); 3,86 (N-CH₂-COO, s, 4H); 3,63 (N-CH₂-CH₂-N, s, 4H); 3,45 – 3,31 (N-CH₂-CH₂-N, m, 8H); 3,28 (N-CH₂-CH₃, s, 4H), 1,20 (CH₂-CH₃, t, ³J_{HH} = 7,0 Hz, 3H), 1,11 (CH₂-CH₃, t, ³J_{HH} = 7,0 Hz, 3H).

¹³C NMR (151 MHz, D₂O) δ 171,43 (COO, s, 2C); 170,94 (C=O-N, s, C); 58,77 (N-CH₂-COO, s, 2C); 55,81 (N-CH₂-CON, s, C); 51,83 (N-CH₂-CH₂-N, s, 2C); 50,28 (N-CH₂-CH₂-N, s, 2C); 50,04 (N-CH₂-CH₂-N, s, 2C); 41,85 (N-CH₂-CH₃, s, C); 41,48 (N-CH₂-CH₃, s, C); 12,80 (C-CH₃, s, C); 11,91 (C-CH₃, s, C).

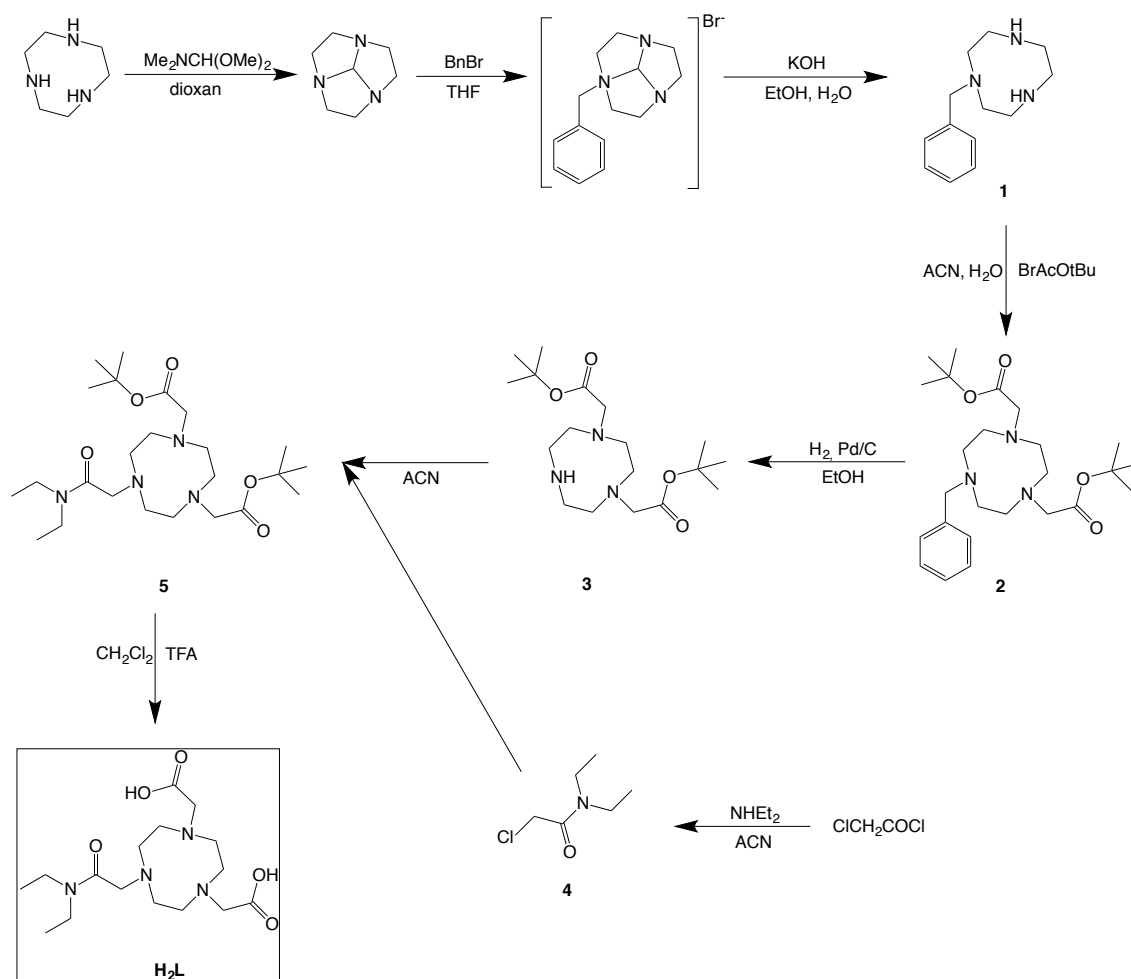
MS: (+) 359,3 [M+H]⁺

(-) 357,0 [M-H]⁻

EA: (C₁₆H₃₀N₄O₅·H₂O M_r = 376,45) C 53,61 (52,75); H 8,44 (8,51); N 15,63 (15,52); O 22,32 (23,17)

3 Diskuze

3.1 Syntéza



Obrázek 7: Celkové schéma navržené syntézy

Pro syntézu 1-benzyl-1,4,7-triazacyklononanu (**1**)²⁹ byla použita, tříkroková reakční sekvence, při které byl izolován až konečný produkt.^{29–31} Nejprve se nechal reagovat čistý TACN s *N,N*-dimethylformamid dimethylacetalem v 1,4-dioxanu. Touto reakcí vznikl methylenový můstek mezi makrocyclickými atomy dusíku, který má za úkol zajistit monoalkylaci v následném kroku.

Alkylace chráněného makrocyclyku pomocí benzyl bromidu v tetrahydrofuranu se prováděla kvůli chránění jednoho z dusíků TACNu pro pozdější alkylaci činidlem (**4**). Při reakci vznikal v roztoku nažloutlý zákal, který přešel v suspenzi. Vzniklý pevný

podíl byla kvartérní amoniová sůl, která je nerozpustná v nepolárních organických rozpouštědlech, tudíž dobře oddělitelná filtrací.

V dalším kroku se chráněný makrocyklus rozpustil ve směsi vody a ethanolu s hydroxidem draselným. Dochází k bazické hydrolyze methylenového můstku v kvartérní amoniové soli, čímž vzniká volný makrocyklus. Purifikace extrakcí do organického rozpouštědla, převedení na formu hydrochloridu a následnou krystalizací z isopropanolu převertveného Et₂O poskytovalo čistý produkt **(1)** ve formě trihydrochloridu. Výtěžek 47 % byl způsoben nejspíše množstvím reakčních kroků jdoucích přes dva intermediáty. K možnému zvýšení výtěžku by mohlo přispět prodloužení času v alkylačním kroku reakce.

V následující reakci se látka **(1)**·3 HCl míchá v roztoku hydroxidu sodného kvůli získání volné báze.^{29,31} Po extrakci dichlormethanem dochází k rozpuštění ve směsi acetonitril/voda v poměru 4:1 a alkylovaní sekundárních aminů tert-butylbromoacetátem za přítomnosti uhličitanu sodného jako báze. Směs rozpouštědel pro látku **(1)** se zvolila z důvodu nerozpustnosti látky v čistém acetonitrilu. Po čištění sloupcovou chromatografií byla látka **(2)** izolována ve formě žlutého oleje s výtěžkem 70 %.

Odštěpení chránící benzylové skupiny z látky **(2)** probíhalo v absolutním ethanolu mechanismem katalytické hydrogenace ve vodíkové atmosféře za přítomnosti 10% Pd/C jako katalyzátoru. Hydrogenací methylenu mezi fenylem a makrocyklickým dusíkem vzniká toluen, který je odpařitelný na RVO. Produkt byl i přesto purifikován sloupcovou chromatografií a byl získán ve výtěžku 73 % **(3)**.

Alkylační činidlo pro derivatizaci produktu **(3)** bylo připraveno syntézou z chloridu kyseliny chloroctové a diethylaminu reakcí v acetonitrilu. Reakce probíhá mechanismem nukleofilní substituce za přítomnosti uhličitanu sodného jako báze a byla zpočátku chlazená. Po čištění sloupcovou chromatografií byla připravena kapalná látka **(4)** ve vysokém výtěžku 92 %.

Sekundární amin látky **(3)** byl alkylován diethylamidem kyseliny chloroctové **(4)** v acetonitrilu za přítomnosti uhličitanu draselného. Stupeň konverze reakce byl sledován pomocí HPLC. Z analýzy bylo zjištěno, že v reakční směsi se po dvou dnech nacházela stále látka **(3)**, ale žádné alkylační činidlo **(4)**, a proto bylo přidáno do reakční směsi malé množství této látky pro dosažení co nejvyšší konverze.

Pro purifikaci produktu sloupcovou chromatografií byl zvolen Al_2O_3 místo SiO_2 , protože alumina poskytovala užší zónu cílové látky. Na počátku byla kolona eluována mobilní fází o nízké eluční síle (hexan:ethylacetát) pro vymytí zbytků nezreagovaného alkylačního činidla a posléze mobilní fází pro vymytí produktu (dichlormethan:methanol). Dělením byla izolována žlutá látka (**5**) ve formě oleje o celkovém výtěžku 78 %.

Konečnou reakcí bylo odštěpení tert-butylových skupin látky (**5**) rozpuštěné v dichlormethanu pomocí kyseliny trifluoroctové. Při této reakci je eliminován isobuten, který následně reaguje s kyselinou trifluoroctovou za vzniku tert-butyl trifluoracetátu. Purifikací na silném kationtovém iontoměniči se oddělili makrocyclické a nemakrocyclické látky. Dále byl produkt čištěn aktivním uhlím, protože bez zařazení tohoto kroku se nedařilo látku převést ze žlutého oleje na bílý prášek nebo krystaly. Bílý prášek byl získán po rozpuštění oleje v methanolu, pomalém převrstvení diethyletherem a stáním v lednici.

3.2 Potenciometrické titrace

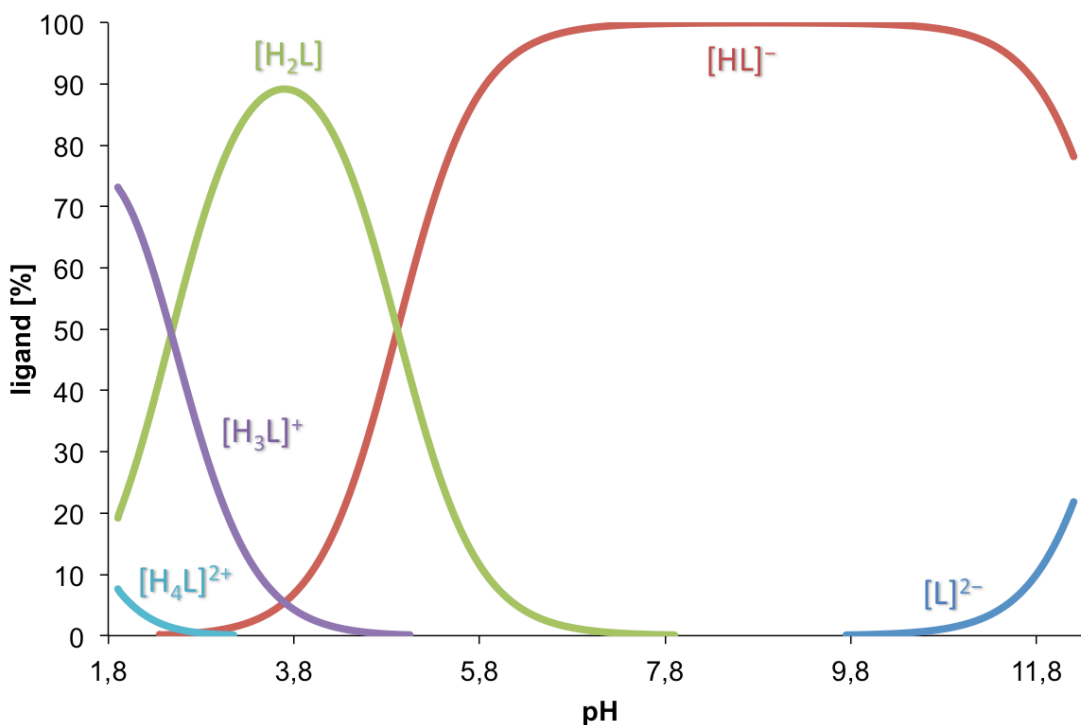
Potenciometrickou titrací byly stanoveny protonizační konstanty látky (H_2L) a konstanty stability komplexů ligandu s ionty kovů Cu^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} .

3.2.1 Acidobazické vlastnosti

Byly experimentálně stanovené čtyři protonizační konstanty studovaného ligandu (H_2L) (**Tabulka 3**). Dvě nejvyšší hodnoty $\text{p}K_a$ odpovídají protonizaci makrocyclických dusíků a dvě nejnižší jsou hodnoty protonizace dvou acetátových karboxylů. Potenciometrické měření probíhalo v rozmezí pH 1,9–12,2 (**Obrázek 8**) a na počátku titrace bylo přítomno ~10 % plně protonizované formy ligandu a více než 70 % částice $[\text{H}_3\text{L}]^+$. Dvakrát protonizovaný ligand dosahuje svého maximálního zastoupení při pH ~4 a poté klesá ve prospěch částice $[\text{HL}]^-$, která je zastoupena ve 100% v mezích pH 6–11. Na konci měření v nejbazičtější oblasti se podařilo zachytit ~20 % plně deprotonizovaného ligandu.

Při porovnání protonizačních konstant studovaného ligandu (H_2L) a ligandu H_3NOTA ³² lze sledovat trend, který ukazuje, že konstanty stability ligandu (H_2L) jsou o

jeden až tři řády nižší (**Tabulka 3**). Toto chování lze přisuzovat derivatizaci karboxylu amidovou skupinou, která významně snižuje všechny protonizační konstanty.



Obrázek 8: Distribuční diagram ligandu ($c_{\text{lig}} = c_{\text{M}} = 4 \text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$, $I = 0,1 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3} \text{ NMe}_4\text{Cl}$, $25 \text{ }^\circ\text{C}$).

Tabulka 3: Protonizační konstanty ligandu (**H₂L**) a ligandu H₃NOTA

($I = 0,1 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3} \text{ NMe}_4\text{Cl}$, $25 \text{ }^\circ\text{C}$)

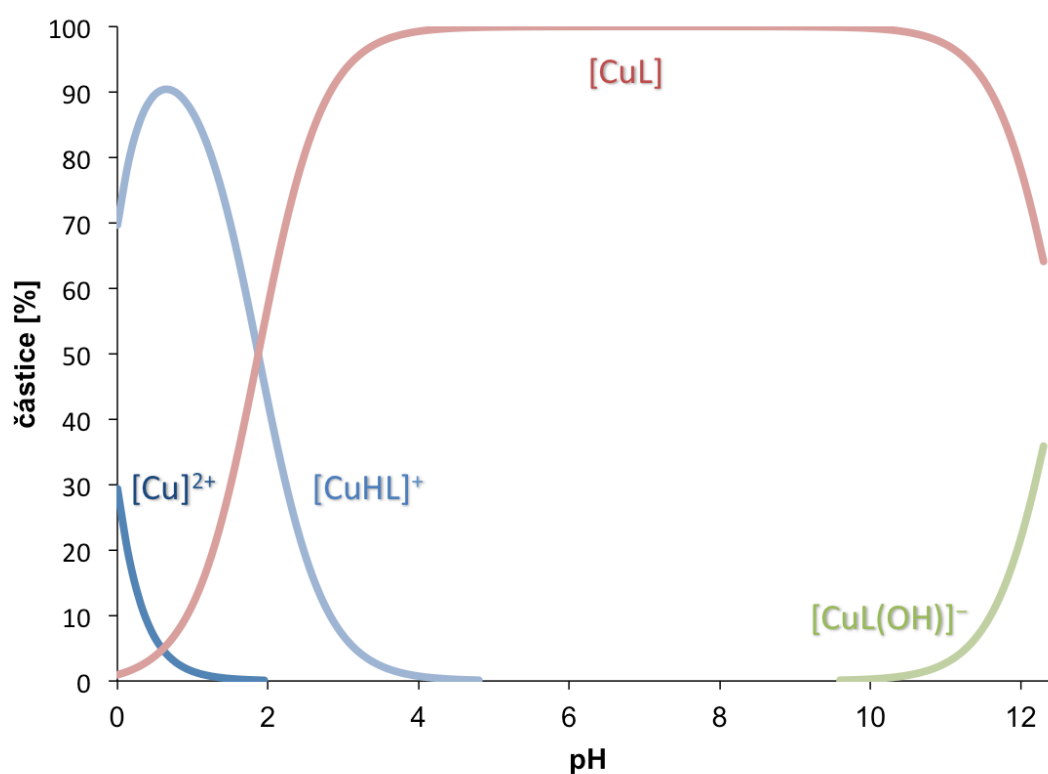
		H ₂ L		H ₃ NOTA ³²	
		logβ	pK _a	logβ	pK _a
H + L	↔ [HL]	12,75(1)	12,75	13,17	13,17
H + [HL]	↔ [H ₂ L]	17,67(2)	4,92	18,91	5,74
H + [H ₂ L]	↔ [H ₃ L]	20,15(2)	2,48	22,13	3,22
H + [H ₃ L]	↔ [H ₄ L]	21,07(3)	0,92	24,09	1,96
H + [H ₄ L]	↔ [H ₅ L]	–	–	24,87	0,78

3.2.2 Koordinační vlastnosti

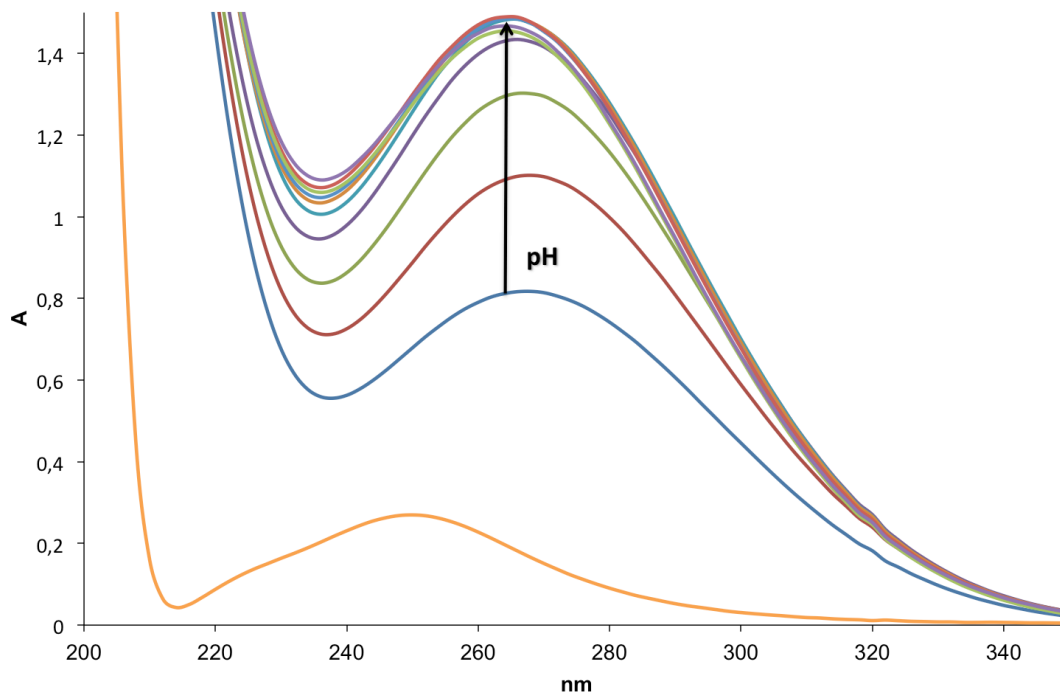
Systém Cu²⁺:H₂L byl studován v poměru 1:1 pomocí potenciometrických titrací, které probíhaly v rozmezí pH 1,5 – 12,3 (**Obrázek 9**). Po vyhodnocení potenciometrie se ukázalo, že získaná data nejsou dostačující, tudíž musela být doplněna o data ze

spektrofotometrické titrace, která probíhala v rozmezí pH 0–2 (**Obrázek 10**). Data ze spektrofotometrického měření vysvětlují chování studovaných částic ve velmi kyselé oblasti měření, protože v takto kyselém prostředí je potenciometrie neprůkazná.

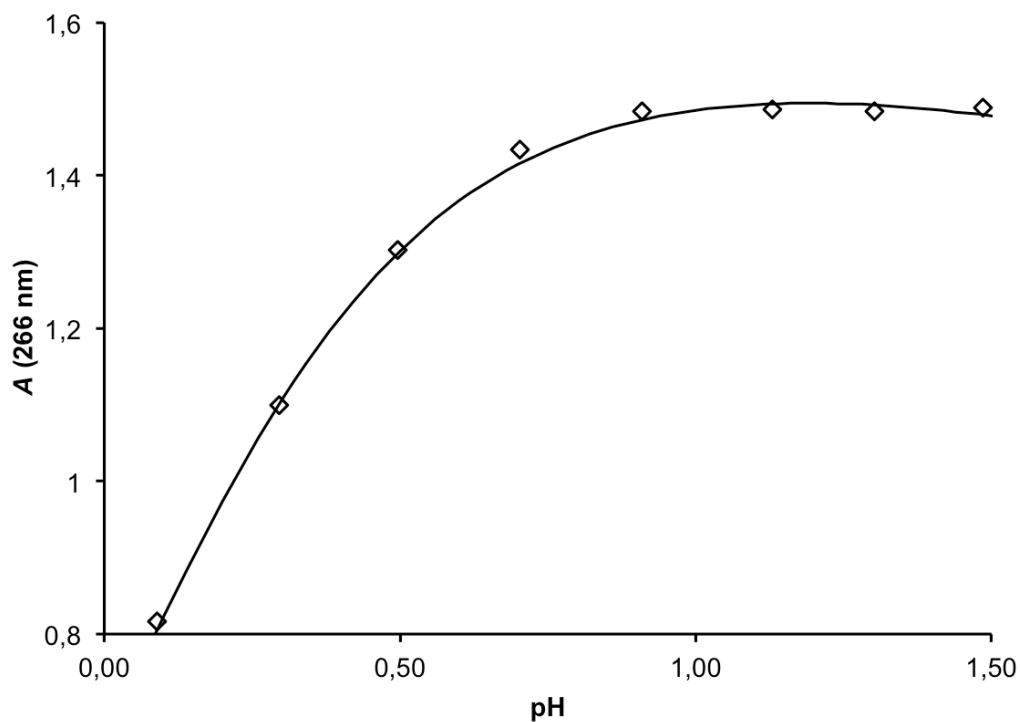
Při pH 0 je přítomno ~30 % volné mědi, která při pH 2 je už plně zakomplexována. Od pH 0 je v roztoku ~70 % protonizovaného komplexu $[\text{CuHL}]^+$, jehož maximální zastoupení je při pH ~0,6 a jeho přítomnost lze sledovat až do pH 4. Od počátku titrace se tvoří v roztoku komplex $[\text{CuL}]$, který se vyskytuje mezi pH 4–9 ve ~100% zastoupení. Pozorován byl i hydroxokomplex $[\text{CuL}(\text{OH})]^-$, který se tvoří nad pH 10.



Obrázek 9: Distribuční diagram systému $\text{Cu}^{2+}:\text{H}_2\text{L}$ ($c_{\text{lig}} = c_{\text{M}} = 4 \text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$, $I = 0,1 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3} \text{ NMe}_4\text{Cl}$, $25 \text{ }^\circ\text{C}$).

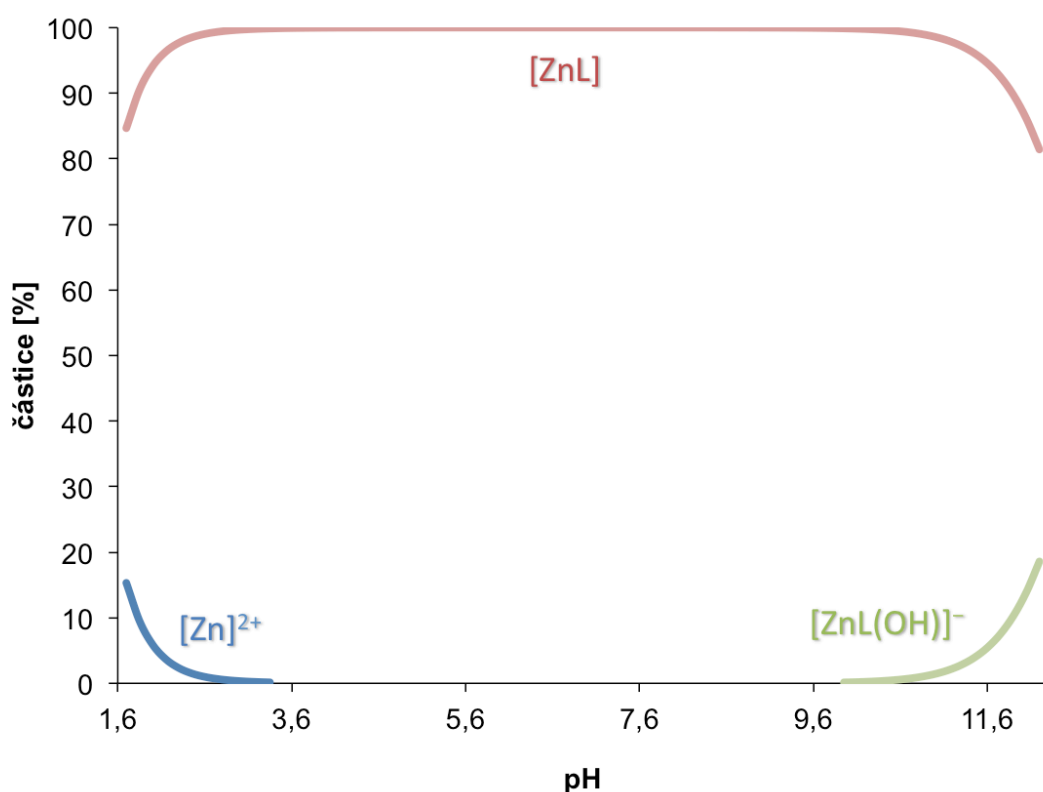


Obrázek 10a: Absorbční spektra systému $\text{Cu}^{2+}:\text{H}_2\text{L}$ v poměru 1:1 při různých pH. Oranžová křivka je absorbční spektrum Cu^{2+} iontů.

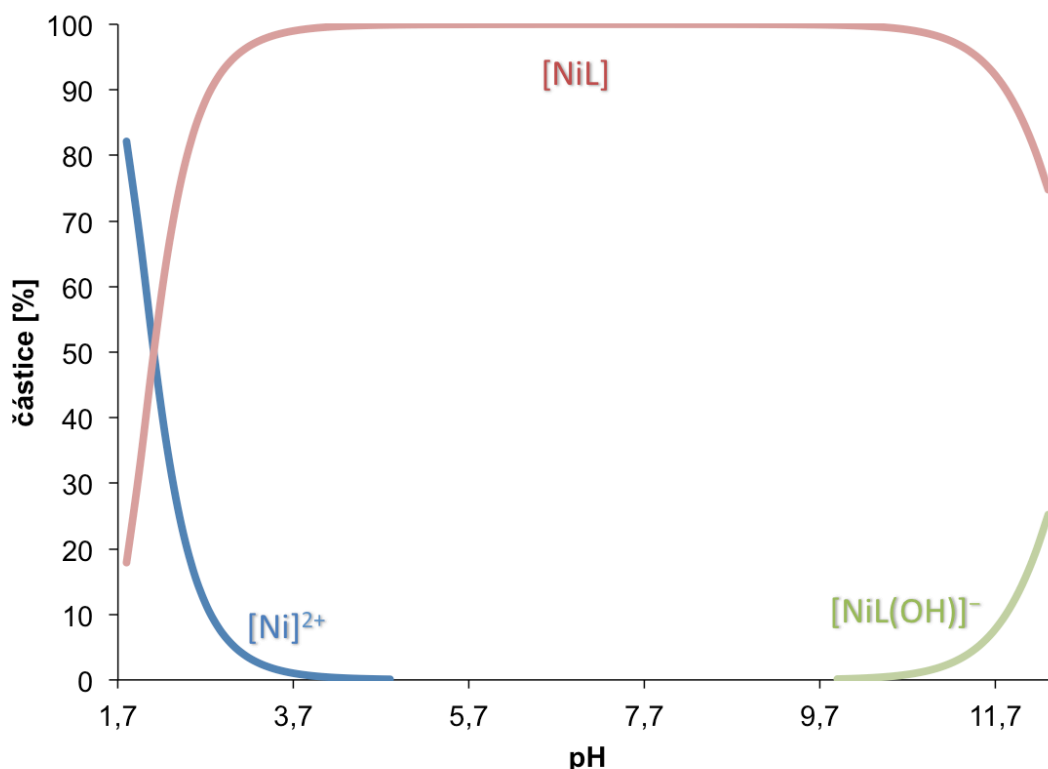


Obrázek 10b: Závislost absorbance na pH v absorbčním maximu částice $[\text{CuHL}]^+$ při vlnové délce 266 nm. Křivka je teoretické proložení dle programu Opium.

Potenciometrická měření pro titrovaný systém $\text{Zn}^{2+}:\text{H}_2\text{L}$ v poměru 1:1 probíhala v rozmezí pH 1,7–12,2 (**Obrázek 11**). Na začátku titrace se v roztoku vyskytovalo ~85 % zakomplexovaných Zn^{2+} iontů a už od pH 3,5 se v roztoku vyskytuje pouze částice $[\text{ZnL}]$, která od pH ~10 ubývá na úkor $[\text{ZnL}(\text{OH})]^-$. Titrace systému $\text{Ni}^{2+}:\text{H}_2\text{L}$ v poměru 1:1 probíhala od pH 1,8–12,3 (**Obrázek 12**) a tento systém je obdobný jako $\text{Zn}^{2+}:\text{H}_2\text{L}$, akorát na počátku titrace se nacházelo ~85 % nezakomplexovaného kovu, který při pH 5 vymizí ve prospěch částice $[\text{NiL}]$, jejíž množství se od pH ~10 snižuje a stejně jako u Zn^{2+} se utváří hydroxokomplex $[\text{NiL}(\text{OH})]^-$.



Obrázek 11: Distribuční diagram systému $\text{Zn}^{2+}:\text{H}_2\text{L}$ ($c_{\text{lig}} = c_{\text{M}} = 4 \text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$, $I = 0,1 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3} \text{ NMe}_4\text{Cl}$, $25 \text{ }^\circ\text{C}$).



Obrázek 12: Distribuční diagram systému $\text{Ni}^{2+}:\text{H}_2\text{L}$ ($c_{\text{lig}} = c_{\text{M}} = 4 \text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$, $I = 0,1 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3} \text{ NMe}_4\text{Cl}$, $25 \text{ }^\circ\text{C}$).

Nalezené konstanty stability jednotlivých systémů s vybranými ionty kovů (**Tabulka 4**) splňují Irving–Williamsovu řadu, která ukazuje, že měďnaté komplexy by měly být stabilnější než komplexy zinečnaté a nikelnaté se stejným ligandem. Stabilita komplexů ligandu **H₂L** byla v porovnání s ligandem **H₃NOTA** vždy nižší, v některých případech i o několik řádů (**Tabulka 5**).

Spektrofotometrické měření prokázalo, že měďnaté ionty jako jediné tvoří se zkoumaným ligandem (**H₂L**) jednou protonizovaný komplex $[\text{CuHL}]^+$. Důvodem je elektronová konfigurace Cu^{2+} iontů, které mají elektronovou konfiguraci d^9 . Tato konfigurace ve svých koordinačních sloučeninách vykazuje silnou Jahn-Tellerovskou distorzi, která zapříčiňuje slabší vazbu mezi centrálním atomem a ligandy v axiální poloze. Zde probíhá kompetice mezi protonem a centrálním atomem o ligand v axiální poloze. Kvůli slabší vazbě je protonizace ligandu snazší a tím dochází pravděpodobně k dekomplexaci pendantního ramene. Nejsnadněji podléhá tomuto ataku rameno derivatizované amidickou vazbou, které však není protonizovatelné, a proto tvoří **H₂L** pouze monoprotizovaný komplex. Toto chování se stejně uplatňuje u ligandu

H₃NOTA. Tvorbu protonizovaných komplexů nevykazují Zn²⁺ ani Ni²⁺, protože tyto ionty tvoří s H₂L a H₃NOTA pravidelný oktaedr, který má všechna ramena vázaná stejně silně, takže atakující proton je v tomto případě značně znevýhodněn.

Tabulka 4: Konstanty stability komplexů kovů s ligandem H₂L (*I* = 0,1 mol·dm⁻³ NMe₄Cl, 25 °C).

	Cu ²⁺ logβ	Zn ²⁺ logβ	Ni ²⁺ logβ
[ML]	22,55(2)	19,13(3)	16,70(1)
[MHL]	24,42(1)	–	–
[ML(OH)]	10,00(4)	6,29(4)	3,93(3)

Tabulka 5: Srovnání konstant stability a protonizačních konstant komplexů ligandů H₂L a H₃NOTA s vybranými ionty kovů³³

	Cu ²⁺		Zn ²⁺		Ni ²⁺	
	logK		logK		logK	
	H ₂ L	H ₃ NOTA	H ₂ L	H ₃ NOTA	H ₂ L	H ₃ NOTA
M + L ↔ [ML]	22,55	23,33	19,13	22,32	16,7	19,24
M + [HL] ↔ [MHL]	1,87	2,65	–	–	–	–
H + [MHL] ↔ [MH ₂ L]	–	1,04	–	–	–	–
H ₂ O + [ML] ↔ [ML(OH)] + H	12,55	12,15	12,84	12,66	12,77	12,29

3.2.3 Stabilita ligandu

Stabilita ligandu byla studována pomocí ¹H NMR. Byla očekávána hydrolyza amidické skupiny. Hydrolyza byla sledována vznikem charakteristických ethylových signálů (kvartet CH₂ a triplet CH₃ skupin) na NMR spektru. Ligand byl ponechán v prostředí 1M HCl a v 1M CsOH při laboratorní a při teplotě 85°C a byly sledovány změny.

V kyselém prostředí při laboratorní teplotě byl ligand stabilní, ale při teplotě 85°C byly sledovány první známky rozkladu už po 24 hodinách od počátku měření. Po týdnu měření bylo rozloženo ~10 % výchozího množství ligandu. V bazickém prostředí probíhala hydrolyza podstatně rychleji. Při laboratorní teplotě téměř neprobíhala, ale při

85°C bylo po 24 hodinách zhydrolyzováno přibližně 25 % a po týdnu podleho hydrolyze přibližně 75 % ligandu.

Sledována byla stabilita zkoumaného ligandu s Ga^{3+} pomocí ^{71}Ga NMR spektroskopie zejména v bazickém pH, kvůli potenciální hydrolyze amidické skupiny. Trojmocné galium má malý iontový poloměr a vysokou nábojovou koncentraci. Kvůli koordinaci amidického kyslíku dojde ke snížení elektronové hustoty na uhlíku s amidickou vazbou. Díky tomu je amidická vazba daleko náchylnější vůči nukleofilnímu ataku ze strany hydroxidového ionu. ^{71}Ga má kvadrupólové jádro se spinem 3/2. Ligand H_3NOTA tvoří symetrické koordinační okolí a poskytuje tak charakteristický ostrý signál při $\delta_{\text{Ga}} = 170 \text{ ppm}$.²⁹ Pokud je však jádro galia vázáno v nesymetrickém koordinačním okolí, tak dochází k výraznému rozšíření signálu, který se může i zcela ztratit v šumu. To je právě případ studovaného ligandu. V rozmezí pH 7,5–10,2 nebyl pozorován žádný signál v ^{71}Ga NMR spektru. Ale z nepřímých důkazů usuzují, že komplex $[\text{GaL}]^+$ byl kvantitativně vytvořen. Důkazem pro toto tvrzení je, že nezakomplexované galité ionty by se musely vysrážet ve formě hydroxidu galitého. Žádná sraženina však v roztoku pozorována nebyla. Měření při pH 10,2 po 12 hodinovém stání při laboratorní teplotě poskytlo ostrý signál odpovídající právě komplexu $[\text{GaNOTA}]$, z čehož lze usuzovat, že po komplexaci galitých iontů je ligand H_2L hydrolyzován v místě amidické vazby i při laboratorní teplotě. V méně bazickém prostředí, konkrétně pH 7,5 a 8,5, nebyla hydrolyza pozorována.

4 Závěr

Byl připraven ligand H_2L (*N,N*-diethylamid NOTA). Byly stanoveny protonizační konstanty ligandu a konstanty stability s kovy Cu^{2+} , Ni^{2+} a Zn^{2+} . Ligand vykazuje nižší bazicitu i konstanty stability v porovnání s H_3NOTA . Zahříváním v silně bazickém prostředí se hydrolyzuje amidická vazba. Koordinací Ga^{3+} se tato vazba ještě více oslabuje, tudíž konstanty stability nebylo možno stanovit.

5 Literatura

- (1) American Cancer Society. Cancer Facts & Figures 2015
<http://www.cancer.org/acs/groups/content/@editorial/documents/document/acspc-044552.pdf>.
- (2) What is Radiology? <http://www.news-medical.net/health/What-is-radiology.aspx>.
- (3) SPECT <http://www.centerformolecularimaging.org/lisaif/our-services/spect/>.
- (4) Boyd, R. E. Technetium-99m Generators-The Available Options. *Int. J. Appl. Radiat. Isot.* **1982**, 33 (10), 801–809.
- (5) Levin, C. S. Primer on Molecular Imaging Technology. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2005**, 32 (SUPPL. 2), 325–345.
- (6) Pashentsev, V. N. Production of Radionuclides for Cyclotron Positron-Emission Tomography. *At. Energy* **2015**, 118 (6), 405–409.
- (7) Positron emission tomography
<http://www.centerformolecularimaging.org/lisaif/our-services/pet/>.
- (8) Basu, S.; Kwee, T. C.; Surti, S.; Akin, E. A.; Yoo, D.; Alavi, A. Fundamentals of PET and PET/CT Imaging. *Ann N Y Acad Sci* **2011**, 1228, 1–18.
- (9) Vander Heiden, M. G.; Cantley, L. C.; Thompson, C. B. Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation. *Science* **2009**, 324 (5930), 1029–1033.
- (10) Chen, K.; Conti, P. S. Target-Specific Delivery of Peptide-Based Probes for PET Imaging. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2010**, 62 (11), 1005–1022.
- (11) Shetty, D.; Lee, Y. S.; Jeong, J. M. ⁶⁸Ga-Labeled Radiopharmaceuticals for Positron Emission Tomography. *Nucl. Med. Mol. Imaging* **2010**, 44 (4), 233–240.
- (12) van der Veldt, A. A. M.; Smit, E. F.; Lammertsma, A. A. Positron Emission Tomography as a Method for Measuring Drug Delivery to Tumors in Vivo: The Example of [(11)C]docetaxel. *Front. Oncol.* **2013**, 3, 208.

- (13) Dahl, J. R.; Tilbury, R. S. The Use of a Compact, Multi-Particle Cyclotron for the Production of ^{52}Fe , ^{67}Ga , ^{111}In and ^{123}I for Medical Purposes. *Int. J. Appl. Radiat. Isot.* **1972**, *23* (9), 431–437.
- (14) Holub, J. Komplexy gallia pro molekulární zobrazování kostní tkáně, Univerzita Karlova v Praze: Praha, 2011.
- (15) Anderson, C. J.; Ferdani, R. Copper-64 Radiopharmaceuticals for PET Imaging of Cancer: Advances in Preclinical and Clinical Research. *Cancer Biother. Radiopharm.* **2009**, *24* (4), 379–393.
- (16) Gallium <http://www.rsc.org/periodic-table/element/31/gallium>.
- (17) Berry, D. J.; Ma, Y.; Ballinger, J. R.; Tavaré, R.; Koers, A.; Sunassee, K.; Zhou, T.; Nawaz, S.; Mullen, G. E. D.; Hider, R. C.; et al. Efficient Bifunctional Gallium-68 Chelators for Positron Emission Tomography: Tris(hydroxypyridinone) Ligands. *Chem. Commun.* **2011**, *47* (25), 7068–7070.
- (18) Liu, S. The Role of Coordination Chemistry in the Development of Target-Specific Radiopharmaceuticals. *Chem. Soc. Rev.* **2004**, *33* (7), 445–461.
- (19) Wadas, T. J.; Wong, E. H.; Weisman, G. R.; Anderson, C. J. Coordinating Radiometals of Copper, Gallium, Indium, Yttrium, and Zirconium for PET and SPECT Imaging of Disease. *Chem. Rev.* **2010**, *110* (5), 2858–2902.
- (20) Housecroft, C.; Sharpe, A. G. *Inorganic Chemistry*; University Science Books: Sausalito, 2008.
- (21) Velikyan, I. Prospective of ^{68}Ga -Radiopharmaceutical Development. *Theranostics* **2014**, *4* (1), 47–80.
- (22) Velikyan, I.; Maecke, H.; Langstrom, B. Convenient Preparation of Temperature Ga-Based PET-Radiopharmaceuticals at Room. *Bioconjug. Chem.* **2008**, *19* (2), 569–573.
- (23) Liu, S. Radiolabeled Cyclic RGD Peptides as Integrin $\alpha_v\beta_3$ -Targeted Radiotracers: Maximizing Binding Affinity via Bivalency. *Bioconjug. Chem.* **2009**, *20* (12), 2199–2213.
- (24) Paeng, J. C.; Lee, Y.-S.; Lee, J. S.; Jeong, J. M.; Kim, K.-B.; Chung, J.-K.; Lee,

- D. S. Feasibility and Kinetic Characteristics of (68)Ga-NOTA-RGD PET for in Vivo Atherosclerosis Imaging. *Ann. Nucl. Med.* **2013**, *27* (9), 847–854.
- (25) Israel, I.; Richter, D.; Stritzker, J.; Ooschot, M.; Donat, U.; Buck, A.; Samnick, S. PET Imaging with [⁶⁸Ga]NOTA-RGD for Prostate Cancer: A Comparative Study with [¹⁸F]Fluorodeoxyglucose and [¹⁸F]Fluoroethylcholine. *Curr. Cancer Drug Targets* **2014**, *14* (4), 371–379.
- (26) Šimeček, J.; Schulz, M.; Notni, J.; Plutnar, J.; Kubíček, V.; Havlíčková, J.; Hermann, P. Complexation of Metal Ions with TRAP (1,4,7-Triazacyclononane Phosphinic Acid) Ligands and 1,4,7-Triazacyclononane-1,4,7-Triacetic Acid: Phosphinate-Containing Ligands as Unique Chelators for Trivalent Gallium. *Inorg. Chem.* **2012**, *51* (1), 577–590.
- (27) Li, Z.; Conti, P. S. Radiopharmaceutical Chemistry for Positron Emission Tomography. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2010**, *62* (11), 1031–1051.
- (28) Jurinak, J. J. The Hydrolysis of Cations. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **1976**, *40* (3), vi.
- (29) Holub, J.; Meckel, M.; Kubíček, V.; Rösch, F.; Hermann, P. Gallium(III) Complexes of NOTA-bis(phosphonate) Conjugates as PET Radiotracers for Bone Imaging. *Contrast Media Mol. Imaging* **2015**, *10* (2), 122–134.
- (30) Kang, J.; Jo, J. H. The Synthesis of 1,4,7-Triazacyclononane Conjugated Amyloid-Phillic Compound and Its Binding Affinity to the β -Amyloid Fibril. *Bull. Korean. Chem. Soc* **2003**, *24* (9), 1403–1406.
- (31) Regueiro-Figueroa, M.; Gündüz, S.; Patinec, V.; Logothetis, N. K.; Esteban-Gómez, D.; Tripier, R.; Angelovski, G.; Platas-Iglesias, C. Gd³⁺-Based Magnetic Resonance Imaging Contrast Agent Responsive to Zn²⁺. *Inorg. Chem.* **2015**, *54*, 10342–10350.
- (32) Drahoš, B.; Kubíček, V.; Bonnet, C. S.; Hermann, P.; Lukeš, I.; Tóth, É. Dissociation Kinetics of Mn²⁺ Complexes of NOTA and DOTA. *Dalton Trans.* **2011**, *40* (9), 1945–1951.
- (33) Kubíček, V.; Hermann, P. Nепublikované Výsledky.

Poděkování

V první řadě bych rád poděkoval Vojtovi za bezvadné vedení mé práce. Jsem velmi vděčný za nespočet rad, připomínek, za čas věnovaný mé práci při konzultacích a za pomoc při řešení nesnází, které při tvorbě této práce nastaly.

Můj velký dík patří osazenstvu laboratoře, ve které práce vznikala, za velmi příjemné pracovní prostředí a za ochotu každého z vás mi kdykoliv a s čímkoliv pomoci.

Děkuji Mariovi B., který mě jako první uvedl do problematiky práce v laboratoři a položil skvělé základy pro mou budoucí práci. Chtěl bych poděkovat i Soně P., která byla mým prvním záchytným bodem při socializaci v novém prostředí.

Děkuji Martinu Kamlarovi za čas, který se mnou strávil u konzultací, NMR spekter a veškerou pomoc, kterou mi v průběhu vzniku této práce poskytl. Děkuji za trpělivost, nesmírně si jí vážím.

Děkuji panu Prof. Petru Hermanovi a Sandrovi za podnětné rady při práci a za velmi inspirativní přístup v oblasti chemie a práce v laboratoři.

Rád bych poděkoval i Honzovi B., Ondrovi Z. a Sandrovi za měření NMR a MS spekter.

Velké poděkování si zaslouží i Zuzka Böhmová, která mě provedla světem potenciometrie.

Velké poděkování si zaslouží rodina Klofáčova za poskytnutí příjemného zázemí během studia.

Na závěr děkuji své rodině a přítelkyni za bezmeznou psychickou a finanční podporu, kterou mi poskytovali po dobu mého studia.