

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

DIPLOMOVÁ PRÁCE



Eliška Hacaperková

Ligandové systémy pro komplexaci zirkonia

Katedra anorganické chemie

Vedoucí diplomové práce: doc. RNDr. Vojtěch Kubíček, Ph.D.

Studijní program: Chemie

Studijní obor: Anorganická chemie

Praha 2016

Ráda bych poděkovala všem, kteří mi pomáhali při práci na mých projektech. Děkuji svému školiteli Vojtovi za vedení této práce a pomoc a podporu při úspěších i neúspěších. Velký dík patří také Petrovi za mnohé a mnohé odborné rady a nápady při syntéze.

Sandrovi děkuji za trpělivost, veškerý čas, který mi věnoval a vůbec za vše, co jsem se od něj naučila. Děkuju také Martinovi a Mírovi za ochotu kdykoli mi poradit a pomoci. Za měření MS a NMR spekter děkuji Ondrovi s Honzou.

Na závěr nemohu nezmínit celý kolektiv laboratoře 19 (včetně Tweetyho) a vyjádřit veliký dík za vytvoření toho nejpřátelštějšího prostředí, jaké je snad možné.

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

V Praze dne 16. 5. 2016

Podpis autora

Název práce: Ligandové systémy pro komplexaci zirkonia
Autor: Eliška Hacaperková
Katedra: Katedra anorganické chemie
Vedoucí diplomové práce: doc. RNDr. Vojtěch Kubíček, Ph.D.

Abstrakt: Cílem této diplomové práce byla příprava makrocyclických ligandů pro komplexaci kationtů Zr^{4+} z hlediska jejich potenciálního využití jako kontrastní látky v pozitronově emisní tomografii. Byly navrženy ligandy **L1**, **L2** a **L3** s HOPO, maltolovými a hydroxamátovými pendantními rameny. Pokusy o přípravu **L1** a **L2** byly neúspěšné. Ligand **L3** byl připraven a potenciometrickou titrací byly určeny jeho protonizační konstanty. Také byly zkoumány komplexy $[Zr^{4+}(\mathbf{L3})]$. Dále byl připraven katecholový ligand **L4** a zkoumány jeho koordinační sloučeniny s ionty Zn^{2+} , Ga^{3+} a Zr^{4+} .

Klíčová slova: zirkonium, *immuno*-PET, ligand, cyklen

Title: Ligand systems for zirconium complexation
Author: Eliška Hacaperková
Department: Department of Inorganic Chemistry
Supervisor: doc. RNDr. Vojtěch Kubíček, Ph.D.

Abstract: The aim of this thesis is to synthesize new kind of macrocyclic ligands for complexation of Zr^{4+} . Zirconium(IV) complexes have potential as contrast agents in *immuno*-PET. Three macrocyclic ligands **L1**, **L2** and **L3** with different pendant arms (HOPO, maltol, hydroxamate) were designed. Despite numerous attempts syntheses of **L1** and **L2** were unsuccessful. Ligand **L3** was synthesized and the protonation constants were determined by potentiometric titration. Complexes $[Zr^{4+}(\mathbf{L3})]$ were studied too. Catechol ligand **L4** was prepared and complexes with cations Zn^{2+} , Ga^{3+} and Zr^{4+} were investigated.

Keywords: zirconium, *immuno*-PET, ligand, cyclen

Obsah

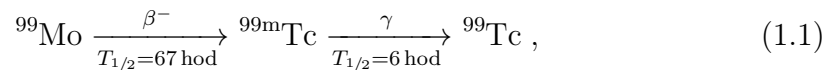
1	Úvod	2
1.1	Molekulární zobrazování	2
1.2	<i>Immuno</i> -PET	3
1.2.1	Vhodné pozitronové zářiče pro <i>immuno</i> -PET	4
1.3	Radioizotop ^{89}Zr	5
1.4	Koordinační sloučeniny zirkonia	6
1.4.1	Hydroxamátové ligandy	7
1.4.2	Nové ligandové systémy pro kationt $^{89}\text{Zr}^{4+}$	11
2	Cíl práce	17
3	Experimentální část	18
3.1	Seznam použitých chemikálií	18
3.2	Metody detekce a charakterizace	18
3.3	Pokusy o přípravu L1	22
3.3.1	Příprava látky 2	22
3.3.2	Příprava látky 3	22
3.3.3	Příprava látky 4	23
3.4	Pokusy o přípravu L2	24
3.4.1	Příprava látky 7	24
3.4.2	Příprava látky 8	24
3.5	Příprava L3	26
3.5.1	Příprava látky 12	26
3.5.2	Příprava látky 13	27
3.5.3	Příprava látky L3	27
3.6	Příprava L4	29
3.6.1	Příprava látky 16	29
3.6.2	Příprava látky L4	29
3.6.3	Příprava komplexů $[\text{Zr}^{4+}(\text{L4})]$, $[\text{Ga}^{3+}(\text{L4})]$ a $[\text{Zn}^{2+}(\text{L4})]$	30
4	Diskuze výsledků	31
4.1	Pokusy o přípravu HOPO ligandu	31
4.2	Pokusy o přípravu maltolového ligandu	33
4.3	Příprava hydroxamátového ligandu a studium komplexu $[\text{Zr}^{4+}(\text{L3})]$	36
4.4	Příprava katecholového ligandu a jeho komplexů	46
5	Závěr	49
6	Seznam zkratk	50

1. Úvod

1.1 Molekulární zobrazování

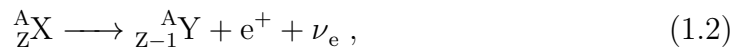
Molekulární zobrazování je soubor neinvazivních zobrazovacích metod v diagnostické medicíně. Mezi nejčastější metody patří magnetická rezonance (MRI), počítačová tomografie (CT), jednofotonová emisní tomografie (SPECT) a pozitronová emisní tomografie (PET). Poslední dvě zmiňované spadají do radiomedicínského odvětví. Pro každý typ z těchto vyšetřovacích metod je potřeba jiného zdroje záření.

SPECT využívá γ -jaderného rozpadu nestabilních izotopů, při kterém dochází k uvolnění energie ve formě γ -záření. Scintilační kamery toto záření o přesně dané energii detekují a pomocí příslušného softwaru je následně vytvořen 2D či 3D snímek (v závislosti na použitém zařízení). Nejčastěji používaný radionuklid pro tuto metodu je izotop ^{99m}Tc . Ten vzniká reakcí z mateřského jádra ^{99}Mo β^- -rozpadem a sám přechází na izotop ^{99}Tc [1]. Děj se dá shrnout reakcí



kde $T_{1/2}$ značí poločas rozpadu.

PET oproti SPECT využívá jader nestabilních izotopů, které se přeměňují pomocí β^+ -rozpadu. Tyto izotopy, tzv. β^+ -zářiče produkují pozitrony. Tento rozpad lze zapsat následující obecnou reakcí



kde ^A_ZX je zanikající izotop, $^A_{Z-1}\text{Y}$ izotop vznikající, e^+ značí pozitron a ν_e elektronové neutrino. Samotná jaderná přeměna je dána reakcí

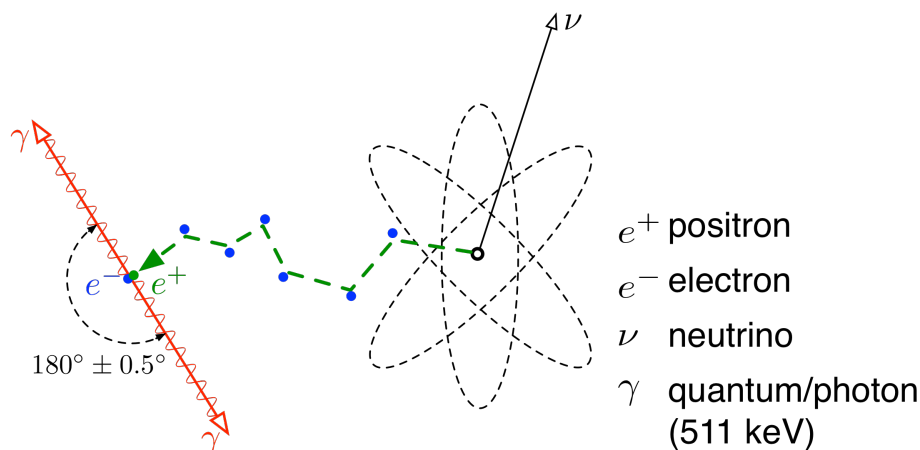


^1_1p je rozpadající se proton a ^1_0n vzniklý neutron.

Poté, co vyzářený pozitron ztratí část své energie srážkami s dalšími částicemi, anihiluje s elektronem a vznikají dva fotony o energii 511 keV. Tyto fotony vylétávají z místa anihilace vůči sobě pod úhlem 180° [2]. Schéma tohoto děje je znázorněno na obrázku 1.1.

Vhodně rozmístěné detektory mohou detekovat fotony letící v opačném směru. Následně jsou tyto signály převedeny na snímky. Za současně vzniklé fotony jsou považovány takové, které detektor zachytí v rozmezí maximálně 15 ns. Množství kinetické energie, kterou pozitron před anihilací ztratí, je úměrné střední energii těchto částic a zodpovídá za kvalitu rozlišení snímků. Čím delší dráhu pozitron urazí od místa svého vzniku (jádro β^+ -zářiče), tím nepřesnější je následné určení místa polohy pozorované látky [3].

V současné době je v lékařství pro PET nejhojněji používán izotop fluoru ^{18}F s poločasem rozpadu necelé dvě hodiny ($T_{1/2} = 109,8 \text{ min}$) [5, 6]. Největší využití nachází derivát glukózy 2- ^{18}F fluoro-2-deoxyglukóze (^{18}F -FDG). Tento relativně krátký poločas rozpadu přináší jak výhody, tak nevýhody. Výhodou je rychlý zánik zářiče v těle pacienta a snímání lze provádět krátce po podání kontrastní



Obrázek 1.1: Schéma anihilace pozitronu s elektronem za vzniku dvou γ -paprsků svírajících úhel 180° . Obrázek převzat z [4].

látky. Pomocí izotopu ^{18}F ovšem nelze pozorovat dlouhodobou distribuci látek v organismu, například v řádu dní. Navíc je tato metoda tkáňově nespecifická, tudíž nelze podle odběru ^{18}F -FDG v organismu usuzovat na konkrétní typ buněk. Alternativou této nespecifické metody může být metoda *immuno*-PET [2, 6, 7, 8].

Pro usnadnění správné interpretace snímků se metoda PET často kombinuje s počítačovou tomografií (CT) nebo magnetickou rezonancí (MRI). V dnešní době je více jak 90 % všech PET scannerů typu PET/CT. Zařízení pro PET/MRI je hardwarově mnohem náročnější, protože potřebné silné magnetické pole omezuje možnost používaných elektronických komponent. Přesto již i takové stroje byly sestaveny [6].

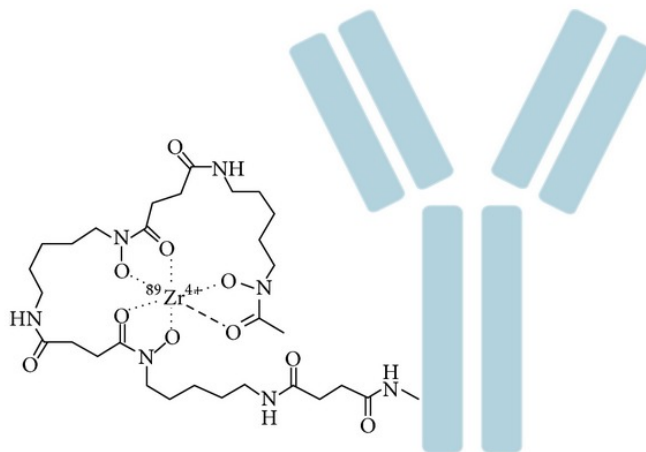
1.2 *Immuno*-PET

V posledních letech patří pozornost mimo jiné také *immuno*-pozitronové emisní tomografii (*immuno*-PET), nově se rozvíjející diagnostické metodě zlepšující charakterizaci nalezených nádorů. Tato metoda kombinuje vysokou citlivost a vysoké rozlišení PET a specifitu *monoklonálních protilátek* (mAb) [6].

Při této metodě jsou snímány β^+ -zářiče vázané na mAb, které vykazují vysokou specifitu a afinitu k tkáni určitého typu. Jejich pomocí lze značit kontrétní buňky a lokalizovat jejich výskyt. Pro jejich správnou a dostatečnou distribuci v organismu pacienta je potřeba čas v řádu dní [9]. Tato doba se označuje za *biologický poločas* a bývá většinou 2–3 dny. Jak je vidět, izotop ^{18}F s poločasem rozpadu v řádu hodin je pro toto použití naprosto nevhodný, neboť již za jeden den se rozpadne více jako 99,98 % jeho jader. Při volbě jiného vhodného β^+ -zářiče je potřeba hledat mezi jádry, jejichž poločas rozpadu je mnohem delší. V ideálním případě by se měl přibližně shodovat s biologickým poločasem použité mAb.

Diagnostické zařízení pro *immuno*-PET je totožné se zařízením pro běžná PET vyšetření [9]. Kontrastní látka bývá složená často ze tří částí: ze samotné mAb, pozitronového zářiče a spojky zajišťující navázání předchozích dvou částí dohromady do stabilní sloučeniny. Jelikož většina vhodných zářičů bývá většinou kationt kovu, je vhodnou spojkou organický ligand, který bude s kationtem tvořit

stabilní komplex a který bude současně schopný vázat se na proteinové části mAb [10]. Schématické znázornění monoklonální protilátky značené izotopem ^{89}Zr s ligandem desferrioxaminem B je na obrázku 1.2. K podání kontrastní látky dochází nitrožilně. Snímání bývá provedeno 2–3 dny od tohoto okamžiku.



Obrázek 1.2: Schématické znázornění monoklonální protilátky značené izotopem ^{89}Zr s ligandem desferrioxaminem B. Obrázek převzat z [10].

1.2.1 Vhodné pozitronové zářiče pro *immuno*-PET

Aby byl pozitronový zářič vhodný pro použití v *immuno*-PET, musí splňovat několik požadavků. Musí mít vhodné rozpadové vlastnosti, jeho produkce musí být snadná a levná a musí se jednoduše, účinně a stabilně vázat na mAb [3, 6]. Dále je potřeba také uvažovat transport rozpadajícího se pozitronového zářiče od jeho zdroje, nejčastěji malého cyklotronu, do příslušné lékařské instituce.

Doba potřebná na správnou distribuci mAb v organismu je obvykle 2–4 dny, poločas rozpadu vhodného radionuklidu musí být srovnatelný [2]. Pokud by byl použit zářič s krátkým poločasem rozpadu a snímání by bylo provedeno po době kratší, než je biologický poločas dané mAb, snímky by měly velmi špatný poměr intenzit nádorové a zdravé tkáně. Navíc by získaná data neobsahovala informaci o distribuci mAb.

Shrnutím uvedených požadavků dostáváme několik vhodných β^+ -zářičů. V tabulce 1.1 jsou uvedeny příklady možných radioizotopů včetně jejich základních vlastností. Radionuklidy ^{68}Ga či ^{18}F s kratším poločasem rozpadu (do 2 hodin) jsou vhodné pro použití pouze s menšími fragmenty mAb [2, 6]. Ty potřebují na dostatečnou distribuci po organismu pouze přibližně 2–6 hodin. Déle žijící radionuklidy ^{89}Zr a ^{124}I se hodí pro použití v kombinaci s nepozměněnými mAb. Jejich dlouhý poločas rozpadu umožňuje provést snímání po době dostatečné k získání maximálního množství informace o správné distribuci mAb. Další výhodou déle žijících radionuklidů je usnadnění jejich transportu. Jejich hlavní nevýhodou je větší dávka radiace. Tento problém však může být vyřešen pomocí citlivějších detektorů umožňující použití menší dávky kontrastní látky.

Z radioizotopů uvedených v tabulce 1.1 je využívána ^{64}Cu , popř. ^{86}Y , při klinických testech na hlodavcích [3, 11]. Pro jejich menší organismus je totiž biolo-

Pozitronivý zářič	Produkce	$T_{1/2}$ [hod]	Max. energie pozitronů [keV]	Dolet [mm]
^{68}Ga	$^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ generátor	1,13	1899	2,4
^{18}F	$^{18}\text{O}(p, n)^{18}\text{F}$ $^{20}\text{Ne}(d, \alpha)^{18}\text{F}$	1,83	634	0,7
^{64}Cu	$^{64}\text{Ni}(d, 2n)^{64}\text{Cu}$ $^{64}\text{Ni}(p, n)^{64}\text{Cu}$	12,7	653	0,7
^{86}Y	$^{86}\text{Sr}(p, n)^{86}\text{Y}$	14,7	1221 1545	1,8
^{76}Br	$^{75}\text{As}(^3\text{He}, 2n)^{76}\text{Br}$ $^{76}\text{Se}(p, n)^{76}\text{Br}$	16,2	871 990 3382 3941	5,3
^{89}Zr	$^{89}\text{Y}(p, n)^{89}\text{Zr}$	78,4	897	1,0
^{124}I	$^{124}\text{Te}(p, n)^{124}\text{I}$ $^{124}\text{Te}(d, 2n)^{124}\text{I}$ $^{125}\text{Te}(p, 2n)^{124}\text{I}$	100,3	1535 2138	2,3

Tabulka 1.1: Pozitronové zářiče zkoumané pro využití v *immuno*-PET a jejich vlastnosti. Dolet značí vzdálenost mezi místem vzniku pozitronu (poloha β^+ -zářiče) a místem anihilace s elektronem.

gický poločas mAb přibližně půl dne, proto lze tyto rychleji se rozpadající jádra v těchto případech aplikovat. Pro lidský organismus je však tento poločas rozpadu příliš krátký.

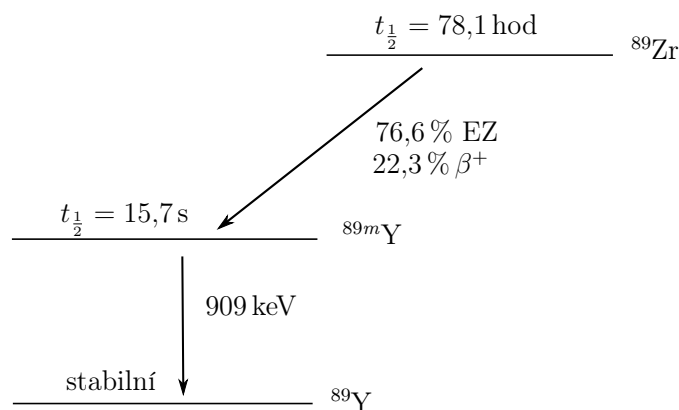
Z radioizotopů s delším poločasem rozpadu jsou vhodné ^{89}Zr a ^{124}I s poločasem rozpadu přibližně 3 dny, resp. 4 dny. Z těchto dvou jader má vhodnější vlastnosti ^{89}Zr . Maximální střední energie vylétavajících pozitronů (897 keV vs. 1535 keV, resp. 2138 keV) zapříčiní jejich menší dolet a tím lepší kvalitu snímků [3]. Navíc radioizotop ^{124}I podléhající elektronovému záchytu, β^+ i γ -rozpadu, vyzařuje fotony o různých energiích (693 keV (63 %), 1691 keV (11 %), 723 keV (10 %)) [3, 12]. To může vést ke zvýšení šumu na pozadí a tento radioizotop tedy poskytuje snímky s horší kvalitou.

1.3 Radioizotop ^{89}Zr

Jak již bylo řečeno dříve, radioizotop zirkonia ^{89}Zr se jeví jako velmi vhodný pro značení monoklonálních protilátek používaných v *immuno*-pozitronově emisní tomografii.

Izotop ^{89}Zr podléhá z 23 % β^+ -rozpadu a zbylých 77 % jader podléhá elektronovému záchytu. Oběma způsoby přechází na nestabilní izotop $^{89\text{m}}\text{Y}$, který téměř okamžitě vyzáří γ -paprsek a přejde na stabilní izotop ^{89}Y . Schéma tohoto děje je na obrázku 1.3. Energie γ -paprsků 909 keV je dost odlišná od detekovaných 511 keV a nedochází tedy ke zhoršení kvality snímku [3].

Radioizotop ^{89}Zr je možno získat ostřelováním izotopu yttria protony v nízkenergetickém cyklotronu. Děj lze zapsat jadernou reakcí $^{89}\text{Y}(p, n)^{89}\text{Zr}$. Další možnou metodou je reakce $^{89}\text{Y}(d, 2n)^{89}\text{Zr}$, která se v praxi nepoužívá [13, 14].



Obrázek 1.3: Schéma rozpadu radioizotopu ^{89}Zr .

Při ostřelování yttria protony může docházet i k vedlejší nežadoucím reakcím $^{89}\text{Y}(p, 2n)^{88}\text{Zr}$ či $^{89}\text{Y}(d, 3n)^{88}\text{Zr}$. Bylo ukázáno [15], že při použití paprsků protonů o energii větší než 14 MeV jsou tyto děje minimalizovány a z uvedených reakcí probíhá téměř výhradně reakce $^{89}\text{Y}(p, n)^{89}\text{Zr}$.

Výhodou přípravy radioizotopu ^{89}Zr je i komerční dostupnost a nízká cena používaných destiček z ^{89}Y . Díky 100 % izotopovému zastoupení yttria není potřeba jejího složitější předchozí úprava.

1.4 Koordinační sloučeniny zirkonia

Díky vlastnostem zmíněným dříve, je zirkonium velmi vhodným kandidátem pro značení mAb. Pro použití za podmínek *in vivo* musí být kationt Zr^{4+} vázán v molekule a nesmí docházet k jeho uvolňování. Nejen, že by došlo ke zkreslení informace o biodistribuci použité protilátky, zároveň by docházelo k usazování volných zirkoničitých kationtů v kostní tkáni [3, 10]. Je tedy nutné kationt Zr^{4+} stabilizovat vhodným ligandem, se kterým bude tvořit stabilní komplex a současně bude schopen se vázat k mAb. Abychom takový ligand našli, je potřeba poznat chemické vlastnosti zirkonia a jeho sloučenin.

Elektronová konfigurace zirkonia v základním stavu je $[\text{Kr}]5s^24d^2$, jeho nejstabilnější oxidační stav je 4+. Kationt Zr^{4+} je relativně velký, vysoce nabitý a preferuje koordinační číslo 8. Jako „tvrdý“ kationt (dle rozdělení Pearsonova konceptu kyselin a bazí) bude upřednostňovat kyslíkové ligandy.

Ve vodném prostředí tvoří zirkoničité kationty částice vzorce $[\text{Zr}_x(\text{OH})_y]^{4x-y}$ v závislosti na koncentraci a pH. Při pH menší než 0 převažují polynukleární částice, v rozmezí pH 0 až 2 dominují spíše částice mononukleární. Při pH vyšším než 2 ovšem klesá rozpustnost a v roztoku se objevuje bílá sraženina $\text{Zr}(\text{OH})_4$. Obecně lze říci, že rozpustnost oxidů a hydroxidů zirkonia je velmi malá (menší než 10^{-8} M) a závislá na pH roztoku.

Při hledání vhodného ligandu byly nejprve studovány běžně používané polyaminokarboxylové kyseliny jako ethylendiamintetraoctová kyselina (H_4EDTA), diethylentriaminpentaoctová kyselina (H_5DTPA) a 1,4,7,10-tetraazacyclododekan-1,4,7,10-tetraoctová kyselina (H_4DOTA). Struktury těchto látek jsou na obrázku 1.4. Jak je patrné, první zmiňovaná EDTA je pouze hexadentátní (4O, 2N), kdežto další dvě jsou oktaedentátní ($\text{DTPA}(5\text{O}, 3\text{N})$, $\text{DOTA}(4\text{O}, 4\text{N})$). U komplexů

zirkonia s ligandem EDTA dochází k dosycení koordinační sféry dalšími dvěma molekulami rozpouštědla (ve vodném prostředí molekulami vody za vzniku částice $[\text{Zr}(\text{EDTA})(\text{H}_2\text{O})_2]$). Tím lze vysvětlit nižší termodynamickou stabilitu zirkoničitých komplexů s EDTA než s DTPA [3, 8].

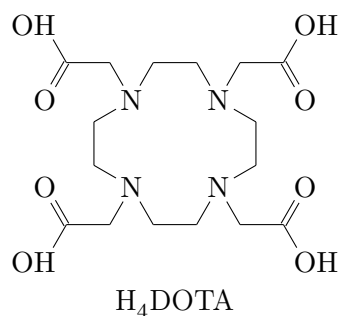
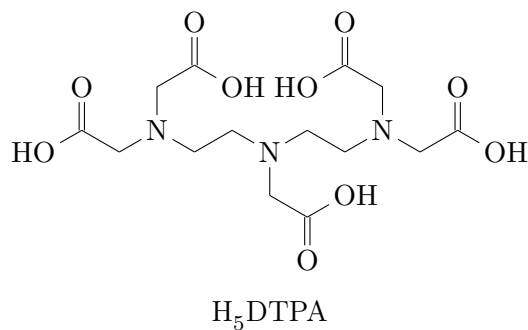
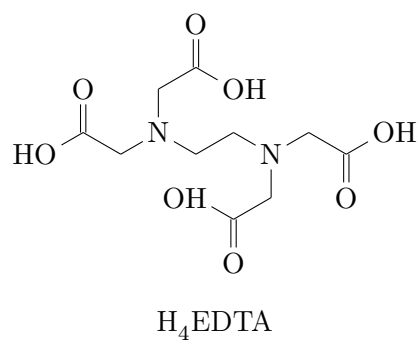
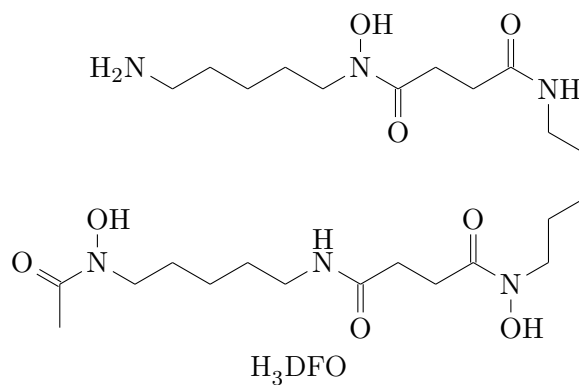
1.4.1 Hydroxamátové ligandy

V dnešní době je nejvíce rozšířeným ligandem pro kationty Zr^{4+} desferrioxamin B (DFO) (schéma viz obrázek 1.4), který se v klinické praxi používá pro léčbu akutní otravy železem [16].* Tento lineární bifunkční ligand poskytuje tři hydroxamátové skupiny schopné koordinovat zirkoničité kationty. Obsahuje také koncovou aminoskupinu, jejíž modifikací lze vázat komplex na příslušnou mAb. Ačkoli struktura DFO s kationty Zr^{4+} v pevném stavu nebyla doposud popsána, lze ligand podle DFT modelů považovat za hexadentátní. K dosycení koordinační sféry kationtu dochází koordinací dvou molekul rozpouštědla [15].

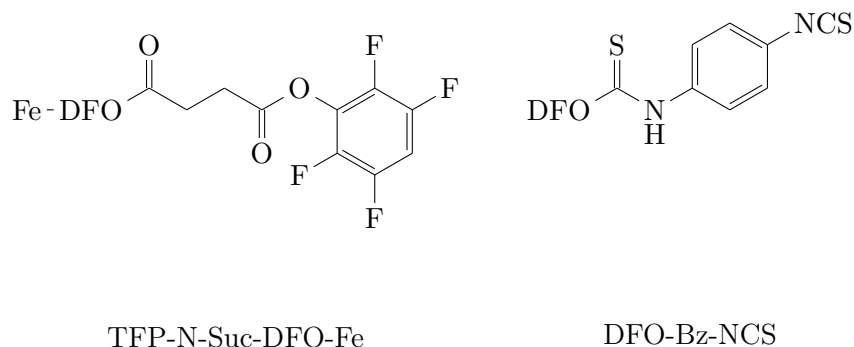
Komplexní sloučeniny zirkonia s DFO vykazují dobrou stabilitu [17, 18]. Po 24 hodinách v séru docházelo k demetalaci pouze z 0,2 %, po 7 dnech pak ze 2 %. Tyto hodnoty ovšem přísluší pouze komplexu $[\text{Zr}(\text{DFO})(\text{H}_2\text{O})_2]$, po jeho navázání k mAb se chování kationtů Zr^{4+} za podmínek *in vivo* liší v závislosti na konkrétní mAb [3]. Dále tento komplex vykazuje poměrně rychlé a přímé vylučování z organismu ve srovnání s komplexy s jinými ligandy. Sloučeniny Zr-oxalát, Zr-citrát i Zr-chlorid podléhají rozpadu snadněji než Zr-DFO a lze pozorovat přítomnost zirkoničitých kationtů hlavně v kostní tkáni, čímž se jejich vylučování komplikuje a prodlužuje.

Koncová primární aminoskupina na DFO poskytuje možnost modifikace a následně navázání komplexu na lysinové zbytky monoklonních protilátek. Nejpoužívanější metodou je úprava aminoskupiny DFO na 2,3,5,6-tetrafluorofenol-*N*-sukcinyldesferrioxamin (FTP-*N*-Suc-DFO), viz obrázek 1.5. Schéma reakčního postupu při přípravě mAb s DFO a ^{89}Zr je zobrazen na obrázku 1.6. Tento postup zahrnuje celkem pět kroků, DFO je nejprve prodloužený o lineární řetězec pomocí sukcinanhydridu a dočasně zakomplexován železitými kationty. Poté se aktivuje reakcí s 2,3,5,6-tetrafluorofenolem a naváže se na aminoskupinu lysinu protilátky. Následně transchelatací s EDTA je uvolněn ligand (vázaný k mAb), ze kterého je připraven zirkoničitý komplex [3].

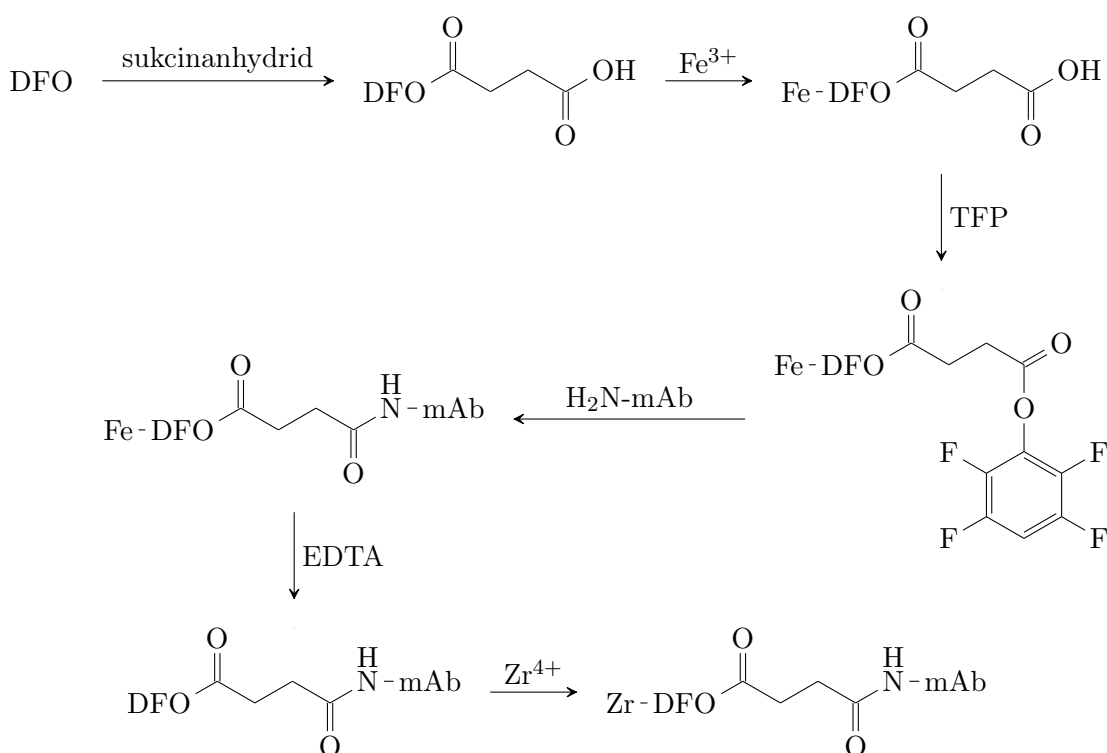
*Desferrioxamin pro chelataci iontů železa je komerčně dostupný pod názvem *Desferal* (DF).



Obrázek 1.4: Struktury ligandů: desferrioxamin B - H₃DFO, kyselina ethylendiamintetraoctová - H₄EDTA, kyselina diethylentriaminpentaoctová - H₅DTPA a kyselina 1,4,7,10-tetraazacyklododekan-1,4,7,10-tetraoctová kyselina - H₄DOTA.



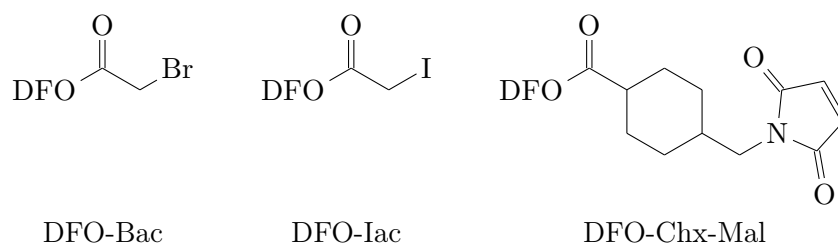
Obrázek 1.5: Deriváty DFO používané k navázání na aminovou skupinu lysinu, u TFP-N-Suc-DFO-Fe jsou hydroxamové skupiny chráněny komplexací s kationtem Fe^{3+} .



Obrázek 1.6: Schéma postupu přípravy monoklonálních protilátek značených kationty Zr^{4+} s desferrioxaminem B. V průběhu reakce je potřeba DFO dočasně blokovat kationtem Fe^{3+} , k jeho uvolnění dochází transchelatací s EDTA. TFP značí 2,3,5,6-tetrafluorfenol.

Pro zjednodušení výše uvedeného postupu byla navržena metoda využívající *p*-isothiokyanátobenzyl-desferrioxamin (DFO-Bz-NCS). Ačkoli lze tento chelát navázat na aminovou skupinu lysinu v jednom kroku, nerozpustnost prekurzoru ve vodě tento přístup velmi komplikuje [3]. Způsob navázání DFO k mAb ovlivňuje nejen účinnost syntézy, ale také může mít efekt na následnou biodistribuci. Limitující je také výběr místa navázání v případě, kdy se lysinový zbytek nachází poblíž (popř. uvnitř) části protilátky, která je zodpovědná za vázání v cílové tkáni. Chelát může s touto oblastí mAb interagovat, čímž dojde k poklesu imunoreaktivity. Tomuto nežádoucímu jevu lze zabránit využitím thiolových zbytků z cysteinových skupin mAb k navázání. Při tomto procesu se využí-

vají bromoacetamido-desferrioxamin (DFO-Bac), jodoacetamido-desferrioxamin (DFO-Iac) nebo maleimidocyclohexyl-desferrioxamin (DFO-Chx-Mal). Schémata struktur těchto látek jsou na obrázku 1.7.



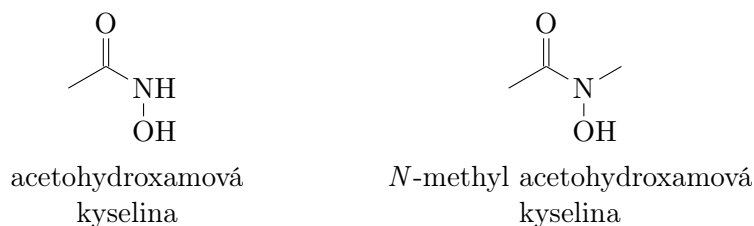
Obrázek 1.7: Deriváty DFO používané k navázání na thiolovou skupinu cysteinu.

Klinické testy ukazují, že sloučeniny $^{89}\text{Zr}^{4+}$ kationtů s desferrioxaminem B mohou být užitečné v diagnostice nádorů i případných metastáz. V určitých případech se tato metoda prokázala být přesnější než používané metody CT či MRI. Získané snímky mají jak dobré rozlišení, tak i poměr intenzit signálu k šumu. Nejvhodnější se ukázalo provádět snímkování pacienta po čtyřech až pěti dnech po aplikaci radiofarmaka. Dle klinických studií se výsledky získané z *immuno-PET* shodují s výsledky získanými CT i MRI [3]. Ve srovnání s jinými používanými radionuklidy (například ^{111}In) je ovšem potřeba větší dávky radiace, což tuto metodu poměrně limituje. Řešením by mohla být kombinace PET s dalšími metodami, například PET/CT, které vedou k vyšší kvalitě snímku i s nižší dávkou radioaktivní látky. Další možností je také použití modernějších strojů při diagnostice [10].

Přes všechny zmíněné klady není desferrioxamin B ideálním ligandem pro použití se zirkoničitými kationty za podmínek *in vivo*. Dvě volná koordinační místa, které DFO na zirkoničitém kationu ponechává, jsou zodpovědná za nestabilitu tohoto komplexu za podmínek *in vivo*. Kvůli nim nastává navázání do kostní tkáně. Vhodný ligand pro ionty Zr^{4+} by měl obsahovat tvrdé donorové atomy, být oktaedrátní a současně, pro snadné vázání na mAb, i bifunkční. Díky těmto vlastnostem by nedocházelo k rozpadu komplexu za podmínek *in vivo* a k následnému usazování volných zirkoničitých kationtů v kostech pacienta.

Vysoká četnost studií a testů zirkoničítým komplexů s DFO vedla k hlubšímu studiu chování zirkoničitého kationu s hydroxamovými kyselinami. Jak bylo řečeno výše, DFO poskytuje tři hydroxamátové skupiny a dle DFT výpočtů dochází k dosycení koordinační sféry kationtu koordinací rozpouštědla.

K porozumění chování kationtů ^{4+}Zr s hydroxomovými kyselinami byly zkoumány komplexy zirkoničitých kationů s acetoxyhydroxamovou a *N*-methyl acetoxyhydroxamovou kyselinou [19] (obrázek 1.8). První zmíněná látka slouží jako model chování volné kyseliny, druhá se více podobá hydroxamátové skupině vázané v DFO. Byly získány struktury komplexů obou těchto látek v pevném stavu, které potvrzují koordinaci čtyř molekul ligandu na zirkoničitý kationt. Při studiu stability těchto komplexů bylo ovšem ukázáno, že v případě substituované hydroxamové kyseliny dochází k tvorbě komplexu pouze z 20 %, v případě volné kyseliny pouze z necelých 4 % [19]. Za stejných experimentálních podmínek však DFO komplexuje kationty Zr^{4+} kvantitativně. Lze tedy usuzovat na silný vliv preorganizace molekuly ligandu.



Obrázek 1.8: Struktury acetohydroxamové a *N*-methyl acetohydroxamové kyseliny.

1.4.2 Nové ligandové systémy pro kationt $^{89}\text{Zr}^{4+}$

V průběhu posledních několika let se mnoho výzkumných skupin zabývá přípravou nového bifunkčního ligandu pro komplexaci zirkoničitých kationtů, který by mohl nahradit nejčastěji používaný desferrioxamin B [20]. V následujících odstavcích uvedeme stručný přehled těchto ligandů.

Lineární a cyklický tetrahydroxamátový chelátor

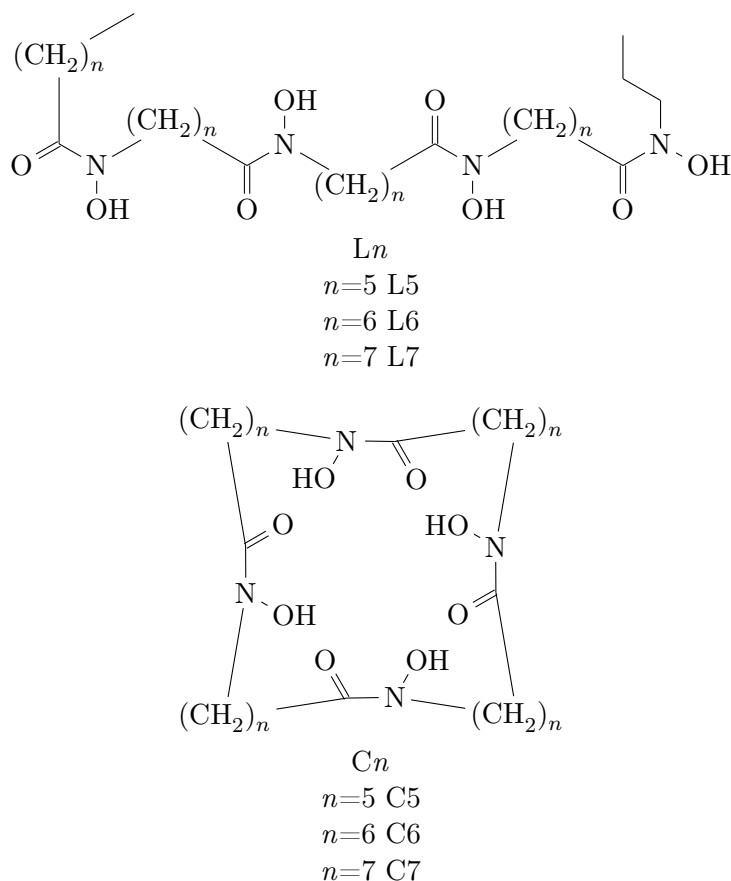
V návaznosti na předchozí studie [19], podle kterých tvoří zirkoničité kationy stálé komplexní sloučeniny se čtyřmi hydroxamovými kyselinami, byly navrženy ligandy právě se čtyřmi těmito skupinami [20]. Bylo připraveno více chelátujících látek a to jak lineárních, tak makrocyclických. Jejich obecné struktury jsou na obrázku 1.9. Postupným prodlužováním alkylového řetězce mezi hydroxamátovými skupinami, od pěti atomů uhlíků do sedmi, vznikají u cyklických molekul kruhy s různou velikostí pomyslného průměru. Lze tedy vysledovat jaká velikost kruhu je nejvhodnější pro zirkoničitý kation.

Vznik komplexů ligandů L5–L7 a C5–C7 se kationty Zr^{4+} byl zkoumán při pH 7, pro porovnání byl do testů začleněn i DFO. Ten se ukázal jako nejrychleji komplexující (ke kvantitativnímu navázání docházelo do 20 minut), ligandy C7, L6 a L7 ovšem také koordinovaly kationty z více než 99 % do dvou hodin. U ligandů s kratšími řetězci probíhala komplexace velmi pomalu i za vysokých teplot. Koordinační sloučeniny s ligandy C7, L6 a L7 vyšly současně ze studií jako nejstabilnější z termodynamického hlediska.

Pro určení kinetické stability těchto komplexů byly roztoky komplexů smíchány s roztokem EDTA (přibližně 2000x nadbytek). Opět bylo ukázáno, že u ligandů s kratším řetězcem dochází k tranchelataci rychleji než u těch s delší řetězcem. Komplexy s ligandy L7 a C7 vykazují dokonce vyšší stabilitu než ten s DFO. Lze tedy dojít k závěru, že pokud mají cyklické ligandy dostatečně velký kruh, vhodný pro poloměr zirkoničitého kationtu, tvoří velmi stálé a inertní sloučeniny.

Oktadentátní analog desferrioxaminu B

Dalším navrženým ligandem pro koordinaci kationtů Zr^{4+} je oktadentátní analog DFO. Lineární řetězec DFO je možné rozšířit o řetězec nesoucí další hydroxamátovou skupinu schopnou koordinace na zbývající volná koordinací místa zirkoničitého kationtu. Mezi takovéto látky patří DFO^* a DFO^*-COOH , jejichž struktura je na obrázku 1.10. Výhodou bifunkčního ligandu DFO^*-COOH je koncová karboxylová skupina, pomocí které je možná konjugace s volnými aminovými skupinami biomolekul prostřednictvím peptidické vazby [21].

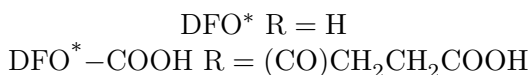
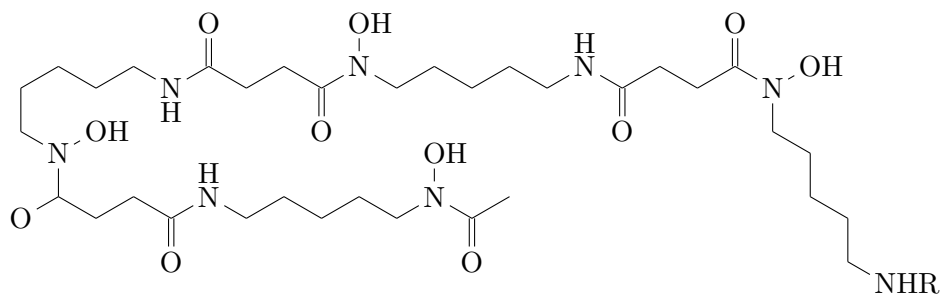


Obrázek 1.9: Schéma struktury lineárních L_n (L5-L7) a cyklických C_n (C5-C7) tetrahydroxamátových ligandů.

Podařilo se získat komplexy těchto ligandů se zirkoničitými kationty v poměru L:M 1:1. Dále byl ligand DFO^*-COOH navázán na peptid bombesin. Ačkoli tento krátký peptidický řetězec s biologickým poločasem v řádu minut až hodin není příliš kompatibilní s poločasem rozpadu ^{89}Zr (78,4 hod), lze jej použít jako model pro zkoumání komplexace a transchelatace se zirkoničitými kationty.[†] Jako kontrolní látka byl vybrán ligand $\text{DFO-}p\text{-SCN}$, který byl navázán na stejný peptidový řetězec. U obou těchto ligandů docházelo ke kvantitativní komplexaci za přibližně stejnou dobu (do 2 hodin).

Dále byla zkoumána kompetitivní transchelatace s DFO. Dle předpokladání se ukázalo, že komplex DFO^*-COOH konjugátu je znatelně stabilnější než kontrolní $\text{DFO-}p\text{-SCN}$ konjugát. Transchelatace z DFO^*-COOH na DFO nebyla prakticky pozorována.

[†]Tento peptid je v současné době zkoumán pro účely nádorového zobrazování v případech rakoviny prostaty, prsu a plic.



Obrázek 1.10: Schéma struktury modifikovaného desferrioxamin B rozšířeného o řetězec nesoucí další hydroxamátovou skupinu (DFO*) a jeho bifunkční analog s koncovou karboxylovou skupinou (DFO*–COOH).

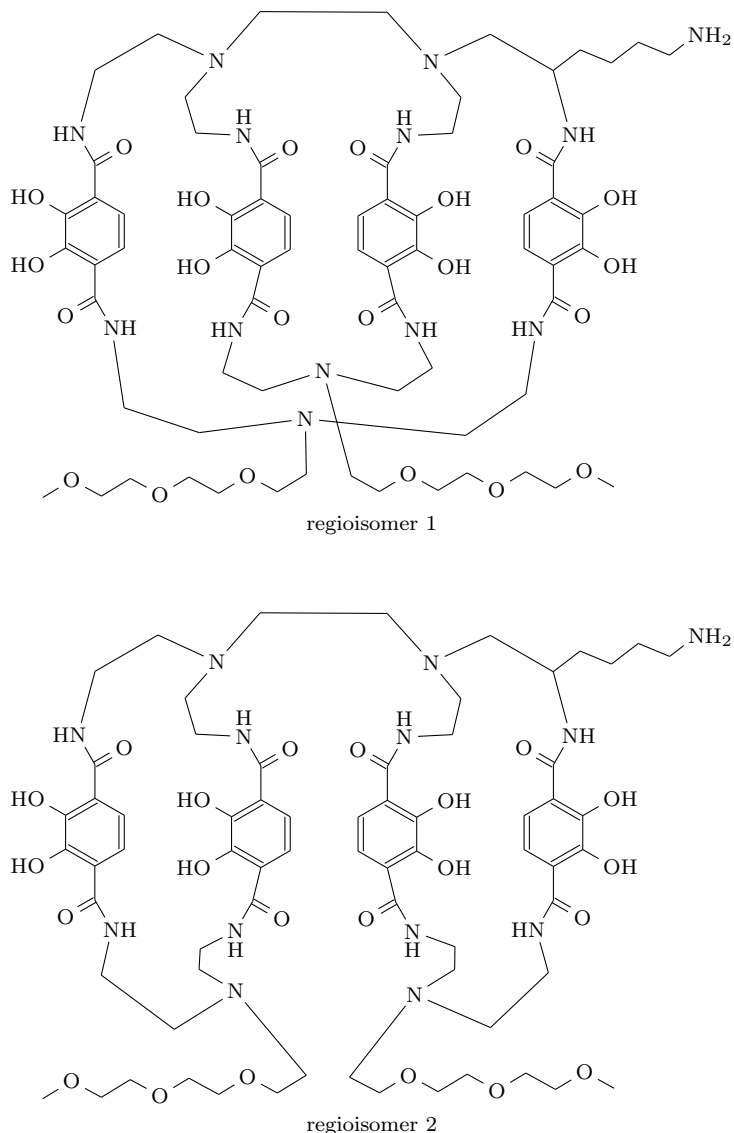
Di-makrocyclické tereftalamidové ligandy

Dalšími připravenými ligandy pro kation Zr^{4+} jsou dva regioisomery obsahující každý čtyři tereftalamidové jednotky propojené do di-makrocyclické molekuly [22]. Struktura těchto ligandů je znázorněna na obrázku 1.11. Oba tyto ligandy jsou oktadentátní a jejich bifunkčnost je zajištěna přidaným lineární bočním ramenem nesoucím koncovou primární aminovou skupinu. Oba isomery komplexují kationt Zr^{4+} v poměru L:M 1:1.

Podle provedených radiochemických studií jsou tyto ligandy srovnatelné s DFO. Při pokojové teplotě dochází ke komplexaci do patnácti minut. Za podmínek *in vitro* po sedmi dnech vykazují komplexy s tereftalamidovými ligandy vyšší stabilitu než ty s DFO. V lidském séru nebyla transchelatace prakticky pozorovatelná.

Testy komplexů s radionuklidem $^{89}\text{Zr}^{4+}$ za podmínek *in vivo* byly provedeny na myších. Porovnáním výsledků získaných pro regioisomer 1 a 2 lze dojít k závěru, že regioisomer 1 vykazuje rychlejší vylučování ze všech tkání oproti regioisomeru 2.

Porovnáním komplexu s regioisomerem 1 s komplexem s DFO se zjistilo, že v případě krve a kostní tkáně je rychlost vylučování obou látek srovnatelná. Ovšem v případě ledvin a jater se komplex s tereftalamidovým ligandem zadržuje více a vylučování je pomalejší.



Obrázek 1.11: Schéma struktury di-makrocyclických tereftalamidových ligandů.

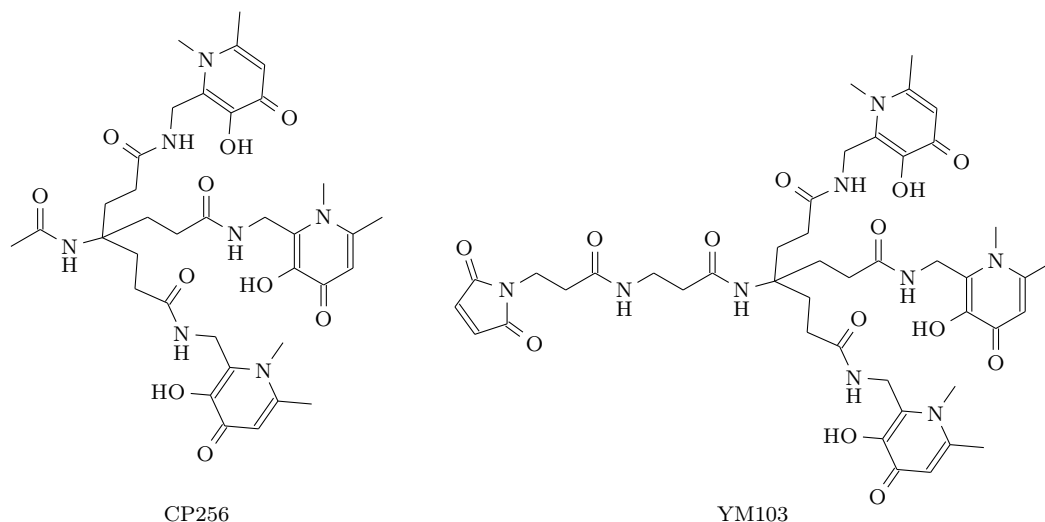
Tripodní tris(hydroxypyridonové) ligandy

Hydroxypyridonové ligandy a ligandy nesoucí tři tyto skupiny jsou známy pro svou schopnost tvořit komplexy s kationty Fe^{3+} , Al^{3+} a Ga^{3+} . V posledních letech byly tyto látky také studovány pro své potenciální užití při medicínské aplikaci radioizotopu galia $^{67}\text{Ga}^{3+}/^{68}\text{Ga}^{3+}$ [23]. Vzhledem ke své podobnosti s desferrioxaminem B, který tvoří stálé sloučeniny s kationty Fe^{3+} , Ga^{3+} a především s kationtem Zr^{4+} , byla provedena studie tvorby stálých sloučenin tris(hydroxypyridonových) ligandů také s kationty zirkonia [24]. Jako takové ligandy byly vybrány látky CP256 a YM103, jejichž struktura je zobrazena na obrázku 1.12.

Porovnáním stability těchto ligandů s DFO vyplývá, že prostorové předuspořádání ligandů CP256 a YM103 není příliš vhodné pro stabilitu komplexů se zirkoničitými kationty. Určení konstant stability hydroxypyridinových ligandů s kationty Zr^{4+} nebylo dosud provedeno, stejně jako porovnání termodynamické stability těchto ligandů s hydroxamátovými ligandy. Ukazuje se, že za laboratorních podmínek dochází k transchelataci z DFO na CP256 [24].

Z transmetalacních studií s kationty Fe^{3+} vyplývá, že hydroxypyridonové kom-

plexy s kationty Zr^{4+} podléhají výměně kovů. Oproti tomu komplex s DFO je vůči tomuto ději inertní. Vzhledem k uvedeným vlastnostem není ligand CP256 ani YM103 vhodný pro další studie.



Obrázek 1.12: Schéma struktury tripodních hydroxy(pyridonových) ligandů CP256 a YM103.

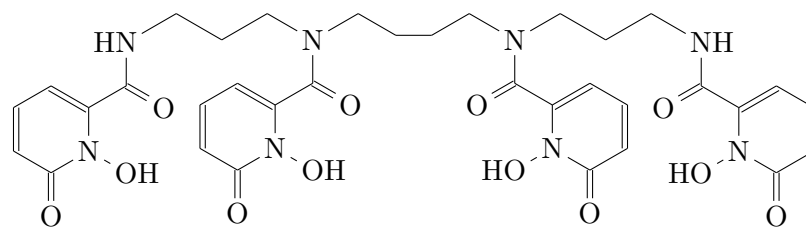
Hydroxypyridonový ligand 3,4,3-(LI-1,2-HOPO)

Při hledání vhodného designu dalšího ligandu s takovými vlastnostmi, které by byly vhodné pro komplexaci zirkoničitých kationtů, vyšla skupina M. A. Deri z ligandů pro selekci aktinoidů, konkrétně látek určených pro kationty Pu^{4+} [25, 26]. Plutoničité kationy vykazují velmi podobné koordinační vlastnosti jako zirkoničité kationy [27]. Navíc jako model pro kationty Pu^{4+} se využívají kationty Hf^{4+} (Zr a Hf se nacházejí ve stejné skupině v periodické tabulce prvků) [27]. Z řady ligandů byl vybrán ligand 3,4,3-(LI-1,2-HOPO) (zkráceně pouze HOPO), jehož struktura je znázorněna na obrázku 1.13. Kostru tohoto ligandu tvoří spermin (lineární 3,4,3-tetraamin), ke kterému jsou připojeny čtyři hydroxypyridonové skupiny. Tyto skupiny poskytují (tvrdé) kyslíkové donory vhodné pro koordinaci tvrdých kationtů jako je Zr^{4+} .

Z rozsáhlého výzkumu vyplývá, že HOPO komplexuje kationty Zr^{4+} ve vodním prostředí při laboratorní teplotě kvantitativně do jedné hodiny [25]. Studie stability ukazují, že komplexy kationtů $^{89}Zr^{4+}$ s HOPO ligandem v lidském séru při teplotě $37^\circ C$ jsou po sedmi dnech stejně stabilní jako ty s DFO. Při kompetitivní transchelataci s nadbytkem EDTA nedochází v případě komplexů s HOPO ligandem k výměně kationů. Oproti tomu u sloučenin s DFO je (za určitých podmínek) transchelatace pozorována i z více jak 50 %.

Studie za podmínek *in vivo* (na hlodavcích) dokazují, že komplexy s DFO se vylučují z organismu pouze renálně, zatímco u komplexů s HOPO je pozorováno složitější a pomalejší vylučování komplexu z organismu [25]. Avšak už po jedné hodině je množství vyloučeného komplexu pro obě látky srovnatelné. Jelikož nedochází k usazování kationtů v kostní tkáni, lze předpokládat, že se HOPO komplex nerozpadá.

HOPO komplex lze rozšířením ligandu o *p*-benzyl-isothiokyanátové pendantní rameno (ligand *p*-NCS-Bn-HOPO) navázat na protilátku Trastuzumab [28].



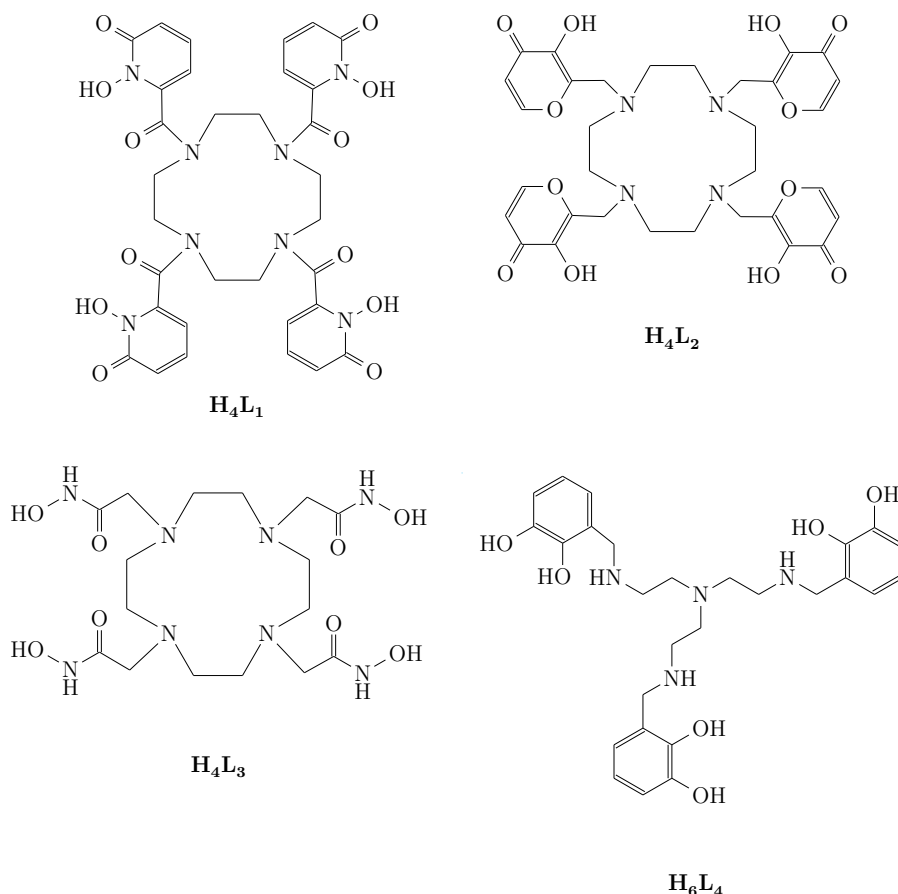
Obrázek 1.13: Struktura ligandu 3,4,3-(LI-1,2-HOPO).

Postup pro navázání *p*-NCS-Bn skupiny je stejný jako v případě DFO. Takto značená mAb se ukazuje být srovnatelně stabilní jako mAb s DFO. Za podmínek *in vivo* je sice akumulace mAb s DFO v nádorové tkáni lepší, ale usazování kovu v kostní tkáni je v případě HOPO ligandu mnohem menší. Tento fakt naznačuje, že oktadentátní ligand je pro zikroničité kationy vhodnější než ligand hexadentátní.

2. Cíl práce

Jak bylo řečeno, v poslední době je velká pozornost soustředěna na nalezení nového ligandu vhodného pro komplexaci kationtů Zr^{4+} . Cílem této práce je příprava a určení vlastností ligandů **L1**, **L2** a **L3** a jejich komplexů s kationty Zr^{4+} . (Není-li právě diskutováno přesné složení částic, nejsou náboje a protonizační stav ligandů uváděny.) Tyto ligandy obsahují makrocyclickou kostru, tvořenou cyklickým tetraaminem cyklenem. Na něj jsou navázána různá pendantní ramena, schopná koordinace zirkoničitého kationtu. Všechny tyto koordinující ramena, maltolová skupina, HOPO skupina i hydroxamátová skupina, se ukázaly být schopné koordinace s tímto kovem již dříve, ať už v součásti větší molekuly či samostatně. Nové makrocyclické ligandy **L1**, **L2** a **L3** by díky svému prostorovému přeuspořádání měly tvořit stále komplexy.

Dalším cílem práce je příprava ligandu **L4** se třemi katecholovými skupinami. Tento ligand je znám pro schopnost tvořit komplexní sloučeniny s řadou čtyřmocných kationtů i trojmocných kationtů kovů, včetně lanthanoidů. Budou studovány podmínky přípravy koordinačních sloučenin s kationty Zr^{4+} a pro porovnání také s kationty Ga^{3+} a Zn^{2+} .



Obrázek 2.1: Struktura ligandů připravovaných a zkoumaných v rámci této diplomové práce.

3. Experimentální část

3.1 Seznam použitých chemikálií

K přípravě ligandů a jejich komplexů byly použity komerčně dostupné chemikálie a rozpouštědla, jednalo se o produkty firem Aldrich, Fluka, Lach-Ner, Lachema, Linde. Deionizovaná voda použitá při syntéze ligandů a komplexů byla připravena deionizací vody systémem ROWAPUR 200/100 (PřF UK). Voda použitá při práci s HPLC a při potenciometrické titrace byla připravena deionizací vody na iontoměničích Milli-Q (Millipore) na katedře analytické chemie PřF UK v Praze. Pro práci s HPLC byl použit acetonitril CHROMASOLV[®] gradient grade, for HPLC, $\geq 99,9\%$, od firmy Aldrich. Při Flash chromatografii byl použit acetonitril kvality ROTISOLV[®] min. 99%, HPLC Gradient Grade.

Bezvodá rozpouštědla byla získaná z komerčně dostupných dle literatury [29].

3.2 Metody detekce a charakterizace

Hmotnostní spektrometrie (MS)

Charakterizace hmotností spektrometrií byla provedena na přístroji Bruker ESQUIRE 3000 s iontovou pastí. Jako metoda ionizace byl použit elektrosprej. Byla získána spektra kladných (+) i záporných (−) iontů. Uváděny jsou zde pouze intenzivní signály, které se podařilo interpretovat.

Rentgenová strukturní analýza (RTG)

Difrakční data byla získána při 150 K (Cryostream Cooler, Oxford Cryosystem) na přístroji NONIUS KAPPA CCD se zářením Mo–K $_{\alpha}$ ($\lambda = 0,71073$ AA) a byla analyzována pomocí programu HKL DENZO. Fázový problém byl řešen pomocí programu SIR92, upřesnění parametrů bylo provedeno programem SHELXL97.

Potenciometrická titrace

Potenciometrická titrace byla provedena v nádobě termostátované na $25 \pm 0,1^{\circ}$ C při konstantní iontové síle $I(\text{NMe}_4\text{Cl}) = 0,1\text{M}$ v rozmezí pH 2,0–12,0. V průběhu měření byly měřené roztoky udržovány v atmosféře Ar udržované konstantním průtokem plynu syceného parami roztoku NMe_4Cl o iontové síle 0,1 M. Pro měření byla použita skleněná elektroda GK2401C. Jako pH–metr byl použit přístroj Radiometer PHM240 napojený na počítač. Titrační roztok byl přidáván automatickou byretou ABU 900 o maximálním objemu 2 ml. Titrace byla provedena třikrát s počtem nejméně 50 titračních bodů.

Jako titrační roztok byl použit NMe_4OH o koncentraci 0,21859 M. Počáteční objem titrovaného roztoku se pohyboval okolo 5 ml a byl určen s přesností na 3 desetinná místa. Koncentrace ligandu v měřicí nádobce byla přibližně 0,004 M.

Protonizační konstanty ligandu byly vypočteny pomocí programu *OPIUM* [30]. Program používá k proložení experimentálních bodů křivkovou funkci nelineární regrese s metodou nejmenších čtverců. Hodnoty parametrů elektrody byly

získány z kalibrační titrace použitím kalibrační funkce

$$E = E_0 + S \log [\text{H}^+] + J_A [\text{H}^+] + \frac{J_B K_w}{[\text{H}^+]}, \quad (3.1)$$

kde E_0 je standartní elektrodový potenciál, S je Nernstovská směrnice, J_A a J_B jsou koeficienty popisující kyselou a basickou chybu elektrody a K_w je iontový součin vody. * Kalibrační titrace byla prováděna vždy před a po každé titraci.

Z naměřených dat byly programem určeny celkové rovnovážné konstanty β . Protonizační konstanta je definována dle vztahu

$$\beta_{\text{hl}} = \frac{[\text{H}_h \text{L}_l]}{[\text{H}^+]^h [\text{L}^{n-}]^l}. \quad (3.2)$$

Vztah mezi celkovou konstantou β a konsektivní konstantou pK je pak definován jako

$$pK_n = \log \beta_n - \log \beta_{(n-1)}. \quad (3.3)$$

Spektroskopie nukleární magnetické rezonance (NMR)

^1H a ^{13}C NMR spektra byla měřena na spektrometrech VNMRS300, AVANCE III HD 400 a Bruker AVANCE III 600 vybaveném kryosondou. Rezonanční frekvence jednotlivých jader jsou uvedena v tabulce 3.1. Pro měření byly použity 5 mm kyvety. Pokud není uvedeno jinak, byla měření prováděna při 25°C . Hodnoty chemických posunů jsou v ppm u ^1H uváděny s přesností na dvě desetinná místa, u ^{13}C na jedno desetinné místo. Pro měření byla použita deuterovaná rozpuštědla D_2O (99,8 %D, Chemotrade), CDCl_3 (99,5 %D, Aldrich) a $\text{DMSO}-d_6$ (99,5 %D, Chemotrade). Referenční standardy jsou uvedeny v tabulce 3.2.

Měřené jádro	Rezonanční frekvence [MHz]		
	VNMRS 300	AVANCE III HD 400	AVANCE III 600
^1H	299,94	399,94	600,17
^{13}C	75,4	100,6	150,91

Tabulka 3.1: Měřená jádra a jejich rezonanční frekvence v spektroskopii NMR.

Rozpuštědlo	Chemický posun [ppm]	
	^1H	^{13}C
$\text{D}_2\text{O}(t\text{-BuOH}^*)$	$\delta_H = 1,25$	$\delta_C = 32,0$
CDCl_3	$\delta_H = 7,24$	$\delta_C = 77,2$
$\text{DMSO}-d_6$	$\delta_H = 2,50$	$\delta_C = 39,5$

Tabulka 3.2: Referenční standardy ^1H a ^{13}C jader pro používaná rozpuštědla.

* Signály interního standardu $t\text{-BuOH}$.

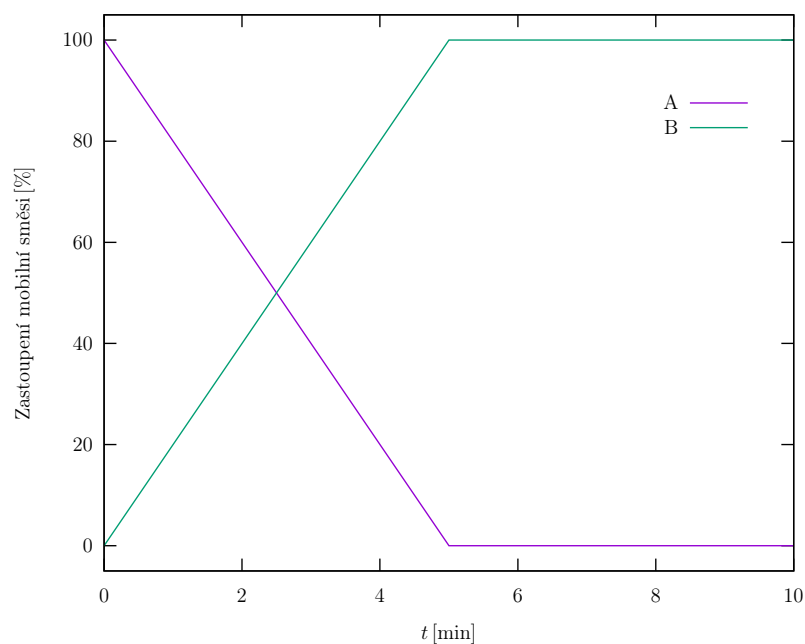
*Iontový součin vody $K_w = 13,81$.

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie byla provedena na analytické koloně C8 ReproSil Gold ($5\ \mu\text{m}$, $120\ \text{Å}$, $150 \times 4,60\ \text{mm}$). Pro analýzu byla použita metoda M1, složení mobilních fází je uvedeno v tabulce 3.3 a na obrázku 3.1 je zobrazeno jejich zastoupení v průběhu separace.

mobilní směs	složení mobilní směsi
A	950 ml H ₂ O 50 ml CH ₃ CN 100 μl TFA
B	50 ml H ₂ O 950 ml CH ₃ CN 100 μl TFA

Tabulka 3.3: Metoda M1 – složení mobilních směsí použitých při chromatografii.



Obrázek 3.1: Metoda M1 – zastoupení mobilních směsí při použití chromatografie.

Flash chromatografie

Automatizovaná flash chromatografie byla prováděna na přístroji systému Sepacore Büchi s 40 g kolonou DispoPackAT ODS-25 od firmy YMC a spektrometrickou detekcí při vlnové délce 254 nm. Pro analýzu byla použita metoda M1, složení mobilních fází je uvedeno v tabulce 3.3 a na obrázku 3.1 je zobrazeno jejich zastoupení v průběhu separace.

UV-VIS spektroskopie

UV-VIS spektra byla měřena na jednopaprskovém spektrometru Specord 50 PLUS (měřící rozsah 190–1100 nm). Šířka štěrbinu monochromátoru přístroje je 1,4 nm. Přístroj byl ovládán z externího PC prostřednictvím programu WinASPECT PLUS. Měření spekter bylo prováděno v kyvetách o tloušťce 10 mm.

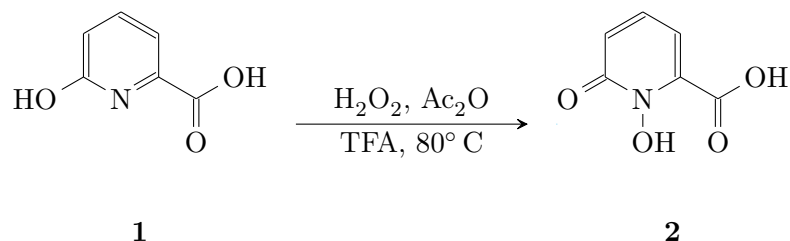
Grafické zpracování dat

Všechny grafy v této práci byly vytvořeny pomocí programu `gnuplot` [31].

3.3 Pokusy o přípravu L1

Přípravy látek 2–4 byly převzaty z [26].

3.3.1 Příprava 6-karboxy-1-hydroxy-2(1*H*)-pyridinonu (2)



V ledové lázni bylo v 25 ml baňce smícháno 8 ml anhydridu kyseliny octové a 2 ml 30 % roztoku peroxidu vodíku. Roztok byl míchán po dobu 4 hodin při stejné teplotě.

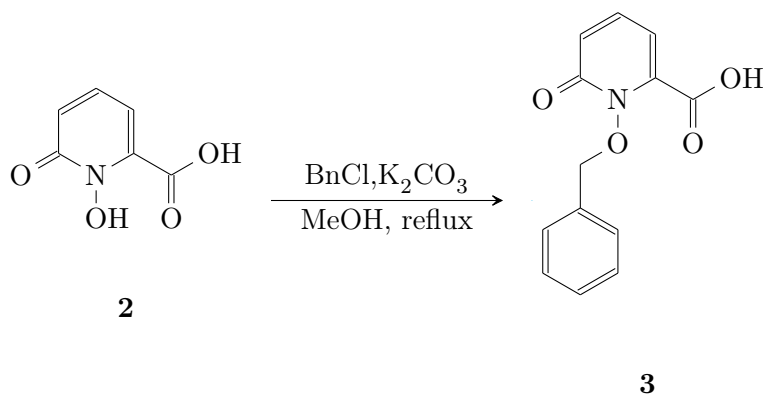
Vzniklý roztok kyseliny peroxooctové byl za stálého míchání pomalu přikapán do roztoku 2,00 g látky (1) (14,4 mmol) ve směsi 12 ml kyseliny trifluoroctové a 8 ml ledové kyseliny octové. Po přidání veškerého roztoku kyseliny peroxooctové byla reakční směs pomalu ohřáta na 80° C a při této teplotě byla míchána po dobu 15 hodin.

Vzniklá bílá sraženina byla odfiltrována na fritě, promyta studeným methanolem a vysušena prosátím vzduchem. Získaná sraženina byla rozpuštěna v 30 ml 10 % roztoku NaOH při teplotě 80° C. Roztok byl míchán při této teplotě 6 hodin. Produkt byl poté vysrážen přidávkem koncentrované kyseliny chlorovodíkové, odfiltrován na fritě, promyt vodou a vysušen v exsikátoru pod vakuem.

Bylo získáno 1,34 g (60 %) bílého prášku.

¹H NMR (CDCl₃): δ (ppm) 6,64 (dd, ³J_{H-H} = 7,0 Hz, ⁴J_{H-H} = 1,7 Hz, 1H, heteroc.); 6,72 (dd, ³J_{H-H} = 9,0 Hz, ⁴J_{H-H} = 1,7 Hz, 1H, heteroc.); 7,45 (dd, ³J_{H-H} = 9,1 Hz, ³J_{H-H} = 7,0 Hz, 1H, heteroc.)

3.3.2 Příprava 1-benzyloxy-6-karboxy-2(1*H*)-pyridinon (kyselina 1,2-HOPOBn) (3)



K 0,76 g látky **2** (4,90 mmol) rozpuštěné v 12 ml bezvodého methanolu bylo přidáno 1,36 g bezvodého uhličitanu draselného (9,84 mmol) a 0,68 ml benzylchloridu (5,88 mmol). Roztok byl refluxován přes noc.

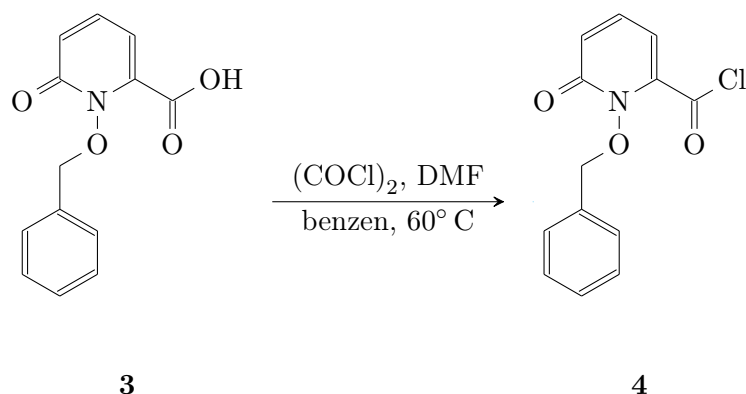
Druhý den byl z roztoku centrifugací odstraněn uhličitan draselný. Čirý roztok byl poté odpařen na rotační vakuové odparce dosucha. Odparek byl rozpuštěn v 10 ml vody a pomocí koncentrované kyseliny chlorovodíkové bylo upraveno pH roztoku na hodnotu 2. Vzniklá lehce nažloutlá sraženina byla odsáta na fritě, promyta vodou a vysušena v exsikátoru.

Bylo získáno 0,82 g (68 %) produktu ve formě pevné látky.

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3): δ (ppm) 5,28 (s, 2H, $-\text{O}-\text{CH}_2-$); 6,55 (dd, $^3J_{\text{H-H}} = 6,8$ Hz, $^4J_{\text{H-H}} = 1,7$ Hz, 1H, heterocykl.); 6,73 (dd, $^3J_{\text{H-H}} = 9,2$ Hz, $^4J_{\text{H-H}} = 1,7$ Hz, 1H, heterocykl.); 7,55–7,38 (m, 6H, 5x arom., 1x heterocykl.)

MS (+) 267,9 (**3** + Na^+)

3.3.3 Pokus o přípravu chloridu kyseliny 1,2-HOPOBn (**4**)



V 5 ml benzenu bylo rozmícháno 0,10 g 1-benzyloxy-6-karboxy-2(1H)-pyridinon (**3**) (0,41 mmol). K této suspenzi bylo za stálého míchání přidáno 67,0 μl dichloridu kyseliny šťavelové (0,79 mmol). Poté byla do reakční směsi přidána katalytické množství (kapka) dimethylformamidu, z roztoku se uvolnilo malé množství bublin a roztok se odbarvil a byl poté čirý. Následně byl roztok ohříván 4 hodiny při teplotě 60°C . Poté bylo rozpouštědlo odstraněno na rotační vakuové odparce. Získaný olej byl ještě dvakrát odpařen spolu s toluenem.

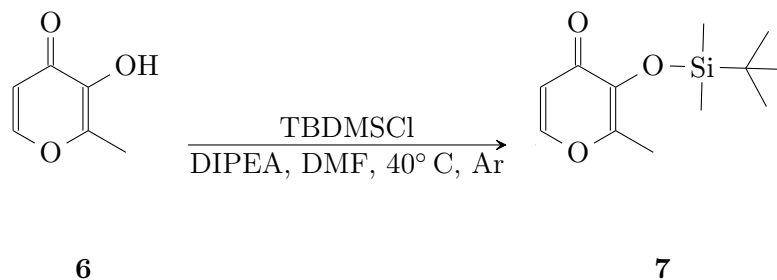
Získaný tmavě hnědý olej byl rozpuštěn v 1 ml tetrahydrofuranu a přefiltrován přes krátký sloupec silikagelu. Poté bylo rozpouštědlo odstraněno na rotační vakuové odparce.

V rámci optimalizace této reakce bylo rozpouštědlo benzen vyměněno za toluen a v obou těchto rozpouštědlech byla reakce prováděna v rozmezí teplot 50°C – 85°C (teploty nad 70°C pouze v případě toluenu). Reakční doba byla pozměněna až na 8 hodin. Žádná z těchto změn nevedla ke zvýšení zastoupení produktu **4**.

3.4 Pokusy o přípravu L2

Příprava látek 7–8 byla převzata z [32].

3.4.1 Příprava 3-(*tert*-butyldimethylsilyl)oxy-2-methyl-4-pyronu (7)



Do 100 ml trojhrdlé baňky bylo naváženo 2,52 g látky **6** (20,0 mmol) a 5,00 g *tert*-butyldimethylsilylchloridu (33,2 mmol). Následně byl na baňku napojen převod argonu. Na další hrdlo napojena bublačka (pro kontrolu proudu přiváděného inertního plynu) a třetí hrdlo bylo uzavřeno septem. Skrze něj bylo do baňky přidáno 50 ml bezvodého DMF. Poté, co byla veškerá pevná fáze rozpuštěna, bylo skrze septum přidáno 7,8 ml DIPEA. Roztok byl míchán při teplotě 40 °C přes noc.

Druhý den bylo do roztoku přidáno 50 ml nasyceného roztoku hydrogenuhličitanu sodného. reakční směs byla 5× protřepána 30 ml hexanu. Spojené organické frakce byly vysušeny 2× bezvodým síranem hořečnatým, zfiltrovány a filtrát byl odpařen na rotační vakuové odparce dosucha.

Bylo získáno 2,18 g (45 %) nažloutlého oleje.

¹H NMR (CDCl₃): δ (ppm) 0,26 (s, 6H, -Si-(CH₃)₂); 0,96 (s, 9H, -C-(CH₃)₃); 2,31 (s, 3H, -CH₃); 6,29 (d, ³J_{H-H} = 5,6 Hz, 1H, heteroc.); 7,57 (d, ³J_{H-H} = 5,6 Hz, 1H, heteroc.)

MS (+) 262,8 (**7** + Na⁺)

3.4.2 Pokus o přípravu 3-(*tert*-butyldimethylsilyl)oxy-2-brommethyl-4-pyronu (8)



V 50 ml trojhrdlé baňce bylo rozpuštěno 0,50 g látky **7** (2,08 mmol) v 10 ml bezvodého CCl_4 . Poté bylo do roztoku přisypáno 0,37 g NBS (2,08 mmol). Na baňku byl připojen přívod argonu, bublačka a zpětný chladič. Roztok byl přivezen k varu. V protiproudu argonu byl přidán roztok 0,05 g AIBN (0,30 mmol) ve 2 ml bezvodého tetrachlormethanu. Roztok byl refluxován 90 minut. Po ochlazení na laboratorní teplotu byla pevná fáze odfiltrována. Roztok byl odpařen dosucha.

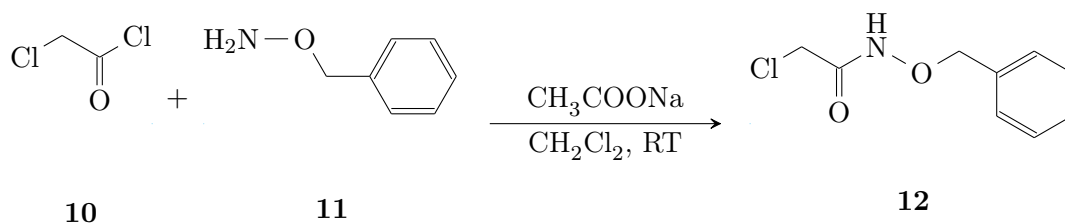
Při optimalizaci této reakce bylo vyzkoušeno mnoho reakčních změn:

- teplota zahřívání byla měněna od 45°C do 75°C
- doba zahřívání byla zkrácována (60 minut) i prodlužována až na 24 hodin. Byl měněn nadbytek NBS
- byl přidáván nadbytek NBS i AIBN (až $4\times$)
- rozpouštědlo MeCN bylo vyměně za DMF
- bromace byla provedena pomocí PBC
- iniciace byla provedena pomocí UV záření.

Žádná z těchto změn nevedla k získání látky **8**.

3.5 Příprava L3

3.5.1 Příprava *N*-(benzyloxy)-2-chloroacetamidu (**12**)



V 500 ml baňce bylo rozpuštěno 5,00 g látky **11** (31,3 mol) v 250 ml bezvodého CH_2Cl_2 . Do roztoku bylo přidáno 6,47 g bezvodého CH_3COONa (78,9 mmol) rozetřeného na jemný prášek. Následně byl přidán roztok 3,76 ml látky **10** (47,24 mmol) v 10 ml bezvodého CH_2Cl_2 . Suspenze byla míchána 90 minut.

Pevná fáze byla odfiltrována a roztok byl odpařen na rotační vakuové odparce dosucha. Odparek byl rozpuštěn v 200 ml CH_2Cl_2 a pak byl roztok postupně protřepán 200 ml vody a 200 ml nasyceného roztoku NaHCO_3 . Organická fáze byla dvakrát vysušena bezvodým MgSO_4 , filtrována a odpařena do sucha.

Látka **12** byla získána dělením odparku na slupci silikagelu v mobilní fázi hexan:EtOAc v gradientu 10:1 až 1:1 a následným několikanásobným odpařením s CHCl_3 za vzniku jemného bílého prášku.

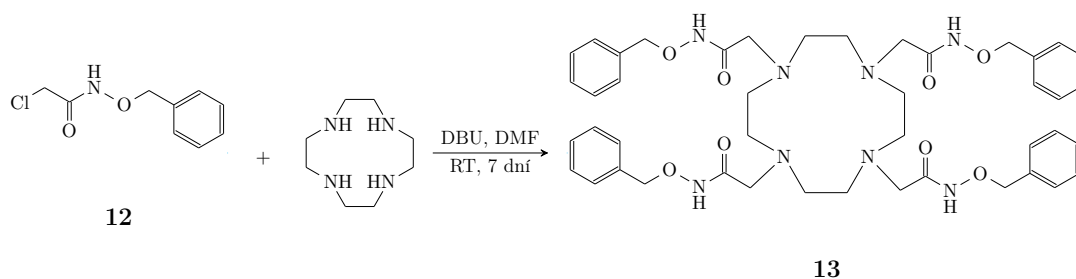
Výtěžek reakce byl 4,51 g (72 %).

$^1\text{H NMR}$ ($\text{DMSO}-d_6$): δ (ppm) 3,96 (s, 2H, $-\text{CH}_2\text{Cl}$); 4,82 (s, 2H, $-\text{O}-\text{CH}_2-$); 7,48—7,31 (m, 5H, arom.); 11,48 (s, 1H, $-\text{NH}-$)

$^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3): δ (ppm) 40,5 (s, ClCH_2^-); 78,6 (s, $\text{ClCH}_2-\text{CH}_2-$); 129,0 (s, $-\text{CH}-$ arom.); 129,3

MS (+) 221,9 ($\mathbf{12}+\text{Na}^+$); (-)197,6 ($\mathbf{12}-\text{H}^+$)

3.5.2 Příprava látky 13



Navážka 1,40 g látky **12** (7,04 mmol) byla rozpuštěna v 105 ml DMF. Za stálého míchání bylo přidáno 0,27 g cykvenu (1,56 mmol) a 1,40 ml DBU (9,39 mol). Roztok byl míchán při laboratorní teplotě po dobu 7 dní.

Rozpouštědlo bylo odstraněno na rotační vakuové odparce, odparek byl rozpuštěn v 100 ml acetonitrilu a znovu odpařen do sucha. Získaný žlutohnědý olej byl přečištěn pomocí flash chromatografie pomocí metody M1. Frakce obsahující produkt **13** byly spojeny a rozpouštědlo bylo odstraněno lyofilizací.

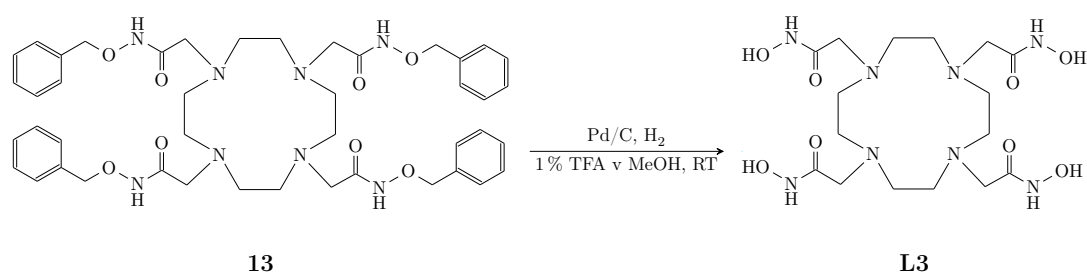
Bylo získáno 0,71 g (55 %) produktu.

¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ (ppm) 2,53 (s, 16H, -CH₂- makroc.); 3,01 (s, 8H, -N-CH₂-); 4,79 (s, 8H, -O-CH₂-); 7,35 (m, 20H, arom.); 11,15 (s, br, 4H, -NH-)

¹³C NMR (DMSO-*d*₆): δ (ppm) 53,1 (s, -CH₂- makroc.); 55,4 (s, -CH₂-C(=O)-); 77,3 (s, -O-CH₂-); 126,9 (s, -CH- arom.); 128,6 (s, -CH- arom.); 128,9 (s, -CH- arom.); 136,6 (s, -C- arom.); 167,5 (s, -C(=O)-)

MS (+) 825,3 (**13**+H⁺); (-) 823,1 (**13**-H⁺)

3.5.3 Příprava ligandu L3·2,2TFA·2,1H₂O



V 11 dvojhrdlé baňce bylo smícháno v 400 ml 1 % TFA v methanolu 1,60 g látky **13** (1,94 mmol) a 0,40 g 10 % Pd/C (25 % hmot. ekv.). Na hlavní hrdlo bylo nasazeno septum, na vedlejší redukce s kohoutem. Celá aparaturu byla 3× sekurována a potom byl na kohout připojen přívod vodíku (balónek). Reakce byla míchána při laboratorní teplotě 3 hodiny.

Pevná fáze byla odfiltrována přes mikrofiltr a roztok byl na rotační vakuové odprace odpařen dosucha. Odparek byl rozpuštěn ve vodě a přečištěn pomocí flash chromatografie. Frakce obsahující čistou látku **L3** byly spojeny a rozpouštědlo bylo odstraněno lyofilizací.

Bylo získáno 0,85 g (58 %) produktu ve formě **L3·2,2TFA·2,1H₂O**.

¹H NMR (D₂O, 90° C, pD ≈ 12(LiOD)): δ (ppm) 3,25 (s, 16H, -CH₂- makroc.); 3,68 (s, 8H, -CH₂-C(=O)-)

¹³C NMR (D₂O 25° C, pD ≈ 3): δ (ppm) 49,0–51,0 (b, -CH₂- makroc.); 52,0–53,0 (-CH₂-C(=O)-); 114,5–117,5 (-C(=O)- arom.)

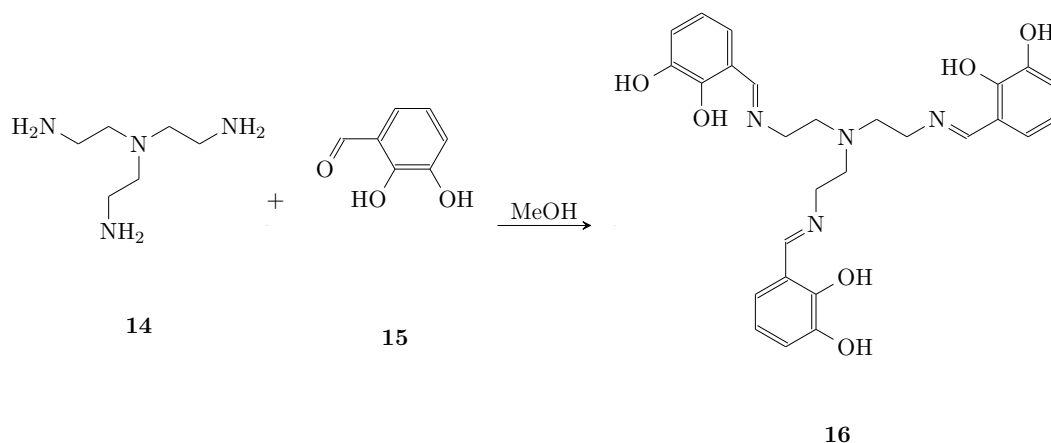
MS (+) 465,2 (**L3** + H⁺); (-) 462, (**L3** - H⁺)

EA C: 32,57 %; H: 4,82 %; N: 15,12 % (**L3·2,2TFA·2,1H₂O** odpovídá C: 32,53 %; H: 5,14 %; N: 14,8 %)

3.6 Příprava L4

Látka **16** a **L4** byla připravena dle [33].

3.6.1 Příprava Schiffovy báze (16)

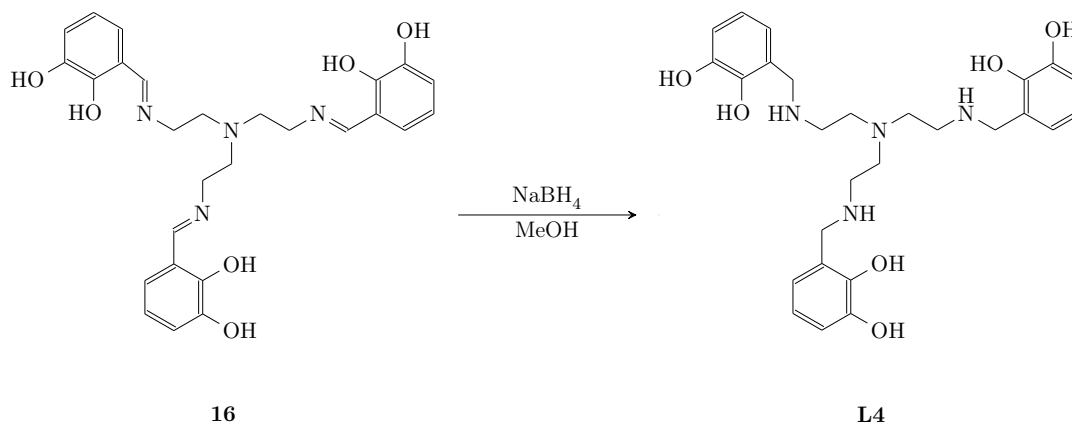


K 1,00 g látky **15** (7,24 mmol) rozpuštěné v 17 ml methanolu bylo za laboratorní teploty přidáno 361 μg látky **14** (2,41 mmol) rozpuštěných v 1 ml methanolu v průběhu 30 minut. Poté byla suspenze hodinu míchána. Zlatavá sraženina byla odsáta na fritě, promyta ledovým methanolem a ponechána přes noc sušit pod vakuem v exsikátoru nad P_2O_5 .

Bylo získáno 1,09 g (89 %) Schiffovy báze.

$^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6): δ (ppm) 2,87 (t, $^3J_{\text{H-H}} = 6,0$ Hz, 2H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$); 3,61 (t, $^3J_{\text{H-H}} = 6,0$ Hz, 2H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$); 6,59–6,34 (m, 2H, arom.); 6,79 (dd, $^3J_{\text{H-H}} = 7,0$ Hz, $^3J_{\text{H-H}} = 2,3$ Hz, 1H, arom.); 8,24 (s, 1H, $-\text{CH}=\text{N}-$)

3.6.2 Příprava tris((2,3-dihydroxybenzylamino)-ethyl)amini trihydrochlorid monohydrátu (**L4**·3 HCl · H₂O)



K 1,00 g připravené Schiffovy báze **16** (1,98 mmol) rozpuštěné v 16 ml bezvodého methanolu bylo v průběhu 2 hodin přidáno v malých dávkách 0,34 g NaBH_4

(8,91 mmol) za laboratorní teploty pod argonovou atmosférou. Po přidání veškerého činidla byl roztok míchán hodinu (dokud nebyl čirý). Následně bylo přilito 200 ml směsi koncentrované kyseliny chlorovodíkové s methanolem (1:1). Roztok byl ponechán přes noc při -15°C .

Druhý den byl odfiltrován vysrážený NaCl. Filtrát byl odpařen na rotační vakuové odparce dosucha. Následně byl odpařen ještě třikrát se suchým methanolem. Získaný bílý prášek byl sušen pod vakuem v exsikátoru s P_2O_5 .

Bylo získáno 0,80 g (63 %) produktu.

$^1\text{H NMR}$ (D_2O): δ (ppm) 2,87 (t, $^3J_{\text{H-H}} = 6,8$ Hz, 2H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$); 3,13 (t, $^3J_{\text{H-H}} = 6,8$ Hz, 2H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$); 4,24 (s, 2H, $-\text{NH}-\text{CH}_2-$); 6,92–6,81 (m, 2H, arom.); 7,00 (dd, $^3J_{\text{H-H}} = 7,2$ Hz, $^3J_{\text{H-H}} = 2,4$ Hz, 1H, arom.)

MS (-) 511,6 ($\text{L4} - \text{H}^+$)

3.6.3 Příprava komplexů $[\text{Zr}^{4+}(\text{L4})]$, $[\text{Ga}^{3+}(\text{L4})]$ a $[\text{Zn}^{2+}(\text{L4})]$

Příprava 1 M zásobního roztoku $\text{L4}\cdot 3\text{HCl}\cdot \text{H}_2\text{O}$ Navážka 3,19 g $\text{L4}\cdot 3\text{HCl}\cdot \text{H}_2\text{O}$ (5,00 mmol) byla rozpuštěna v 5,00 ml H_2O .

Příprava 1 M zásobního roztoku Zr^{4+} Navážka 0,645 g $\text{ZrOCl}_2\cdot 8\text{H}_2\text{O}$ (2,00 mmol) byla rozpuštěna v 2,00 ml H_2O .

Příprava 1 M zásobního roztoku Zn^{2+} Navážka 0,595 g $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (2,00 mmol) byla rozpuštěna v 2,00 ml H_2O .

Zásobní roztok kationtů Ga^{3+} Jako zásobní roztok kationtů Ga^{3+} byl použit 0,049 M roztok $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3\cdot x\text{H}_2\text{O}$ připravený dříve v naší laboratoři. Koncentrace gallitých iontů byla určena zpětnou chelatometrickou titrací Chelatonem 3 [34].

Příprava komplexu $[\text{Zr}^{4+}(\text{L4})]$ Ve 4 ml skleněné vialce bylo smícháno 50,0 μl zásobního roztoku ligandu $\text{L4}\cdot 3\text{HCl}\cdot \text{H}_2\text{O}$ a 50,0 μl zásobního roztoku Zr^{4+} . Přidáním vody byl doplněn objem roztoku na 2 ml. Roztok byl hodinu míchán. Pak byl do roztoku přidáván 1 M roztok hydroxidu sodného dokud se nevyloučila tmavá sraženina.

Příprava komplexu $[\text{Ga}^{3+}(\text{L4})]$ Ve 4 ml skleněné vialce bylo smícháno 50,0 μl zásobního roztoku ligandu $\text{L4}\cdot 3\text{HCl}\cdot \text{H}_2\text{O}$ a 1,11 ml zásobního roztoku Ga^{3+} . Přidáním vody byl doplněn objem roztoku na 2 ml. Roztok byl hodinu míchán. Potom byl do roztoku přidáván 1 M roztok hydroxidu sodného dokud se nevyloučila hnědá sraženina.

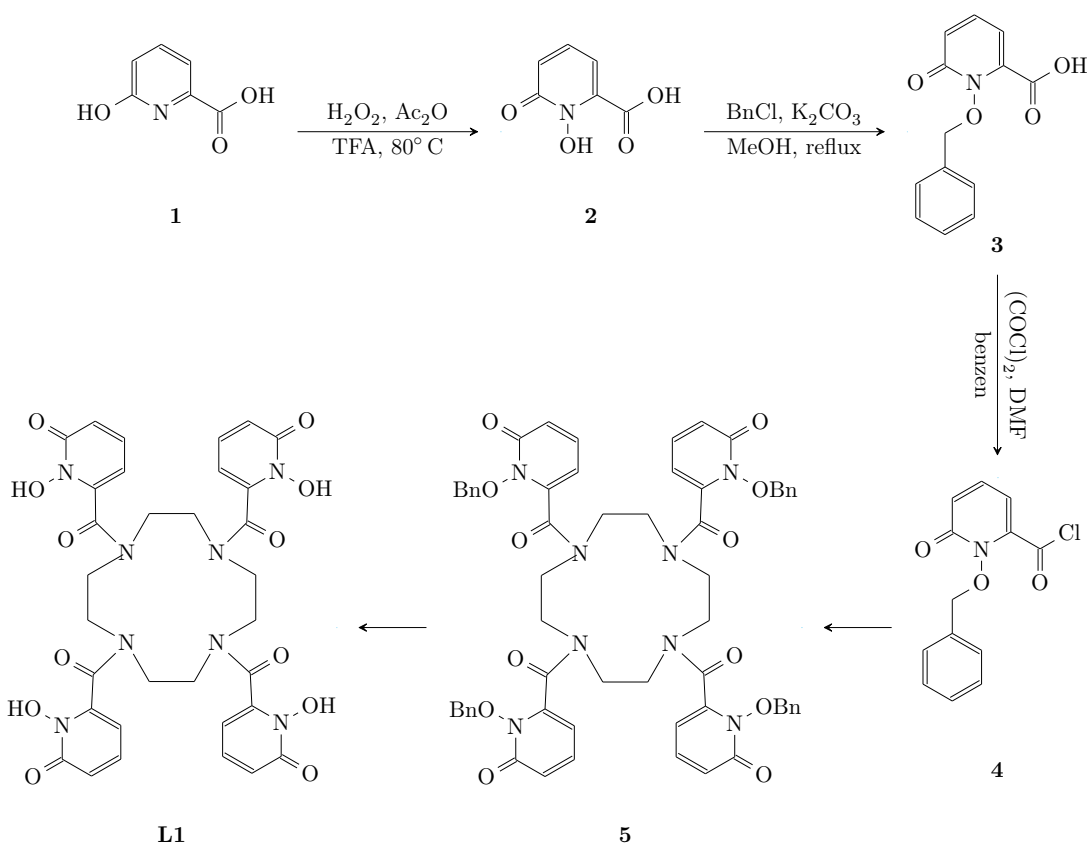
Příprava komplexu $[\text{Zn}^{2+}(\text{L4})]$ Ve 4 ml skleněné vialce bylo smícháno 50,0 μl zásobního roztoku ligandu $\text{L4}\cdot 3\text{HCl}\cdot \text{H}_2\text{O}$ a 50,0 μl zásobního roztoku Zn^{2+} . Přidáním vody byl doplněn objem roztoku na 2 ml. Roztok byl hodinu míchán. Potom byl do roztoku přidáván 1 M roztok hydroxidu sodného dokud se nevyloučila tmavě žlutá sraženina.

4. Diskuze výsledků

4.1 Pokusy o přípravu HOPO ligandu

Navržený ligand **L1** obsahuje stejné koordinující hydroxypyridonové pendanty jako známý ligand 3,4,3-(LI-1,2-HOPO) [25, 28]. Oproti němu by mohl **L1** vykazovat vyšší stabilitu komplexů z důvodu prostorovému předuspořádání ligandu.

Navržený postup pro přípravu látky **L1** je znázorněn na obrázku 4.1. Příprava látek **2**, **3** a **4** byla převzata z publikace [26].



Obrázek 4.1: Schéma přípravy ligandu **L1**.

V prvním kroku dochází k oxidaci kyseliny **1** pomocí čerstvě připravené kyseliny peroctové s kyselinou trifluoroctovou při 80°C . Vysrážený produkt je zbaven zbytků kyselin zahříváním v roztoku hydroxidu, čistý produkt je získán srážením HCl .

Ke srážení látky **2** nedochází kvantitativně v jednom kroku. Opětovným srážením lze získat další podíly produktu, ovšem s počtem opakování tohoto postupu klesá čistota získané látky (dle NMR). Bylo získáno 60 % teoretického výtěžku, což je hodnota srovnatelná literaturou [26].

V druhém kroku syntézy dochází k chránění hydroxylové skupiny na atomu dusíku kyseliny **2** pomocí benzylchloridu. Reakce je prováděna v bezvodém methanolu s bazí K_2CO_3 při refluxu po dobu 6 hodin. Poté je heterogenní fáze odfiltrována a rozpouštědlo odpařeno na rotační vakuové odparce. Čistý produkt **3** je získán jako sraženina po okyselením vodné roztoku na pH 2.

Jelikož je upravování pH doprovázeno silným zahřívání roztoku, je potřeba jej provádět velmi pomalu a za dostatečného míchání. Může docházet také k tvorbě žluté pěny, která se ovšem po chvíli míchání rozpustí. Tímto způsobem se nepodařilo získat veškerý produkt, jeho část stále zůstala v matečném roztoku. Bylo získáno 68 % teoretického výtěžku. Výtěžek je oproti tomu z literatury nižší (68 % vs. 91 %) z výše uvedených důvodů.

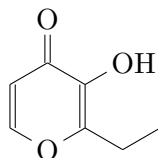
Ve třetí části přípravy **L1** je chráněná kyselina **3** převedena na chlorid kyseliny **4** reakcí s dichloridem kyseliny šťavelové. Reakce je prováděna v benzenu a katalyzována malým množstvím DMF. Dle původní literatury je acylchlorid **4** je získán po filtraci přes sloupec silikagelu.

Bohužel, tento krok reakce se nepodařilo zreprodukovat. Dále byly vyzkoušeny změny reakčních podmínek, rozpouštědlo benzen bylo vyměněno za toluen, změna teploty z uváděných 60° C na teploty rozsahu od 50° C do 85° C (teploty nad 70° C pouze v případech s rozpouštědlem toluenem z důvodu nižší teploty varu benzenu). Také bylo vyzkoušeno prodloužení reakční doby z uváděných 4 hodin až na 8 hodin. Za žádných z uvedených podmínek nebylo možné získat primárně produkt **4**. Průběh reakce v čase byl také sledován pomocí ¹H NMR. Nebyl ovšem pozorován přírůstek cílového produktu ve větší míře. Z výše uvedených důvodů nebylo možné izolovat látku **4** a provést její navázání na cyklen.

Z časových důvodů byly další studie přípravy látky **4** a následně **L1** opuštěny.

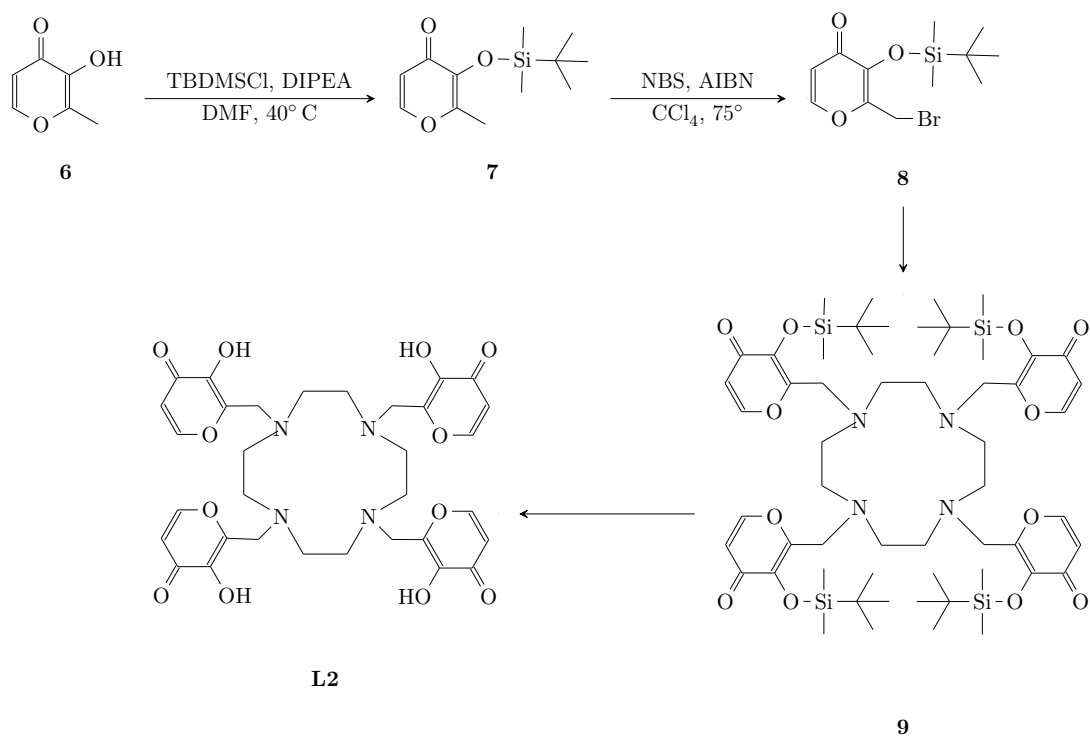
4.2 Pokusy o přípravu maltolového ligandu

Komplex $[\text{ZrCl}_2(\text{ethylmaltol})]$ je znám již řadu let jako katalyzátor při polymerizaci ethyleny [35]. Později bylo dokázáno, že zirkoničité kationty mohou tvořit komplexní sloučeninu se čtyřmi koordinovanými molekulami ethylmaltolu (jeho struktura je na obrázku 4.2) [32].



Obrázek 4.2: Struktura ethylmaltolu.

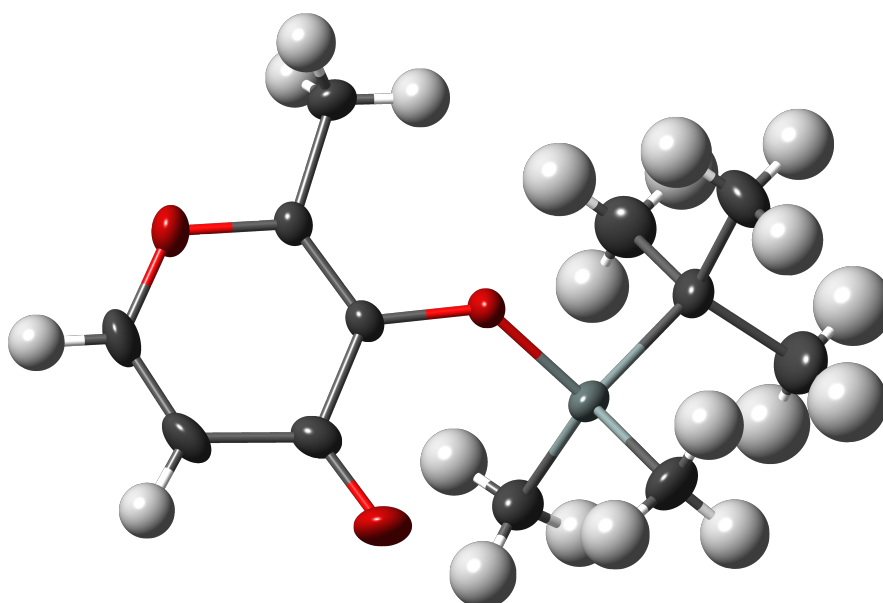
Příprava látky **L2** vychází z maltolu **6**, který je převeden na bromoderivát **8**. Ten se následně váže na sekundární aminy cyklu za vzniku ligandu **L2**. Navržený postup pro přípravu ligandu **L2** je zobrazen na obrázku 4.3. Postup pro přípravu látek **7** a **8** byl převzat z literatury [36].



Obrázek 4.3: Schéma přípravy ligandu **L2**.

V prvním kroku přípravy ligandu **L2** dochází k chránění hydroxylové skupiny látky **6** zavedením *tert*-butyldimethylsilylové skupiny. Reakce je prováděna pod argonovou atmosférou v DMF při 40° C za přítomnosti báze DIPEA. Látka je poté izolována extrakcí mezi organickou a vodní fází.

Oproti původní literatuře [36] byly podmínky reakce lehce pozměny. Namísto původní báze imadazolu byla použita báze DIPEA. Reakce byla také optimalizována změnou teploty, nejvyšších výtěžků bylo dosaženo při 40° C. Při práci s *tert*-butyldimethylsilylchloridem bylo potřeba postupovat relativně rychle,



Obrázek 4.4: Struktura sloučeniny 7.

protože tato látka na vzduchu snadno a rychle hydrolyzuje. Produkt byl získán ve formě nažloutlého oleje s výtěžkem 45 %.

Látka 7 byla získána ve formě monokrystalu, jehož struktura byla určena pomocí strukturní rentgenové analýzy, viz obrázek 4.4. V tabulce 4.1 jsou uvedeny vybrané parametry pro látku 7.

Ve druhém kroku syntézy je látka 7 převedena na bromderivát 8. Průběh reakce je radikálový s bromačným činidlem NBS a iniciátorem AIBN. Halogenace je prováděna pod argonovou atmosférou v tetrachlormethanu při 75° C.

V ^1H NMR spektru reakční směsi bylo pozorováno kromě signálů produktu 8, také mnoho dalších látek, které se nepodařilo identifikovat. Bylo ovšem patrné, že cílový produkt byl ve směsi pouze v malém podílu. Pro zvýšení zastoupení látky 8 bylo vyzkoušeno mnoho změn reakčních podmínek, jako doba refluxu (1 hodina až 24 hodin) či teplota, při které je reakce prováděna (od 45° C do 75° C). Reakce byla prováděna také při zvýšení nadbytku bromačného činidla i při vyšší koncentraci iniciátoru. Byla vyzkoušena také výměna rozpouštědla tetrachlormethanu za acetonitril a za DMF. Namísto iniciačního činidla AIBN byla použita iniciace UV zářením. Bromačným činidlem bylo vyměněno za PBC. Byl také pozorován vliv toho, zda je reakce prováděna na světle, či v obalené aparatuře bez přístupu vnějšího záření. Reakce byly prováděny jak za použití čerstvě destilovaných rozpouštědel, tak i rozpouštědel komerčně dostupných, pod inertní atmosférou i bez ní.

Při žádné z uvedených optimalizací ovšem nebylo, dle ^1H NMR spekter, pozorováno vyšší zastoupení bromovaného produktu 8. Lišilo se vždy i složení vedlejších produktů. Nejen, že se měnil poměr intenzit jednotlivých signálů ve spektru, v sérii spekter se měnil i jejich počet bez žádné pozorované pravidelnosti. Spektra se často nepodařilo interpretovat.

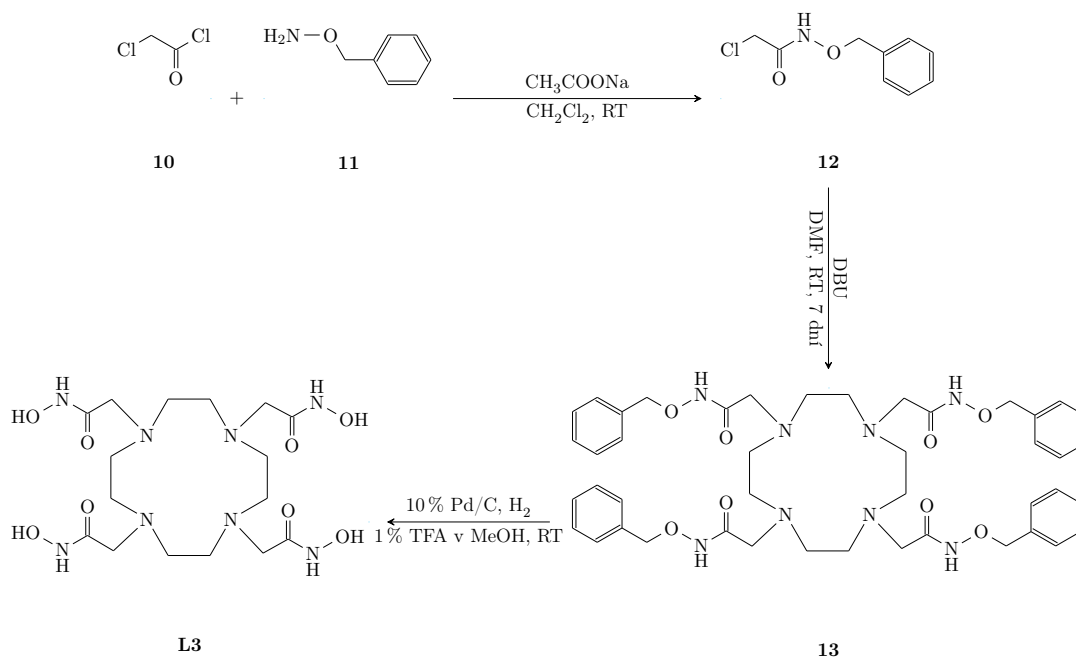
Veškeré pokusy o izolaci látky 8 a tedy o ořípravu L2 tak byly neúspěšné.

vzorec	$C_{12}H_{20}O_3Si$
M_R	240,37
barva a tvar	bezbarvé prisma
rozměry [mm]	$0,305 \times 0,746 \times 0,875$
soustava	monoklinická
prostorová grupa	P 1 $2_1/n$ 1
a [Å]	9,4343(3)
b [Å]	9,5177(3)
c [Å]	15,3603(5)
α [°]	90
β [°]	93,6726(10)
γ [°]	90
V [Å ³]	1376,41(8)
Z	4
D_C [g cm ⁻¹]	1,160
absorpční koeficient [mm ⁻¹]	0,162
$F(000)$	520
celkový počet difrakcí	3168
počet pozorovaných difrakcí ($I > 2\sigma(I)$)	2861
data; omezení; parametry	3168/0/151
g.o.f.	4,921
$R_1(I > 2\sigma(I)); R_2$ (všechna data)	0,0388;0,0434
$wR_1(I > 2\sigma(I)); wR_2$ (všechna data)	0,0732;0,0735
maximální změna / e.s.d.	0,332/-0,374

Tabulka 4.1: Vybrané parametry pro látku **7**.

4.3 Příprava hydroxamátového ligandu a studium komplexu $[\text{Zr}^{4+}(\text{L3})]$

Jak bylo uvedeno, kationty Zr^{4+} vykazují vysokou afinitu k hydroxamátovým skupinám. DFO, který je stále nejpoužívanějším ligandem pro komplexaci Zr^{4+} , obsahuje pouze tři takovéto skupiny a nedochází tedy k nasycení koordinační sféry kovu. **L3** byl navržen tak, aby obsahoval čtyři hydroxamátové skupiny a byl tedy schopný koordinovat kationty Zr^{4+} oktadentálně. Postup jeho přípravy je znázorněno na obrázku 4.5.



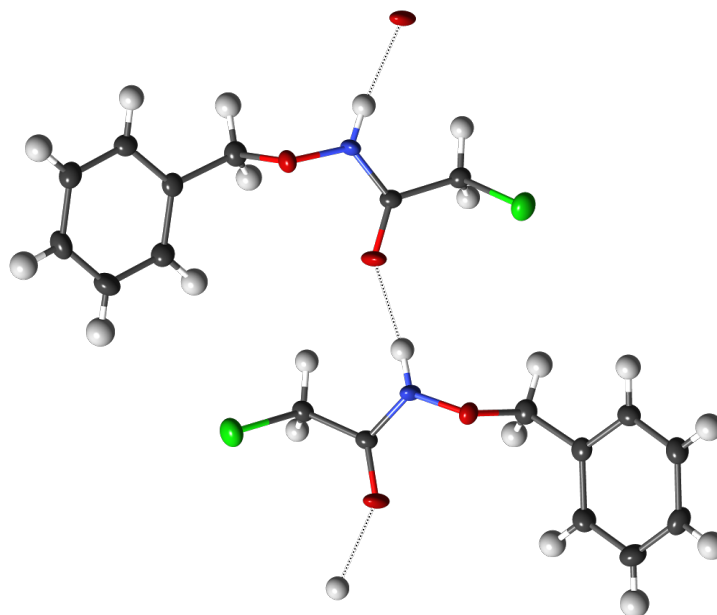
Obrázek 4.5: Schéma přípravy ligandu **L3**.

V prvním kroku reaguje nadbytek chloridu kyseliny **10** s hydroxylaminem **11** za vzniku alkylačního činidla **12**. Reakce je prováděna v dichlormethanu, za bázi byl zvolen octan sodný. Po 90 minutách je báze odfiltrována a roztok odpařen dosucha. Čistá látka **12** je získána po chromatografii s výtěžkem 72 %.

Odpařením reakční směsi dosucha je odstraněn přebytek chloridu **10**, jehož teplota varu je 105°C . I po opakovaném odpařování s CH_2Cl_2 , zůstává jeho část v odparku. Protřepáním vodou a nasyceným roztokem hydrogenuhličitanu sodného je toto zbylé množství zhydrolyzováno a převedeno do vodné fáze. Tímto způsobem jsou také odstraněny zbytky octanu sodného.

Reakce byla sledována pomocí HPLC, již po jedné hodině se ve směsi ne nachází žádný výchozí *O*-benzylhydroxylamin. Po zpracování reakční směsi odpařením a protřepáním je v odparku podle HPLC dominantně cílový produkt, obsahuje ovšem i malé množství nečistot. Přečištění na sloupcové chromatografii jsou všechny nečistoty odstraněny. Látku **12** se podařilo získat z roztoku ethylacetátu s hexanem (1:10) ve formě monokrystalu, jehož struktura byla určena pomocí rentgenové strukturní analýzy, viz obrázek 4.6 a tabulka 4.2. Dvě molekuly jsou svázány vodíkovými můstky o délce $d(\text{N-H}\cdots\text{O}) = 2,75\text{\AA}$ a úhlu $\angle(\text{N-H}\cdots\text{O}) = 169,6^\circ$.

Dalším stupněm v syntéze **L3** je příprava tetrasubstituovaného cyklu **13**.



Obrázek 4.6: Struktura sloučeniny **12** s vyznačenými vodíkovými můstky (tečkovaně).

vzorec	$C_9H_{10}ClNO_2$
M_R	199,63
barva a tvar	bezbarvé tenké destičky
rozměry [mm]	$0,336 \times 0,256 \times 0,044$
soustava	ortorombická
prostorová grupa	$Pca2_1$
a [Å]	9,5426(3)
b [Å]	14,0606(5)
c [Å]	7,0395(2)
α [°]	90
β [°]	90
γ [°]	90
V [Å ³]	944,52(5)
Z	4
D_C [g cm ⁻³]	1,404
absorpční koeficient [mm ⁻¹]	0,369
$F(000)$	416
celkový počet difrakcí	2161
počet pozorovaných difrakcí ($I > 2\sigma(I)$)	1964
data; omezení; parametry	2161/1/118
g.o.f.	1,060
$R_1(I > 2\sigma(I)); R_2$ (všechna data)	0,0291;0,0350
$wR_1(I > 2\sigma(I)); wR_2$ (všechna data)	0,0663;0,0689
maximální změna / e.s.d.	0,178/-0,240

Tabulka 4.2: Vybrané parametry pro monokrystal látky **12**.

Ten vzniká reakcí lehkého nadbytku látky **12** (12,5 %) s cyklenem. Nejvhodnější rozpouštědlem pro tuto reakci se ukázalo být DMF s bází DBU.

Průběh reakce lze velmi dobře sledovat pomocí HPLC pomocí metody M1, viz chromatogramy na obrázku 4.7. Z chromatogramů je patrné, jak postupně vznikají různě substituované deriváty cyklu (přiřazení signálů v chromatogramu bylo provedeno pomocí MS). Již po několika hodinách vzniká disubstituovaný derivát. Po třech dnech je dominantní trisubstituovaný produkt. Po pěti dnech je v roztoku přibližně stejné zastoupení tri- a tetrasubstituovaného cyklu. Chromatogramy nelze interpretovat pouze podle relativní intenzity jednotlivých signálů, protože každý derivát má odlišný excitační koeficient. Lze předpokládat, že ten roste s rostoucím počtem benzylových skupin v molekule. Proto například i v případě chromatogramu měřeného po 5 dnech, kdy se intenzita signálů pro tri- i tetrasubstituovaný derivát zdají být stejné, je v roztoku koncentrace trisubstituovaného cyklu vyšší než tetrasubstituovaného.

Po týdnu míchání při laboratorní teplotě není ve směsi téměř žádný výchozí chlorid **17** a nejvíce zastoupený je tetrasubstituovaný produkt, s malým množstvím trisubstituovaného. Produkt lze izolovat použitím flash chromatografie. Chromatogram získaný po izolaci látky **13** je také na obrázku 4.7. Výtěžek této reakce je 55 %.

NMR spektra produktu je potřeba měřit v silně polárním rozpouštědle, jako je DMSO, protože kvůli volné rotaci kolem $-\text{CH}_2-$ skupiny postranního řetězce dochází ke vzniku více konformerů a příslušné signály ve spektru jsou velmi široké. Tuto rotaci lze urychlit zvýšením teploty, při které je spektrum měřeno. Ve spektru je tedy pozorován pouze průměrný stav a dochází ke zúžení signálu. Ovšem i při teplotě 55° C (v CD_3OD) dochází k tomuto zúžení pouze slabě.

Pro optimalizaci této reakce bylo zkoumáno mnoho změn reakčních podmínek. Reakce byla provedena s řadou různýchází jako DIPEA, bezvodý uhličitán draselný a cesný, DBU a DBN. Z uvedených látek se ukázala jako nejvhodnější báze DBU. Při použití ostatních (s výjimkou DBN) sice také docházelo k reakci a pomocí HPLC byl pozorován vznik tetrasubstituovaného produktu, ovšem ani při zvyšování nadbytku báze nedocházelo k růstu zastoupení tohoto produktu mezi ostatními méně substituovanými deriváty. Použití heterogenní báze se ukázalo jako nevhodné, jelikož docházelo ke ztrátám produktu, který zůstával vázaný na pevnou fázi. Při použití DBN byl sice po pár dnech pozorován pouze signál tetrasubstituovaného produktu, ovšem intenzita tohoto signálu byla výrazně menší, než při použití DBU. Také za těchto podmínek vznikaly další neidentifikované produkty a pravděpodobně docházelo i k rozkladu výchozí látky.

Studována byla také závislost rychlosti reakce na teplotě. Reakce byla prováděna s bází DBU a DNB při laboratorní teplotě a při zahřívání na 40° C, 60° C a 80° C. Všechny tyto reakce byly sledovány pomocí HPLC. Ve všech případech byla s rostoucí teplotou pozorována vyšší rychlost reakce. S růstem teploty ale dochází k přibývání dalších, nejspíše rozkladných produktů. Pokusy o izolaci tetrasubstituovaného produktu **13** získaného při vyšší teplotě byly úspěšné jen částečně, jelikož ani po čištění pomocí flash chromatografie nebyl získán produkt o takové čistotě, jako při provádění reakce za laboratorní teploty.

Pokud je reakce prováděna v gramové škále, dochází ke krystalizaci tetrasubstituovaného produktu **13** z vodného roztoku surové reakční směsi po odpaření rozpouštědla ve formě bílé pevné látky.

vzorec	$C_{44}H_{56}N_8O_8$
M_R	824,96
barva a tvar	bezbarvá prisma
rozměry [mm]	$0,165 \times 0,154 \times 0,152$
soustava	triklinická
prostorová grupa	$P\bar{1}$
a [Å]	9,3510(7)
b [Å]	10,8657(11)
c [Å]	11,7762(8)
α [°]	88,274(4)
β [°]	83,339(2)
γ [°]	64,551(2)
V [Å ³]	1072,87(15)
Z	1
D_C [g cm ⁻¹]	1,277
absorpční koeficient [mm ⁻¹]	0,728
$F(000)$	440
celkový počet difrakcí	4229
počet pozorovaných difrakcí ($I > 2\sigma(I)$)	3660
data; omezení; parametry	4229/0/279
g.o.f.	1,039
$R_1(I > 2\sigma(I)); R_2$ (všechna data)	0,0350;0,0420
$wR_1(I > 2\sigma(I)); wR_2$ (všechna data)	0,0843;0,0887
maximální změna / e.s.d.	0,259/-0,190

Tabulka 4.3: Vybrané parametry pro monokrystal látky **13**.

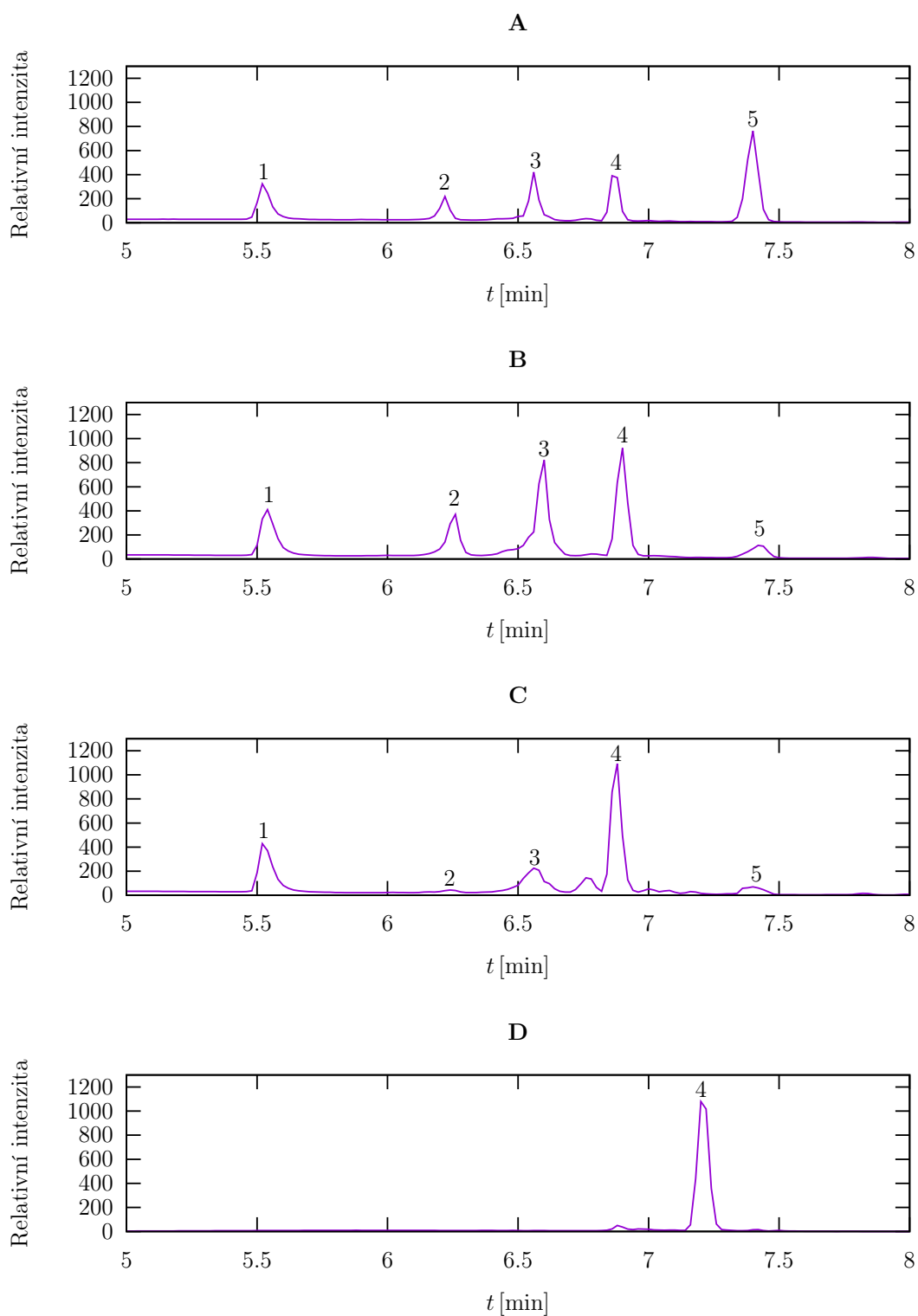
Látku **13** se podařilo získat v roztoku methanolu s vodou ve formě monokrystalu, jehož struktura byla určena pomocí rentgenové strukturní analýzy, viz obrázek 4.8 a tabulka 4.3. Jak lze pozorovat, je molekula stabilizována dvěma vodíkovými můstky, které také přispívají k rozšíření ¹H NMR spekter ($d(N-H \cdots N) = 2,91 \text{ \AA}$, $\angle(N-H \cdots N) = 162,3^\circ$).

Posledním krokem při přípravě **L3** je hydrogenace tetrasubstituovaného produktu **13**. Reakce probíhá s katalyzátorem 10 % Pd/C pod balónkem naplněným plynným vodíkem.

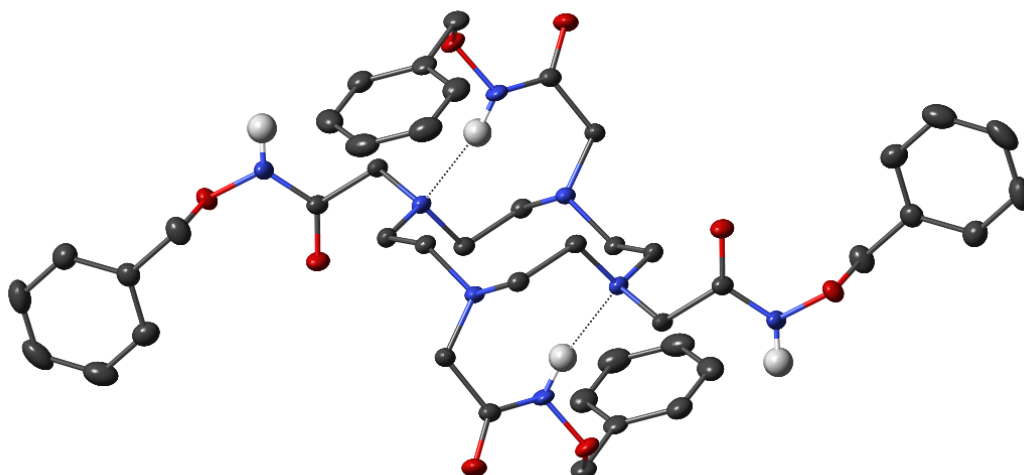
Jako nejvhodnější rozpouštědlo se ukázal být 1 % roztok TFA v methanolu. Za laboratorní teploty je veškerá výchozí látka **13** převedena na **L3** během 3 hodin. Průběh reakce je opět možno sledovat pomocí HPLC, obdobně jako při přípravě látky **13**. Výchozí látka **13** se čtyřmi benzylovými skupinami postupně přechází na méně substituované deriváty, jak je patrné z chromatogramů na obrázku 4.9. Derivát se dvěma benzylovými skupinami se vyskytuje ve formě *cis* a *trans*, takže v chromatogramu mu přísluší dva signály s velmi blízkým retenční časem. Po 3 hodinách je v roztoku přítomný dominantně produkt **L3** a velmi malé množství monosubstituovaného derivátu.

Posledním krokem je rozdělení reakční směsi pomocí flash chromatografie. Produkt **L3** byl získán po lyofilizaci příslušných frakcí ve formě **L3·2,2TFA·2,1H₂O**.

Reakce byla provedena také pouze v methanolu, hydrogenace ovšem probíhá pomaleji z důvodu špatné rozpustnosti látky **13** v tomto rozpouštědle.



Obrázek 4.7: Chromatogramy získané v průběhu přípravy látky **13** po 1 (**A**), 5 (**B**) a 7 (**C**) dnech reakce. Číslo 1 značí DBU, 2, 3 a 4 značí di-, tri- a tetrasubstituovaný derivát cyklohexenu. Číslem 5 je označena výchozí látka **12**. Na obrázku **D** je chromatogram látky **13** po přečištění pomocí flash chromatografie. Všechny chromatogramy byly získány metodou M1.



Obrázek 4.8: Struktura sloučeniny **13** s vyznačenými vodíkovými můstky (tečkovaně). Pro přehlednost nejsou znázorněny atomy vodíku (s výjimkou vodíků vázaných na hydroxamové skupiny).

Vzhledem k vodíkovým vazbám v molekule jsou signály v ^1H NMR spektru za teploty 25°C velmi široké a pravděpodobně jsou složeny z více překrývajících se signálů. Pokud je ovšem spektrum měřeno při zahřívání na 90°C , dochází ke zúžení signálů a také ke ztrátě multiplicity. Při obazičtění vzorku pomocí LiOD je tento efekt ještě znatelnější. Tato zmíněná ^1H NMR spektra lze porovnat na obrázku 4.10.

Acidobazické vlastnosti ligandu **L3**

Z dat získaných při potenciometrické titraci ligandu **L3** bylo pomocí programu *OPIUM* určeno šest protonizačních konstant, viz tabulka 4.4. Z těchto hodnot byl sestaven ditribuční diagram na obrázku 4.11. Porovnáním s protonizačními konstantami ligandu DOTA [37] můžeme nejvyšší protonizační konstantu přiřadit protonizaci na atomu dusíku makrocyklu. Následující dvě konstanty přísluší nejspíše další protonizaci makrocyklu a protonizaci jedné z hydroxamových skupin, nelze ovšem rozlišit jejich pořadí. Poslední tři konstanty náležejí protonizaci zbylých hydroxamových skupin. Jak lze pozorovat z tabulky 4.4, jsou hydroxamové skupiny ligandu **L3** mnohem bazičtější než karboxylové skupiny ligandu DOTA [37].

Pomocí ^1H NMR bylo dokázáno, že při zahřívání na 95°C přes noc v $0,1\text{ M HCl}$ dochází kvantitativně k hydrolyze na kyselinu DOTA.

Příprava komplexu $[\text{Zr}^{4+}(\text{L3})]$

Pro zjištění podmínek vzniku komplexu $[\text{Zr}^{4+}(\text{L3})]$ byla provedena měření UV-VIS spekter s měnícím se pH. Nejprve bylo proměřeno spektrum samotného roztoku zirkoničitých kationtů (zdroj těchto kationtů byl $\text{ZrOCl}_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$) a roztoku samotného ligandu. Jak je patrné z obrázku 4.12, absorbují oba tyto roztoky

částice	L3		DOTA p <i>K</i> _a
	log β	p <i>K</i> _a	
[H ₆ L] ²⁺	49,91 ± 0,02	5,00	
[H ₅ L] ⁺	44,91 ± 0,02	6,77	2,36
[H ₄ L]	38,13 ± 0,01	8,05	4,13
[H ₃ L] ⁻	30,09 ± 0,01	9,04	4,60
[H ₂ L] ²⁻	21,04 ± 0,01	10,00	9,72
[HL] ³⁻	11,04 ± 0,01	11,04	11,90

Tabulka 4.4: Hodnoty celkových protonizačních konstant a odpovídajících p*K*_a ligandu **L3** vypočítaných programem OPIUM z dat získaných při potenciometrických titracích a srovnání s konsekutivními protonizačními konstantami ligandu DOTA [37]. (*I*(NMe₄Cl) = 0,1 M, 25° C, v případě DOTA *I*(KCl) = 1,0 M, 25° C.)

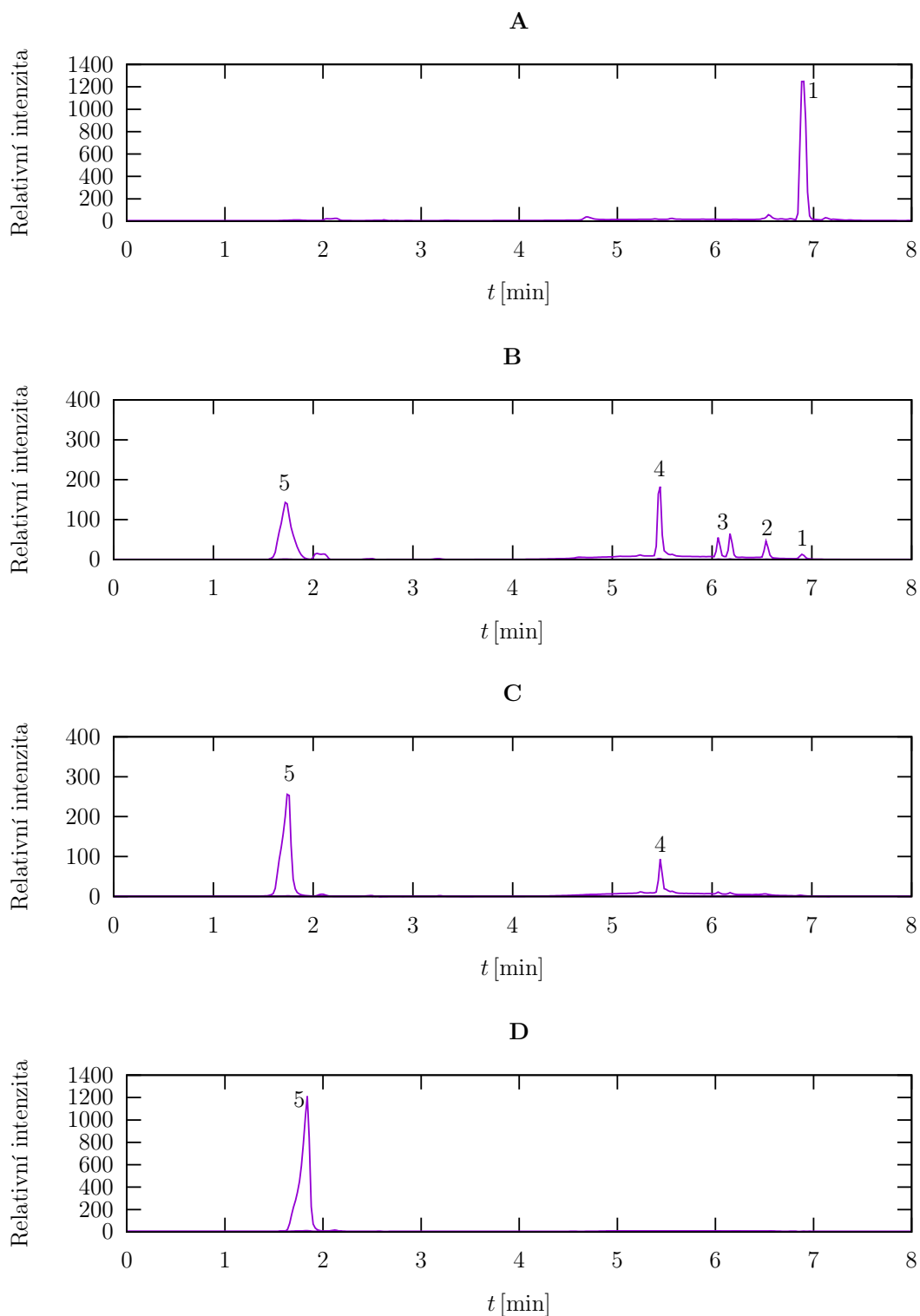
relativně málo. Poté byly připraveny sloučeniny v poměru M:L 1:1 o koncentraci 0,026 · 10⁻³ mM. pH bylo upraveno pomocí HCl (pro pH < 2) a NMe₄OH (pro pH > 2) tak, aby byly získány vzorky o pH 0 až 13. Získaná spektra jsou také na obrázku 4.12. Z těchto dat lze také získat závislost absorbance o daných vlnových délkách na pH, viz obrázek 4.13.

Jak je z obou grafů patrné, ke vzniku komplexu dochází už při pH 0. Do pH přibližně 2 nedochází v roztoku k žádným změnám (na obrázku 4.12 se absorpční spektra příslušných vzorků kryjí). Mezi pH 2 a 4, a poté v rozmezí pH 4 až 5, dochází k dalším změnám absorbancí, poté se již spektra příliš nemění. Pro silně bazické roztoky (pH ≈ 12) dochází k výrazné změně spektra. Lze předpokládat, že při takto vysoké koncentraci hydroxylových aniontů dochází k (alespoň částečnému) rozpadu komplexu a koordinaci OH⁻ na kationt Zr⁴⁺.

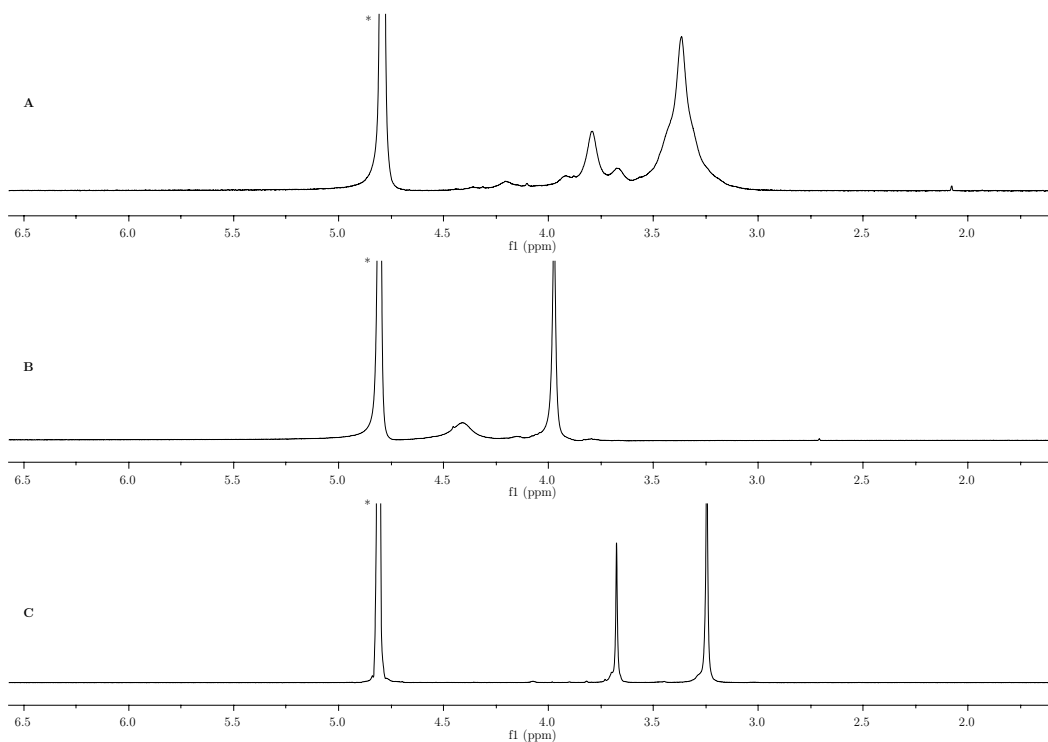
Ze získaných dat je možné uvažovat, že ve velmi kyselém prostředí (pH od 0 do 2) dochází okamžitě ke koordinaci ligandu k iontu kovu, ovšem pravděpodobně pouze částečně, nejspíše pouze dvěma pendantními rameny. Při zvyšování pH se dále koordinuje pravděpodobně třetí i čtvrtá hydroxamová skupiny ligandu.

Při přípravě vzorků o vyšší koncentraci (*c*_L ≈ 10 mmol) dochází při poměru M:L 1:1 už v kyselé oblasti ke vzniku velmi hustého gelu, který se nerozpouští ani při týdenním zahřívání na 95° C. Změnou pH se roztoku vylučují další bezbarvé polymerní částice. Lze tedy předpokládat, že ke koordinaci hydroxamových skupin dochází tak rychle, že nedochází ke vzniku monomerních částic [Zr⁴⁺(**L3**)], ale ke vzniku polymerních částic o proměnlivém složení [Zr_x⁴⁺(**L3**)_y].

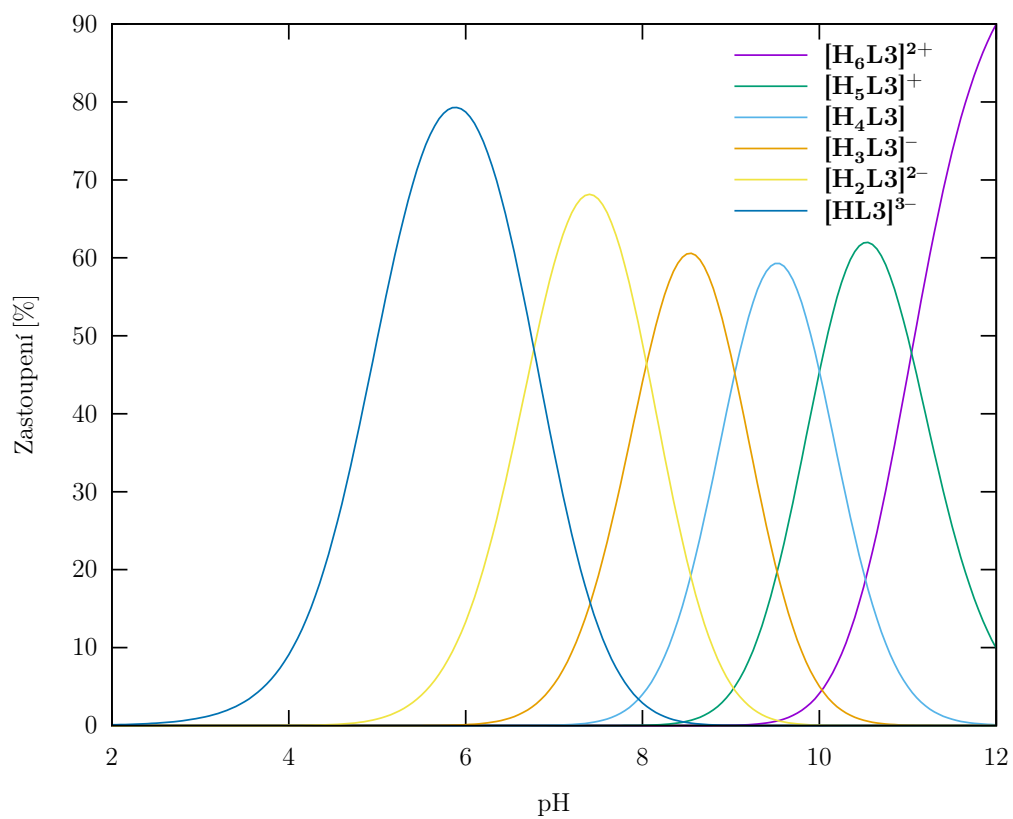
Při okyselení roztoku na velmi nízké pH a snížení koncentrace dochází k rozpouštění gelu. Správnou volbou koncentrace a pH se podařilo cílový monomer připravit. Další možností je přidání kompetitivního ligandu (například oxalátu), čímž by se komplexace měla zpomalit.



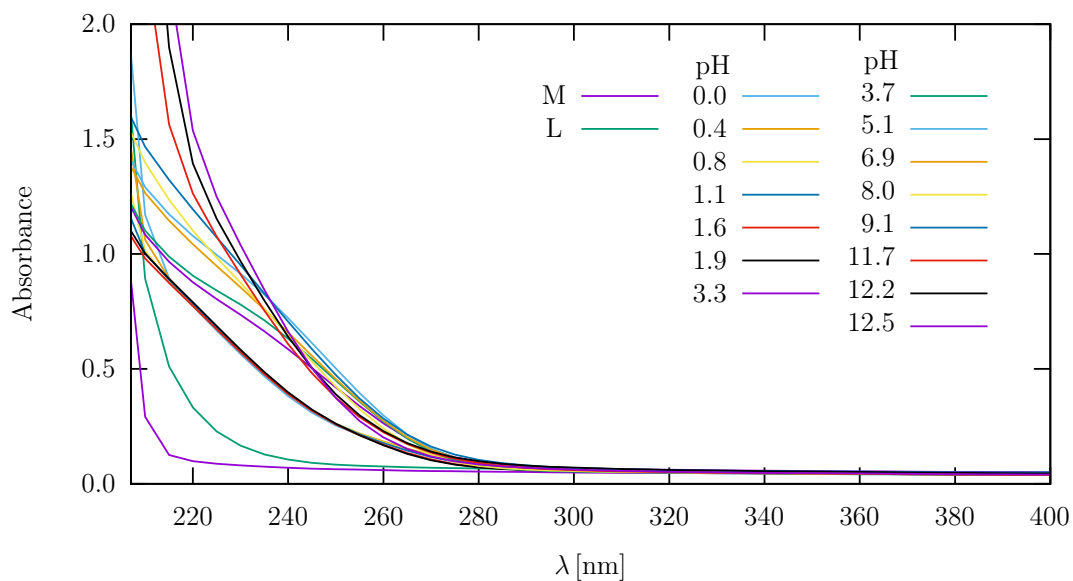
Obrázek 4.9: Chromatogramy získané v průběhu přípravy látky **L3** na počátku hydrogenace (**A**) a po 2 (**B**) a 3 (**C**) hodinách. Číslo 1 značí výchozí tetrabenzylovaný derivát, 2, 3 a 4 značí tri-, di- a monobenzylované deriváty cyklenu. Číslem 5 je označen produkt hydrogenace ligand **L3**. Na obrázku **D** je chromatogram ligandu **L3** po přečištění pomocí flash chromatografie. Všechny chromatogramy byly získány metodou M1.



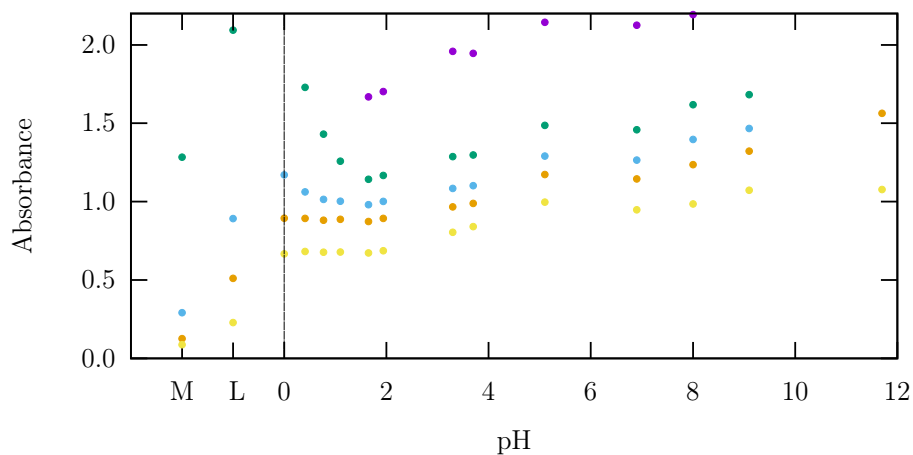
Obrázek 4.10: ^1H NMR spektra ligandu **L3** za odlišných podmínek: (A) 25°C pD 3, (B) 90°C pD 3 a (C) 90°C pD 12. Symbol * značí signál rozpouštědla.



Obrázek 4.11: Distribuční diagram ligandu **L3** ($I(\text{NMe}_3\text{Cl}) = 0,1\text{ M}$, 25°C).



Obrázek 4.12: Absorpční spektra komplexu $[\text{Zr}^{4+}(\mathbf{L3})]$ o pH od 0 do 12. Pro porovnání je znázorněno také spektrum roztoku volného kationu Zr^{4+} (M) a ligandu **L3** (L).



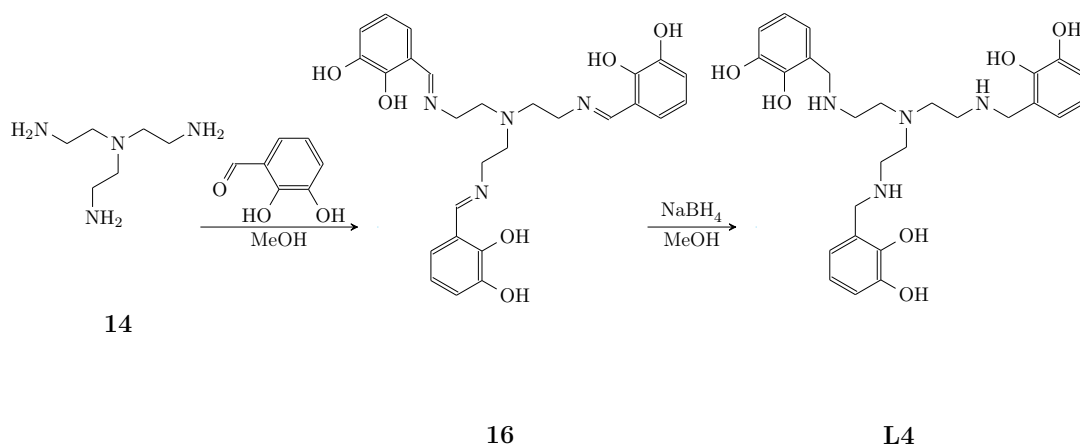
Obrázek 4.13: Absorbance při daných vlnových délkách pro vzorky o pH od 0 do 12. Pro porovnání jsou znázorněny také absorbance roztoku volného kationu Zr^{4+} (M) a ligandu **L3** (L).

4.4 Příprava katecholového ligandu a jeho komplexů

Ligand **L4**, často označován TrenCat, je znám již více jak 15 let. [33] Původně byl navržen pro vázání hlinitých iontů, jako alternativa pro používaný siderofor DFO. Struktura **L4** byla navržena tak, aby byl podobný enterobactinu, dalšímu z přírodních sideroforů. Ten obsahuje tři katecholové skupiny, schopné koordinace. [38] Zkoumány byly také komplexy s Schiffovou bází **16** a jejich derivátů [39].

Do dnešních dnů již byly připraveny komplexy ligandu **L4** s řadou trojmocných kovů [38] včetně iontů lanthanoidů [40, 41] a také s thoričitými kationty [33], které coby čtyřmocné kationty mají se zirkoničitými ionty podobné vlastnosti.

Příprava **L4**, jejíž schéma je na obrázku 4.14, vychází z aminu **14**, který je rozšířen o katecholové pendanty za vzniku Schiffovy báze **16**. Ta je redukcí převedena na cílový produkt **L4**. Celý postup přípravy Schiffovy báze **16** a ligandu **L4** byl převzat z původní literatury [33].



Obrázek 4.14: Schéma při přípravě **L4**.

Prvním krokem reakce je navázání tří katecholových pendantů na amin **14**. Východí látka **14** reaguje spolu s 2,3-dihydroxybenzaldehydem v methanolu, produkt reakce **16** se samovolně sráží z reakční směsi.

Ke vzniku zlatavé sraženiny dochází v roztoku 2,3-dihydroxybenzaldehydu okamžitě po přidání aminu **14**. Produkt **16** je velmi špatně rozpustný ve většině běžných rozpouštědel, s výjimkou dimethylsulfoxidu. Reakce probíhá téměř kvantitativně, bylo získáno 89 % čisté látky.

Druhým stupněm přípravy je redukce látky **16** na cílový ligand **L4** pomocí tetrahydridoboritanu sodného. V průběhu přidávání tetrahydridoboritanu sodného se suspenze látky **16** v methanolu pomalu rozpouští za vzniku žlutého roztoku, který se dalším přidávkem redukčního činidla postupně odbarvuje. Roztok je následně naředěn nadbytkem kyseliny chlorovodíkové a po noci stání v chladu dochází ke srážení NaCl. Čistý produkt byl získán odpařením rozpouštědla ve formě bílého prášku, výtěžek reakce byl 63 %.

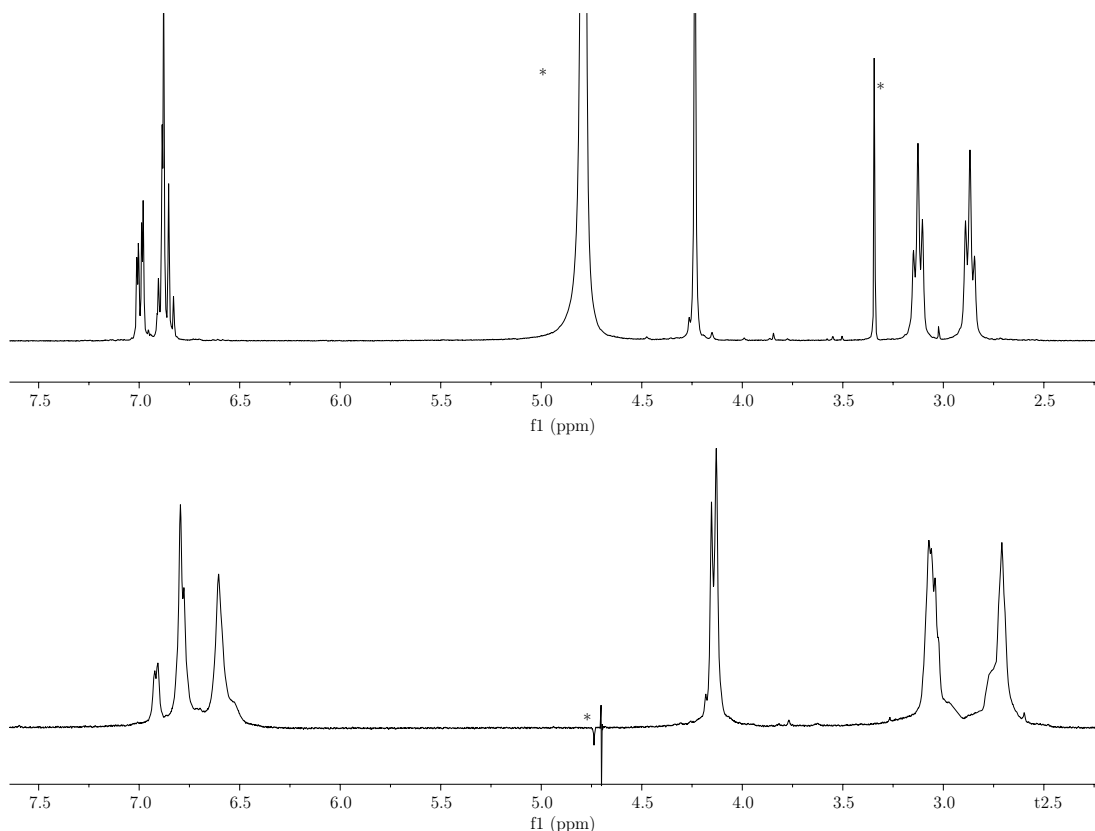
Oproti původní literatuře byl namísto KBH₄ použit NaBH₄. Volba tetrahydridoboritanu draselného oproti sodnému je vhodnější, vzhledem k nižšímu součinu rozpustnosti KCl než NaCl v methanolu [42]. Použití LiBH₄ se ukázalo jako nevhodné, protože téměř nedocházelo ke srážení LiCl.

Příprava komplexů $[\text{Zr}^{4+}(\text{L4})]$, $[\text{Ga}^{3+}(\text{L4})]$ a $[\text{Zn}^{2+}(\text{L4})]$

Byly studovány komplexy **L4** s Ga^{3+} , Zr^{4+} a Zn^{2+} kationty. Ve všech případech byly komplexy připravovány v poměru ligandu a kovu 1:1.

Po hodině míchání při laboratorní teplotě se jednotlivé roztoky zbarvily do odlišných barev. Roztok s kationty Zr^{4+} byl zbarven tmavěfialově, s Ga^{3+} do světle hněda a roztok s Zn^{2+} pouze lehce zežloutl. Mnohem menší intenzita zabarvení u roztoku s kationty Zn^{2+} oproti ostatním lze vysvětlit předpokladanou koordinací pouze dusíkovými atomy, nikoli kyslíkovými.

Při zvyšování pH roztoku se Zn^{2+} a Ga^{3+} kationty docházelo k vylučování sraženiny při pH 4,0, resp. při pH 3,5. V obou případech dle MS odpovídá sraženina koordinační sloučenině o poměru L:M 1:1. Bylo naměřeno ^1H NMR spektrum obou těchto látek. Spektra si zachovávají stejný charakter jako spektrum volného ligandu. Oproti původnímu spektru volného ligandu dochází ke zvýšení multiplicity jednotlivých signálů z důvodu ztráty ekvivalence vodíků ligandu po koordinaci ke kationtu kovu. Pro srovnání je na obrázku 4.15 zobrazeno spektrum volného ligandu a spektrum komplexu s kationty Ga^{3+} .



Obrázek 4.15: ^1H NMR spektra ligandu **L4** (nahore) a komplexu **L4** s kationty Ga^{3+} . Symbol * značí signály rozpouštědel.

Při zvyšování pH roztoku s kationty Zr^{4+} zůstával roztok čirý až do pH 8,5. Poté vznikla tmavě fialová sraženina. V průběhu přidávání hydroxidu byly odebrány vzorky roztoku při pH 3,0 a 4,5. Ty byly odpařeny na rotační vakuové odparce dosucha. Látky získané při odpaření roztoku i sraženina odpovídají (podle MS) koordinační sloučenině v poměru M:L 1:1. Roztoky těchto sloučenin se ovšem

ukázaly být dlouhodobě nestálé, v jejich vodném roztoku docházelo už po dni stání ke vzniku sraženiny.

Ligand **L4** sám se ukázal v bazické oblasti jako nestálý, postupně docházelo k jeho degradaci a stáním černal. Od $\text{pH} \approx 9$ docházelo k vylučování tmavé, velmi obtížně rozpustné sraženiny. Ani po zpětném okyselení se sraženina nerozpouštěla a roztok se neodbarvoval zpět. ^1H NMR spektra získaná jak při $\text{pH} \geq 7$, tak i po zpětném okyselení jsou neinterpretovatelná. Pravděpodobně docházelo k oxidaci katecholových skupin a k jejich rozkladu na sloučeniny chinonu.

Z důvodu špatné rozpustnosti koordinačních sloučenin **L4** s kationty a nestabilitě samotného **L4** nebyly tyto látky dále studovány.

5. Závěr

V této práci byly zkoumány ligandové systémy pro koordinaci zirkoničitých kationtů. Byly navrženy syntézy tří nových ligandů na bázi makrocyclické kostry (cyklen) s různými pendantními rameny. Pokusy o přípravu ligandu **L1** a **L2** byly neúspěšné z důvodu nestability meziproductů a jejich obtížné izolace při syntéze. Byl připraven hydroxamátový ligand **L3** a jeho syntéza byla optimalizována. Potenciometrickou titrací byly získány protonizační konstanty. Ty byly přiřazeny a porovnány s karboxylovým analogem tohoto ligandu (DOTA). Dále byla studována tvorba komplexu $[\text{Zr}^{4+}(\mathbf{L3})]$ UV-VIS spektrofotometrií. Bylo ukázáno, že ke koordinaci kationtu kovu dochází již při pH 0, zvyšováním pH roztoku se koordinují další hydroxamátové skupiny. V silně bazické oblasti dochází nejspíše k rozkladu komplexu. Při vyšších koncentracích dochází ke vzniku polymerních sloučenin, jejich složení je závislé na mnoha faktorech jako je pH, koncentrace či teplota. Tento děj je pravděpodobně možné omezit použitím dalšího kompetitivního ligandu. Izolace komplexu o poměru M:L 1:1 a určení jeho vlastností bude náplní dalšího studia. Také budou studovány podmínky vzniku a vlastnosti koordinačních sloučenin tohoto ligandu s lanthanoidy.

Dále byl připraven ligand **L4** a byly získány komplexní sloučeniny s kationty Zn^{2+} , Ga^{3+} a Zr^{4+} . Samotný ligand se ovšem ukázal být v roztoku nestabilní, proto byly další studie opuštěny.

6. Seznam zkratek

AIBN – 2,2'-azobis(2-methylpropionitril)
CT – počítačová tomografie
DBN – 1,5-diazabicyclo[4.3.0]non-5-en
DBU – 1,8-diazabicyklo[5.4.0]undec-7-en
DFO – desferrioxamin B
DIPEA – *N,N*-diisopropylethylamin
DMF – *N,N*-dimethylformamid
DMSO – dimethylsulfoxid
DOTA – kyselina 1,4,7,10-tetraazacyclododekan-1,4,7,10-tetraoctová
DTPA – kyselina diethylentriaminpentaoctová
EA – elementární analýza
EDTA – kyselina ethylendiamintetraoctová
¹⁸F-FDG – 2-[¹⁸F]fluoro-2-deoxyglukóza
TFA – kyselina trifluoroctová (trifluoroacetic acid)
FTP – 2,3,5,6-tetrafluorfenol
HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie (high-performance liquid chromatography)
mAb – monoklonní protilátka (antibody)
MeCN – acetonitril
MRI – magnetická rezonance
MS – hmotnostní spektrometrie
NBS – *N*-bromosuccinimid
NMR – nukleární magnetická rezonance
PBC – pyridinium bromochromát
PET – pozitronová emisní tomografie
RT – pokojová teplota
RTG – rentgenová strukturní analýza
SPECT – jednofotonová emisní tomografie (single photon emission computed tomography)
TBDMSCl – *tert*-butyldimethylsilylchlorid

Literatura

- [1] M. R. A. Pillai, A. Dash, F. R. Knapp, *Journal of Nuclear Medicine* **2013**, *54*, 313–323.
- [2] I. Verel, G. W. Visser, G. A. van Dongen, *Journal of Nuclear Medicine* **2005**, *46*, 164S–171S.
- [3] M. A. Deri, B. M. Zeglis, J. S. Lewis, L. C. Francesconi, *Nuclear Medicine and Biology* **2013**, *40*, 3–14.
- [4] https://en.wikipedia.org/wiki/Electron%E2%80%93positron_annihilation.
- [5] M. E. Phelps, *PET: Molecular Imaging and Its Biological Applications*, Springer-Verlag New York, **2004**.
- [6] G. A. van Dongen, G. W. Visser, M. N. Lub-de Hooge, E. G. de Vries, L. R. Perk, *The Oncologist* **2007**, *12*, 1379–1389.
- [7] F. T. Lee, A. M. Scott, *Journal of Nuclear Medicine* **2003**, *44*, 1282–1283.
- [8] B. M. Zeglis, J. S. Lewis, *Dalton Transactions* **2011**, *40*, 6168–6195.
- [9] A. M. Wu, *Journal of Nuclear Medicine* **2009**, *50*, 2–5.
- [10] F. C. J. Van de Watering, M. Rijpkema, L. Perk, U. Brinkmann, W. J. G. Oyen, O. C. Boerman, *BioMed Research International* **2014**, *2014*.
- [11] J. P. Holland, M. J. Williamson, J. S. Lewis, *Molecular Imaging* **2010**, *9*, 1–20.
- [12] Y. Zhang, H. Hong, W. Cai, *Current Radiopharmaceuticals* **2011**, *4*, 131–139.
- [13] J. P. e. a. Holland, *Molecular Imaging* **2009**, *36*, 729–739.
- [14] A. Kasbollah, P. Eu, S. Cowell, P. Deb, *Journal of Nuclear Medicine Technology* **2013**, *41*, 35–41.
- [15] G. W. Severin, J. W. Engle, T. E. Barnhart, R. J. Nickles, *Medicinal Chemistry* **2011**, *7*, 389–394.
- [16] T. Kiss, E. Farkas, *Journal of Inclusion Phenomena and Molecular Recognition in Chemistry* **1998**, *32*, 385–403.
- [17] W. E. Meijs, J. D. Herscheid, H. J. Haisma, H. M. Pinedo, *International Journal of Radiation Applications and Instrumentation. Part A. Applied Radiation and Isotopes* **1992**, *43*, 1443 – 1447.
- [18] J. P. Holland, V. Divilov, N. H. Bander, P. M. Smith-Jones, S. M. Larson, J. S. Lewis, *Journal of Nuclear Medicine* **2010**, *51*, 1293–1300.

- [19] F. Guérard, Y.-S. Lee, R. Tripier, L. P. Szajek, J. R. Deschamps, M. W. Brechbiel, *Chemical Communications* **2013**, *49*, 1002–1004.
- [20] F. Guérard, Y.-S. Lee, M. W. Brechbiel, *Chemistry – A European Journal* **2014**, *20*, 5584–5591.
- [21] M. Patra, A. Bauman, C. Mari, C. A. Fischer, O. Blacque, D. Haussinger, G. Gasser, T. L. Mindt, *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 11523–11525.
- [22] D. Pandya, S. Pailloux, D. Tatum, D. Magda, T. Wadas, *Chemical Communications* **2015**, *51*, 2301–2303.
- [23] D. J. Berry, Y. Ma, J. R. Ballinger, R. Tavaré, A. Koers, K. Sunassee, T. Zhou, S. Nawaz, G. E. D. Mullen, R. C. Hider, P. J. Blower, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 7068–7070.
- [24] M. T. Ma, L. K. Meszaros, B. M. Paterson, D. J. Berry, M. S. Cooper, Y. Ma, R. C. Hider, P. J. Blower, *Dalton Transactions* **2015**, *44*, 4884–4900.
- [25] M. A. Deri, S. Ponnala, B. M. Zeglis, G. Pohl, J. J. Dannenberg, J. S. Lewis, L. C. Francesconi, *Journal of Medicinal Chemistry* **2014**, *57*, 4849–4860.
- [26] J. Xu, *Journal of Medicinal Chemistry* **2002**, *45*, 3963–3971.
- [27] A. E. V. Gorden, J. Xu, K. N. Raymond, P. Durbin, *Chemical Reviews* **2003**, *103*, 4207–4282.
- [28] M. A. Deri, S. Ponnala, P. Kozlowski, B. P. Burton-Pye, H. T. Cicek, C. Hu, J. S. Lewis, L. C. Francesconi, *Bioconjugate Chemistry* **2015**, *26*, 2579–2591.
- [29] W. Armarego, C. Chai, *Purification of Laboratory Chemicals*, Elsevier Science, **1988**.
- [30] M. Kývala, I. Lukeš, *Opium*, International Conference Chemometrics 95, str. 63, Pardubice, Česká republika. <http://www.natur.cuni.cz/~kyvala/opium.html>.
- [31] T. Williams, C. Kelley, many others, *Gnuplot 5.0: an interactive plotting program*, <http://gnuplot.sourceforge.net/>, **2014**.
- [32] T. J. Ferris, P. Charoenphun, L. K. Meszaros, G. E. D. Mullen, P. J. Blower, M. J. Went, *Dalton Transactions* **2014**, *43*, 14851–14857.
- [33] A. Bismondo, C. Comuzzi, P. D. Bernardo, P. L. Zanonato, *Inorganica Chimica Acta* **1999**, *286*, 103 – 107.
- [34] A. Okáč, *Analytické reakce*, Československá akademie věd, Praha, **1965**.
- [35] F. D. C. Fim, T. Machado, D. S. De Sá, P. R. Livotto, Z. N. Da Rocha, N. R. D. S. Basso, G. B. Galland, *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **2008**, *46*, 3830–3841.
- [36] S. Amatori, G. Ambrosi, M. Fanelli, M. Formica, V. Fusi, L. Giorgi, E. Macedi, M. Micheloni, P. Paoli, R. Pontellini, P. Rossi, *The Journal of Organic Chemistry* **2012**, *77*, 2207–2218.

- [37] A. Pasha, G. Tircsó, E. Benyó, E. Brücher, A. Sherry, *European Journal of Inorganic Chemistry* **2007**, 4340–4349.
- [38] S. Sahoo, B. Kanungo, M. Baral, *Monatshefte für Chemie - Chemical Monthly* **2009**, *140*, 139–145.
- [39] M. Albrecht, S. Burk, R. Stoffel, A. Lüchow, R. Fröhlich, M. Kogej, C. A. Schalley, *European Journal of Inorganic Chemistry* **2007**, 1361–1372.
- [40] A. Bismondo, P. D. Bernardo, R. Portanova, M. Tolazzi, P. L. Zanonato, *Polyhedron* **2002**, *21*, 1393 – 1396.
- [41] P. Di Bernardo, P. L. Zanonato, A. Bismondo, A. Melchior, M. Tolazzi, *Dalton Transactions* **2009**, 4236–4244.
- [42] S. P. Pinho, , E. A. Macedo, *Journal of Chemical and Engineering Data* **2005**, *50*, 29–32.