

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Chemie
Studijní obor: Medicinální chemie



Michal Chrappa

Syntéza nesymetricky substituovaných derivátov cyklámu
Synthesis of asymmetrically substituted derivatives of cyclam

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

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

Praha, 2021

Obsah

1. Teoretický úvod	7
1.1. Rádiomedicína a tomografické metódy	7
1.2. Nuklidy medi v rádiomedicíne.....	9
1.3. Vlastnosti a chémia komplexov medi.....	10
1.4. Ligandy vhodné pre komplexáciu Cu^{2+}	11
1.5. Makrocyclické ligandy	12
1.6. Karboxymetylové pendantné ramená.....	14
1.7. Pendantné ramená odvodené od kyselín fosforu	15
1.8. Spôsobochy chránenia amínových skupín cyklámu	18
1.8.1. Chránenie cyklámu v polohe 1,8	18
1.8.2. Selektívne chránenie troch polôh cyklámu	19
2. Ciele práce.....	22
3. Experimentálna časť.....	23
3.1. Všeobecné postupy a použité chemikálie	23
3.2. Metódy charakterizácie.....	23
3.2.1. Tenkovrstvová chromatografia (TLC)	23
3.2.2. Hmotnostná spektrometria (MS)	23
3.2.3. NMR spektroskopia	23
3.3. Syntetická časť.....	24
3.3.1. Príprava 1,8-dibenzylcyklámu (III)	24
3.3.2. Pokusy o zavedenie monofosfonátového ramena na 1,8-dibenzyl cyklám	25
3.3.3. Pokusy o vytvorenie ortogonálne chráneného cyklámu	28
3.3.4. Pokusy o zavedenie monosfosfonátového ramena na 1,8-diBoc cyklám	32
4. Diskusia	33
4.1. Pokusy o monosubstitúciu na dvakrát chránenom cykláme.....	33
4.1.1. Príprava 1,8-Dibenzylcyklámu (látka III)	34
4.1.2. Príprava látky IV.....	34
4.1.3. Príprava látky X.....	36
4.2. Príprava ortogonálneho chránenia cyklámu	37
5. Záver	40
6. Zoznam použitých skratiek	41
7. Použitá literatúra	42

Prohlášení:

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

V Praze, 21.6.2021

Michal Chrappa

Abstrakt

Radionuklidy mědi mají v nukleární medicíně potenciál jako diagnostická nebo terapeutická léčiva. Izotopy mědi se využívají ve formě koordinačních sloučenin, v kterých jak ligand nejčastěji vystupují různé deriváty 1,4,8,11-tetraazacyklotetradekánu (cyklamu). Vlastnosti daných komplexů se dají modifikovat pomocí pedantních ramen zavedených na aminoskupiny cyklamu. Tato práce si za cíl klade syntézu derivátu cyklamu, asymetricky substituovaného v poloze 1,8- deriváty kyselin fosforu. Přesto, že se cílový ligand nepodařilo připravit, byli prozkoumány různé možnosti substituce na dvakrát chráněném cyklamu, a taky nalezeny nové možnosti ortogonálního chránění cyklamu.

klíčová slova: PET, SPECT, komplexy mědi, chránění cyklamu, fosfonové kyseliny

Abstrakt

Rádionuklidy medi majú v nukleárnej medicíne potenciál ako diagnostické, či terapeutické liečivá. Izotopy medi sa využívajú vo forme koordinačných zlúčenín, v ktorých ako ligand najčastejšie vystupujú rôzne deriváty 1,4,8,11-tetraazacyklotetradekánu (cyklámu). Vlastnosti daných komplexov sa dajú modifikovať pomocou pendantných ramien zavedených na aminoskupiny cyklámu. Táto práca si za cieľ kladie syntézu derivátu cyklámu, asymetricky substituovaného v polohe 1,8- derivátmi kyselín fosforu. Napriek tomu, že sa cieľový ligand nepodarilo pripraviť, boli preskúmané rôzne možnosti substitúcie na dvakrát chránenom cykláme, a tiež nájdené nové možnosti ortogonálneho chránenia cyklámu.

klúčové slová: PET, SPECT, komplexy medi, chránenie cyklámu, fosfónové kyseliny

Abstract

Copper radionuclides have a potential in nuclear medicine as diagnostic or therapeutic agents. Copper isotopes are used in the form of coordination compounds with various ligands, such as derivatives of 1,4,8,11-tetraazacyclotetradecane (cyclam). Properties of such complexes can be modified by pendant arms introduced on amino groups of cyclam. This thesis is aimed on the synthesis of asymmetrically substituted cyclam derivative with derivatives of phosphorous acids in 1,8- position. In spite of the fact, that the target ligand has not been successfully synthesised, various possibilities of substitution on diprotected cyclam were investigated. New possibilities of orthogonal protection of cyclam were found as well.

Keywords: PET, SPECT, copper complexes, cyclam protection, phosphonic acids

Pod'akovanie

Predovšetkým by som sa chcel poďakovať svojim rodičom za to, že mi vždy boli obrovskou oporou a za ich všestrannú podporu. Bez nich by bolo všetko inak a pravdepodobne by ani celé moje štúdium (a táto práca) nebola možná.

Poďakovanie patrí môjmu školiteľovi, prof. Hermannovi, za dôveru, ktorú do mňa vložil, za čas, ktorý mi venoval počas konzultácií, a tiež za povzbudivé slová a množstvo návrhov ako vyriešiť každú problémovú situáciu.

Tiež by som sa chcel poďakovať Dr. Margaréte Vojtíčkovej za pomoc pri oboznamovaní sa zo základmi organickej syntézy. Za jej nekonečnú trpezlivosť, množstvo dobrých rád ohľadom laboratórnej praxe, ako aj za merania NMR a MS spektier.

V neposlednom rade by som sa chcel poďakovať kolegom z veľkej aj malej laboroky za priateľský prístup a ochotu vždy povzbudiť a pomôcť v mnohých chvíľach, kedykoľvek to bolo potrebné.

1. Teoretický úvod

1.1. Rádiomedicína a tomografické metódy

Rádiomedicína je moderný lekársky odbor, ktorý vznikol v polovici 20. storočia. Zameriava sa na neinvazívne zobrazovacie metódy cielené na lokalizovanie nádoru, ale aj na rádioterapiu, zameranú na samotné zničenie nájdeného nádoru. Pri oboch sa používajú radiofarmaká, ktoré musia mať požadované farmakologicko-toxikologické vlastnosti, biologickú účinnosť a presne definované a konštantné zloženie.¹

Najpoužívanejšie zobrazovacie metódy sú magnetická rezonancia (MRI), pri ktorej sa využíva magnetické pole (v užšom zmysle slova však nejde o rádiometódu, hoci sa tak často uvádza) a rádiodiagnostické metódy SPECT a PET, pri ktorých sa využíva sledovanie fotónov vyžiarených aplikovaným rádionuklidom pomocou scintilačných detektorov. Výsledné zobrazenie sledovaných objektov uvedenými tomografickými metódami je trojrozmerné.

Pri metóde SPECT („Single-Photon Emission Computed Tomography“) sa používa kontrastná látka značená γ -žiaričom. Emitovaný fotón, (s ideálnou energiou 100–250 keV)² je zachytený detektorom, ktorý postupne sníma pacienta pod rôznymi uhlami. Integráciou snímok v počítači dostávame zobrazenie distribúcie aplikovanej kontrastnej látky v tele. Najznámejším nuklidom, ktorý sa používa pri metóde SPECT, je ^{99m}Tc.

Princíp metódy PET („Positron Emission Tomography“) spočíva v tom, že v organizme sa pozitron vyžiarený nuklidom zrazí s voľným elektrónom, pričom dôjde k anihilácii a vyžiareniu dvoch fotónov s konštantnou energiou (511 keV) zhruba pod uhlom 180°. Vyžiarenie fotónov je detegované prstencovým detektorom (Obr.1.1), uprostred ktorého je umiestnený pacient. Detektor zaznamenáva miesto, kde sa v organizme zhromažďujú nuklidy vyžarujúce pozitrony, a to umožňuje lokalizovať napr. nádor.



Obrázok 1.1: Tomograf PET³

Ide o metódu, ktorá má vyššiu presnosť v porovnaní s metódou SPECT, keďže emitované pozitróny majú vďaka svojej energii v tkanive relatívne krátky dolet.¹ Ďalšou výhodou je, že je možné metódu PET (aj SPECT) následne kombinovať s metódami MRI alebo CT a tým dosiahnuť tzv. „fused images“, čiže obrazy, na ktorých je možné nádor presne zobrazit' v tele pacienta vďaka spojeniu anatomických obrazov s obrazom distribúcie kontrastnej látky v organizme.

Pre metódu PET sa využívajú nuklidy, ktoré podliehajú premene β^+ . Najčastejšie používaným je izotop ^{18}F , ktorý sa používa predovšetkým vo forme rádiofarmaka [^{18}F]-fluorodeoxyglukózy (^{18}F -FDG). Jeho výhodou pri zobrazovaní je, že emituje pozitrón s pomerne nízkou energiou ($0,63\text{MeV}$)⁴, a jeho krátky dolet v tkanive umožňuje presnejšie lokalizovať miesto anihilácie. V snahe pripraviť čo najširšie spektrum látok, ktoré by bolo možné využiť v rádiomedicíne, sa skúmalo aj využitie iných izotopov nekovových makrobiogénnych prvkov ^{15}O , ^{13}N alebo ^{11}C . Problémom je ale ich krátky polčas rozpadu (122 s – 20,3 min), čo neumožňuje ich využitie pri sledovaní niektorých biologických procesov (problémom je aj logistika takýchto nuklidov). Polčasy rozpadu nuklidov by mali byť dostatočne dlhé na to, aby ich bolo možné pripraviť do formy rádiofarmaka, distribuovať na miesto použitia, dostať vo vhodnej forme do organizmu a dopraviť v organizme do cieľového orgánu z krvného riečiska. Súčasne by však mali byť dostatočne krátke, aby čo najmenej zaťažovali pacienta. Preto sa začali skúmať aj rádionuklidy rôznych kovových prvkov.

Hlavnou výhodou rádionuklidov kovových prvkov, ktoré sa dajú použiť v rádiomedicíne, je široké spektrum ich rádiochemických vlastností, ako napr. polčasov rozpadu (od 1,27 min pri ^{82}Rb až po 5,27 roku pri ^{60}Co), čo umožňuje množstvo potenciálnych aplikácií. Jednou z týchto aplikácií je aj rádioterapia, ktorá je vyhradená takmer výlučne pre kovové nuklidy. Najpoužívanejším z kovových izotopov je $^{99\text{m}}\text{Tc}$,

ktorý sa používa na metódu SPECT, najmä vďaka zautomatizovanému spôsobu výroby ($^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ generátor). Ďalšou výhodou kovov je ich schopnosť vytvárať komplexné zlúčeniny, ktorých vlastnosti sa dajú pomerne dobre modifikovať a vylepšovať.

Spomedzi kovov sa budeme zaoberať izotopmi medi, ktoré majú viacero výhod, ako sa ukazuje v nasledujúcich odstavcoch.

1.2. Nuklidy medi v rádiomedicíne

Spomedzi d-prvkov sa skúmali aj rádionuklidy medi. Ich špecifikom je široké spektrum izotopov s rôznymi rádiochemickými vlastnosťami, ktoré by sa dali použiť v rôznych oblastiach rádiomedicíny. Z týchto nuklidov sa používajú najmä izotopy ^{64}Cu a ^{67}Cu , no uvažovať sa dá aj o ďalších izotopoch uvedených v Tab.1.1. Časť z nich sa kvôli nevhodnému polčasu rozpadu nepoužíva vôbec, alebo len v obmedzenej miere.

Tabuľka 1.1: Prehľad izotopov medi, ich polčas a typ rozpadu, ktorému podliehajú.^{2,5}

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

Z hľadiska využitia prvú skupinu izotopov predstavujú izotopy, ktoré podliehajú β^+ žiareniu, a vďaka tomu sa dajú využiť pri zobrazovacích technikách (PET). Najbežnejším z nich je nuklid ^{64}Cu . Tento nuklid sa dá pripraviť viacerými spôsobmi, ktoré môžu viesť k vyššej alebo nižšej aktivite preparátu.² Význam ^{64}Cu dokladá aj fakt, že bol nedávno FDA schválený prvý komerčne dostupný zobrazovací komplex s ^{64}Cu (Detectnet[®]).⁶

Výhodou nuklidu ^{64}Cu je, že podlieha zároveň aj β^- premene, preto sa dá pri komplexoch s týmto izotopom využiť jeho tzv. teranostika (s diagnostikou súčasne prebieha aj terapia).

Druhú skupinu izotopov medi tvoria nuklidy, pri ktorých sa jadrá stabilizujú premenou neutrónu na protón. Z jadra sa pritom uvoľní elektrón spolu s antineutrónom, pričom sa vyžiari tzv. tvrdé β^- žiarenie. Toto žiarenie má pomerne veľkú energiu, takže nuklid v komplexe je schopný pri svojej premene vyžiarenou energiou ničiť okolité bunky.² Najznámejším nuklidom z tejto skupiny je izotop ^{67}Cu , ktorý má spomedzi izotopov medi najdlhší polčas rozpadu ($\tau_{1/2} = 62,0 \text{ h}$).² Polčas rozpadu je pozitívom z hľadiska jeho prípravy a distribúcie, a umožňuje tiež jeho dostatočné zachytenie cieľnými orgánmi. Negatívom sú problémy s jeho izoláciou v čistom stave pri príprave v cyklotróne, resp. inom urýchľovači.² Najslubnejšou metódou jeho prípravy je využitie tzv. fotonukleárnej reakcie. Tento spôsob výroby sa stále optimalizuje.⁷

Aby bola záťaž pacienta minimalizovaná, dostáva sa nuklid do jeho tela vo forme relatívne stabilného komplexu, ktorý sa naviaže na endogénnu látku, a cez ňu sa selektívne viaže na nádor. S požiadavkou na nízku záťaž pre organizmus súvisí aj stabilita komplexov. Komplexy musia byť termodynamicky stále a kineticky inertné, aby sa v podmienkach, ktoré prevládajú v živých organizmoch, nerozpadli skôr, ako sa stihnú dostať na miesto určenia, resp. sa vylúčiť z organizmu. Na celkovú stabilitu komplexov majú vplyv nielen vlastnosti ligandov, ale aj vlastnosti rádiokovu, na ktorý sa koordinujú. Preto je dôležité pre štúdium komplexov Cu^{2+} vhodných pre použitie v rádiomedicíne uviesť najskôr základné črty chémie medi.

1.3. Vlastnosti a chémia komplexov medi

Meď sa v zlúčeninách najčastejšie vyskytuje v dvoch oxidačných stavoch, ako Cu^+ a Cu^{2+} . Komplexy s Cu^+ nie sú veľmi stabilné, ľahko podliehajú rýchlym výmenám ligandov. Rýchlosť substitúcie je možné ovplyvňovať stericným bránením výmeny zo strany ligandu,⁵ napriek tomu sa komplexy Cu^+ nepovažujú za dostatočne kineticky inertné, aby mohli byť použité v rádiomedicíne.

Častejšie sa v rádiomedicíne využívajú komplexy Cu^{2+} . Dôležitá požiadavka na meďnatý komplex – kinetická inertnosť – sa vďaka nutnosti vytvoriť dobre definované podmienky sleduje obvykle v kyslom prostredí. V tomto prostredí dochádza k protonizácii niektorých atómov v ligande, čo vedie k rozpadu komplexu. Správanie sa komplexu v kyslom prostredí môže naznačiť správanie sa komplexu v tele. V prípade rozpadu

komplexu v organizme by došlo k neželanému uvoľneniu kovu, preto je z hľadiska použiteľnosti med'natého komplexu potrebné vykonávať testy kinetickej inertnosti v kyslom prostredí. Bežné komplexy s Cu^{2+} nebývajú kineticky inertné, a teda ľahko podliehajú substitučným reakciám. To môže byť výhodou pri komplexácii (napr. komplexotvorné reakcie makrocyclov s Cu^{2+} prebiehajú rýchlejšie, v porovnaní s asi najpopulárnejším nuklidom používaným v rádiomedicíne, izotopom $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ⁵), ale tiež nevýhodou z hľadiska potreby inertnosti daného komplexu *in vivo*.

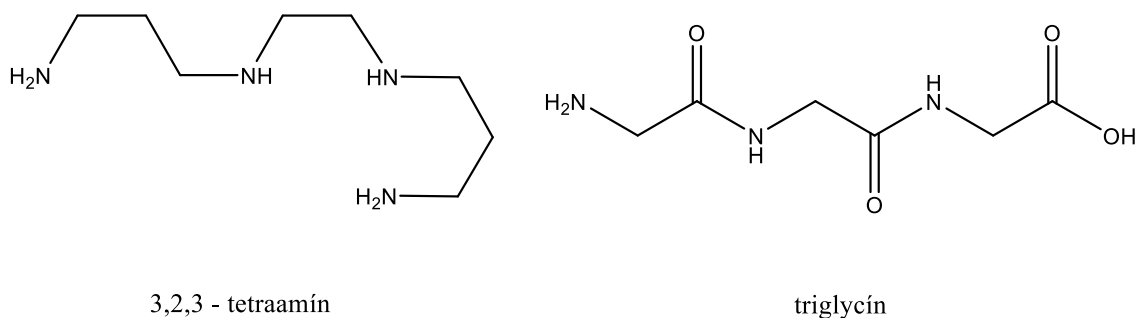
Ďalšou vlastnosťou komplexu je jeho termodynamická stabilita. Komplexy s Cu^{2+} majú vyššiu stabilitu, nielen v porovnaní s Cu^+ , ale tiež v porovnaní s ostatnými prvkami kovov 4. periódy. Tento jav je spôsobený jednak Jahn-Tellerovým efektom, ktorý Cu^{2+} poskytuje, a tiež vysokou hodnotou stabilizačnej energie ligandového poľa. Vyššiu stabilitu Cu^{2+} potvrdzuje aj Irving-Williamsova séria. Termodynamická stabilita samotného iónu však na automatické využitie Cu^{2+} v rádiomedicíne samozrejme nestačí, táto vlastnosť musí byť umocnená vhodným ligandom.

V med'natých komplexoch nadobúda centrálny atóm vzhľadom na relatívne malý polomer katiónu Cu^{2+} koordinačné číslo 4, 5 alebo 6. Pri komplexoch s koordinačným číslom 4, ale najmä s koordinačným číslom 6 sa uplatňuje Jahn-Tellerov efekt, obvyklý tvar (oktaéder) teda býva deformovaný, najčastejšie ide o axiálne predĺženie.⁵ Výhodnejšie z hľadiska stability sú komplexy, v ktorých je centrálny ión Cu^{2+} koordinovaný šiestimi donorovými atómami, preto sú potenciálne zaujímavými najmä hexadentátne ligandy. V prípade, že daným ligandom je dusíkatý makrocycklus (ako bude uvedené nižšie), dostávame okrem zvýšenej stability (vd'aka makrocyclickému efektu) aj ďalšiu výhodu. Tieto ligandy môžeme často modifikovať rôznymi pendantnými ramenami (najčastejšie ide o záporne nabité ramená, ktoré kompenzujú kladný náboj atómu kovu), aby sa zlepšili vlastnosti celého komplexu.

1.4. Ligandy vhodné pre komplexáciu Cu^{2+}

Veľkosť náboja a polomer katiónu Cu^{2+} radia tento ión do stredu medzi tvrdé a mäkké kyseliny. Na základe teórie tvrdých a mäkkých kyselín a báz je katión Cu^{2+} považovaný za prechodnú kyselinu, na rozdiel od Cu^+ , ktorý je mäkkou kyselinou (a aj na rozdiel od iónov iných kovov bežne používaných na zobrazovanie ako Ga^{3+} , In^{3+} alebo Lu^{3+} , ktoré sú naopak tvrdé). S týmto faktom súvisí aj výber ligandov, ktoré sa budú ochotne koordinovať pri vzniku komplexu.

V prvom rade sú to ligandy obsahujúce dusíkové donory (amíny, Schiffove bázy a pod.). Ako ideálne z hľadiska stereochemie vychádzajú ligandy, pri ktorých je atóm medi koordinovaný v rovine štyrmi silnými Lewisovskými donormi, atómami dusíku v amínových, resp. amidových skupinách alebo atómami kyslíka v éteroch. Z hľadiska štruktúry ligandov rozlišujeme dve základné skupiny: ide o tzv. „open-chain“ ligandy (sú acyklické, majú štruktúru reťazcov) (Obr.1.2.) a makrocyklické ligandy.

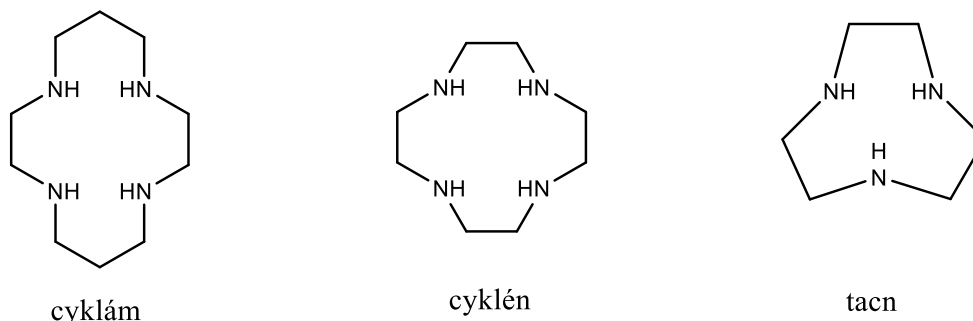


Obrázok 1.2.: „Open-chain“ ligandy so silnými Lewisovskými donormi

Preferovanejšími sú makrocyklické ligandy, ktoré majú vďaka makrocyklickému efektu vyššiu stabilitu. Ich nevýhodou je však pomalšia komplexácia na ióny kovov (takže aj na Cu^{2+}) v porovnaní s druhou skupinou ligandov. Z tohto dôvodu sa výskum začal zameriavať na deriváty makrocyklických zlúčenín, ktorých vlastnosti sú vylepšené vhodnými pendantnými ramenami.

1.5. Makrocyklické ligandy

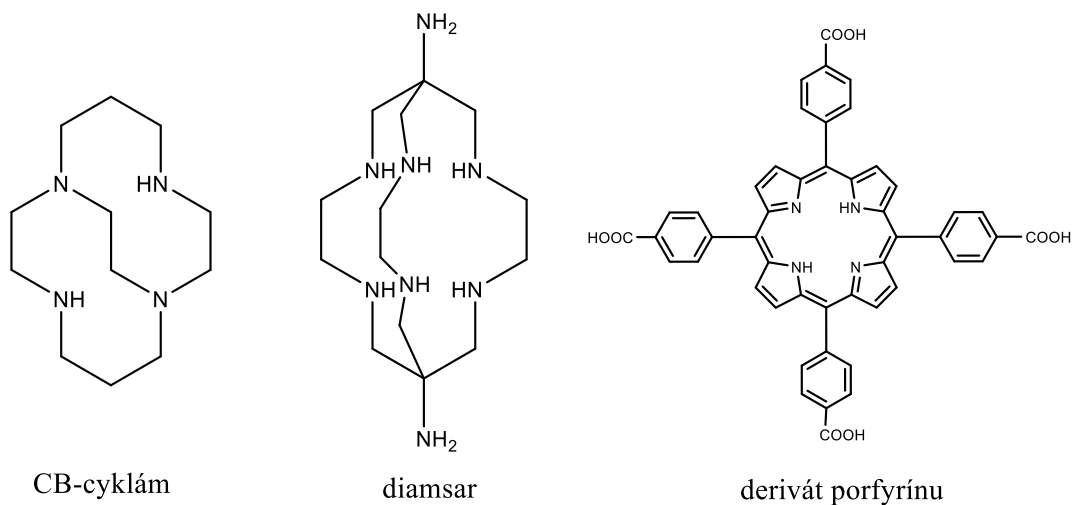
Najčastejšie ide o deriváty troch polyazamacrocyklov, cyklámu (1,4,8,11-tetraazacyklotetradekán), cyklénu (1,4,7,10-tetraazacyklododekán) a tacn (1,4,7-triazacyklononán) (Obr.1.3.).



Obrázok 1.3.: Základné makrocykly, ktorých deriváty sa často používajú pre komplexáciu s iónmi kovov

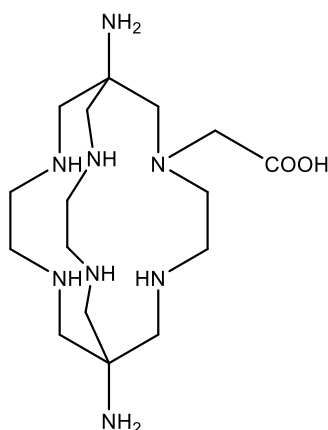
Výhodou cyklámu je, že pri nakoordinovaní sa na Cu^{2+} sa vytvorí štyrikrát v rovine koordinovaný, *in vivo* stabilný, komplex, na ktorom sa dá demonštrovať výrazný príspevok makrocyclického efektu k stabilite komplexu.⁵ Ďalšou výhodou cyklámu ako ligandu v komplexe je jeho termodynamická selektivita naväzovať sa na Cu^{2+} (preferuje ju napr. pred väzbou na Zn^{2+} , ktorý býva častým kompetítorom, čo sa týka rôznych väzieb v organizme). Nevýhodou je náchylnosť k redukcii Cu^{2+} na Cu^+ za podmienok *in vivo* a následne k neželanému vyviazaniu rádionuklidu medi z komplexu.⁸ Z tohto dôvodu sa ukázalo ako vhodné zaviesť pendantné ramená s kyslíkatými donormi, ktoré by zvýšili redox potenciál ligandu, a tým aj jeho stabilitu *in vivo*.

Pomerne populárne sú aj makrocykly, ktorých samotný tvar naznačuje väčšiu stabilitu výsledného komplexu. Ide najmä o tzv. „cross-bridged“ cyklám (CB-cyklám) (Obr.1.4.). Komplexy Cu^{2+} s CB-cyklámom boli pripravené a vykazovali vysokú stabilitu a inertnosť v kyslom prostredí.⁹ Komplexy majú, podobne ako komplex Cu^{2+} s cyklámom, tvar tetragonálnej pyramídy, ktorá je však deformovaná.¹⁰ Nevýhodou je pomalá komplexácia derivátov CB-cyklámu na Cu^{2+} , čo sa dá opäť zlepšiť zavedením silne koordinujúcich ramien, ako je napr. metylfosfonátové rameno.¹¹



Obrázok 1.4.: Zložitejšie makrocykly pre koordináciu s Cu^{2+} .

Ďalším ligandom, ktorého tvar predurčuje stabilitu komplexu je ligand zo skupiny tzv. kryptandov, diamsar (Obr.1.4.). Ide o diaminoderivát sarkofagínu. Jeho komplex s Cu^{2+} má geometriu trigonálnej prizmy s predĺženými väzbami N–Cu v *trans* polohách¹². Komplex Cu^{2+} upravený karboxymetylovým ramenom¹³ mal geometriu blízku oktaédru. (Obr. 1.5). Zistilo sa tiež, že komplex vykazoval značnú stabilitu v kyslom prostredí,¹⁴ ale pomalé vylučovanie obličkami.¹⁵



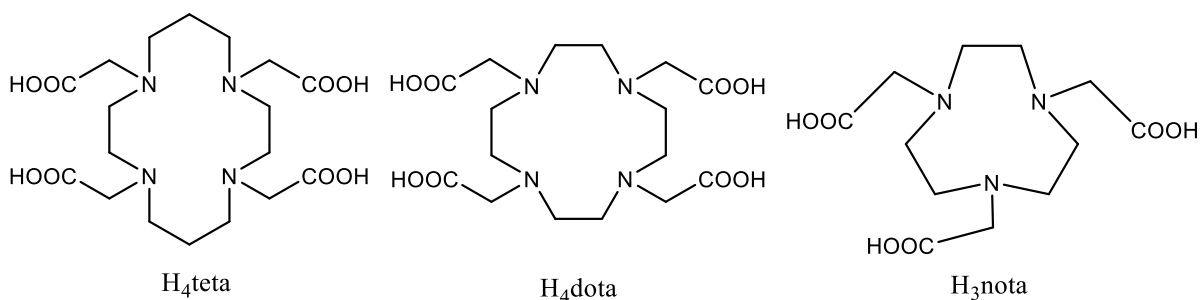
Obrázok 1.5.: Stabilný derivát makrocyklu diamsar

Poslednú spomínanú skupinu skúmaných ligandov, ktorých tvar predurčuje zvýšenú stabilitu, predstavujú deriváty porfyrínov. Tie pri sledovaní vykazovali značnú termodynamickú stabilitu voči demetalácii.⁵ Komplexy s porfyrínovými ligandami by mohli zohrávať dôležitú úlohu pri zobrazovaní zápalov. Komplexy porfyrínov sa totiž v tele selektívne hromadia v zápalových vláknach.¹⁶ S týmito ligandami by však mohli byť problémy pri potenciálnych aplikáciách. Jedným z nich môže byť vznik singletového kyslíka,¹⁷ ktorý by pri väčších množstvách aplikovanej kontrastnej látky (pri spomínanom zobrazovaní), ako jedna z foriem reaktívneho kyslíka, bol pre organizmus nebezpečný. Potenciálne problémy ilustruje aj fakt, že napriek pomerne širokej škále rôznych derivátov porfyrínov a ich vhodným chemickým vlastnostiam, nebol žiaden zástupca tejto skupiny donedávna v klinickej praxi testovaný.¹⁸

Štruktúry vyššie spomínaných ligandov sa dajú modifikovať substituentmi na amínových skupinách, a tým aj vylepšovať vlastnosti komplexov obsahujúcich tieto deriváty.

1.6. Karboxymetylové pendantné ramená

Aby sa predišlo vyviazaniu rádionuklidu medi z komplexu Cu^{2+} z rôznych makrocyklov (kvôli redukcii Cu^{2+} na Cu^+), ukázalo sa ako vhodné zavedenie koordinujúcich pendantných ramien, ktoré zvýšia stabilitu komplexov.



Obrázok 1.6.: Základné makrocykly obsahujúce karboxymetylové pendantne ramená

Pripravené boli deriváty polyazamakrocyklov s rôznym počtom karboxymetylových ramien.² (Obr. 1.6.) Derivát cyklámu so štyrmi ramenami, H₄teta, vďaka pridaným ramenám vytvára s Cu²⁺ oktaedrický komplex.² Dôležitou vlastnosťou tohto ligandu je, vzhľadom na spôsob koordinácie na centrálny atóm (nekoordinuje cez všetky ramená), že jedno voľné rameno sa môže použiť na spojenie ligandu s molekulou, na ktorú je následne viazaná cieľiaca molekula.⁵

Veľkou nevýhodou komplexov ligandov odvodených od H₄teta je ich nízka stabilita *in vivo*, ktorá bola demonštrovaná aj pri aplikáciách na potkaních modeloch, kde dochádzalo k vyvážovaniu medi (vďaka vyššie spomínanej redukcii Cu²⁺ na Cu⁺) a naväzovaniu Cu²⁺/Cu⁺ na SOD.¹⁹ To indikovalo potrebu použiť kineticky inertnejšie chelátory.

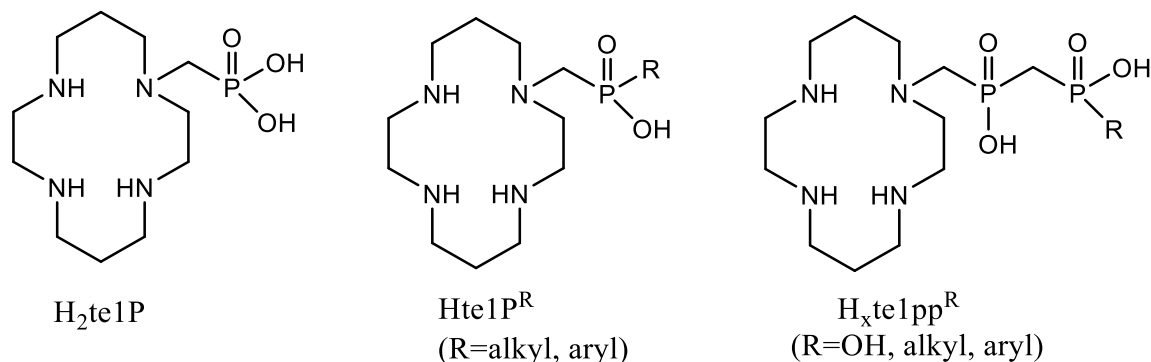
Derivát cyklénu, H₄dota (Obr.1.6.) síce poskytoval s Cu²⁺ termodynamicky stabilnejšie komplexy v porovnaní s H₄teta, avšak ešte horšiu stabilitu *in vivo*, čo je spôsobené tým, že v organizme je dôležitejšia kinetická inertnosť daného komplexu.²⁰

Komplex Cu²⁺ s derivátom tacn, H₃nota (Obr.1.6.), sa spomedzi vyššie spomínaných makrocyclických polyaminokarboxylátov tvoril najrýchlejšie.⁸ Problémom však je jeho nízka kinetická inertnosť. To nie je príliš vhodné z hľadiska použitia v medicíne⁸, ale keďže je H₃nota výhodnejšia ako H₄dota a H₄teta, používajú sa jej deriváty komerčne.

1.7. Pendantné ramená odvodené od kyselín fosforu

Jedným zo sľubných spôsobov úpravy základných makrocyklov môže byť náhrada karboxymetylových ramien derivátmi kyselín fosforu. Výhodou je, že takéto rameno sa dá na atóme fosforu ďalej modifikovať, čím sa vytvoria nové možnosti pre konjugáciu s ďalšou zlúčeninou²¹, prípadne sa zavedeným substituentom môžu zdokonaľovať vlastnosti komplexu.

Na úvod treba zadefinovať, o ktorých ramenách bude reč, keďže deriváty kyselín fosforu majú mnoho druhov. Prvým typom takéhoto ramena je fosfonátové (Obr.1.7. – H_2te1P) rameno, ktoré je formálne odvodené od kyseliny fosforitej. Fosfinátové rameno je odvodené od kyseliny fosfornej (Obr.1.7. – $Hte1P^R$) a skupina bis-(fosfonátová) je analógom kyseliny difosforečnej (Obr.1.7. – $te1pp^R$).



Obrázok 1.7.: Cyklám modifikovaný pendentnými ramenami odvodenými od kyselín fosforu

Atóm kyslíka vo fosforových kyselinách zaraďuje tieto zlúčeniny medzi tvrdé bázy (teória tvrdých a mäkkých kyselín a báz). Pendantné rameno obsahujúce deriváty kyselín fosforu je na rozdiel od planárnej karboxylovej skupiny karboxymetylového ramena tetraédrické. Dôležitá je však aj celková bázicita ligandu. Fosfonátové rameno bázicitu ligandu zvyšuje a fosfinátové ju naopak znižuje.²²

Fosfonátové rameno je kyslejšie (pri deprotonácii do prvého stupňa) oproti metylkarboxylovému ramenu.²² To síce umožňuje koordináciu na ión kovu už pri nižšom pH avšak naznačuje to nižšiu termodynamickú stabilitu (ión kovu môže byť ochotnejšie substituovaný inými ligandami). Toto rameno ovplyvňuje aj kinetickú inertnosť výsledného komplexu. Aby sme si mohli objasniť spôsob akým sa to deje, treba vysvetliť ako prebieha proces komplexácie kovu.

Mechanizmus komplexácie kovu na makrocyklus s koordinujúcim pendentným ramenom pozostáva z dvoch čiastkových reakcií. Prvou je predradená rovnovážna reakcia, v ktorej sa ión kovu koordinuje na pendantné rameno ligandu. Tým dôjde k vytvoreniu tzv. „out-of-cage“ komplexu. V druhom kroku dôjde k odstráneniu protónu zo stredu (tzv. kavity) makrocyklu (preto je tento krok je bázicky katalyzovaný) a súčasne sa ión kovu presunie dovnútra makrocyklu za vzniku tzv. „in-cage“ komplexu. Tento posledný krok určuje rýchlosť celej reakcie.¹¹

Výhodou fosfonátového pendantného ramena je dobrá asistancia pri odstraňovaní protónu z kavity makrocyklu, čo vedie k rýchlejšej komplexácii takto upravených ligandov na Cu^{2+} aj pri nižších hodnotách pH.²³ K zvýšenej rýchlosti komplexácie prispieva aj fakt, že cyklus upravený fosfonátovým ramenom umožňuje predradené naviazanie iónu Cu^{2+} na rameno. Dôležité je, aby mal vytvorený „*out-of-cage*“ komplex optimálnu stabilitu vo vzťahu k stabilite výsledného komplexu Cu^{2+} s makrocyklami. Bis-(fosfinátové) rameno vykazuje optimálne silný „*out-of-cage*“ komplex^{11,24} a fosfonátové rameno prispieva k transferu protónu z kavity.¹¹

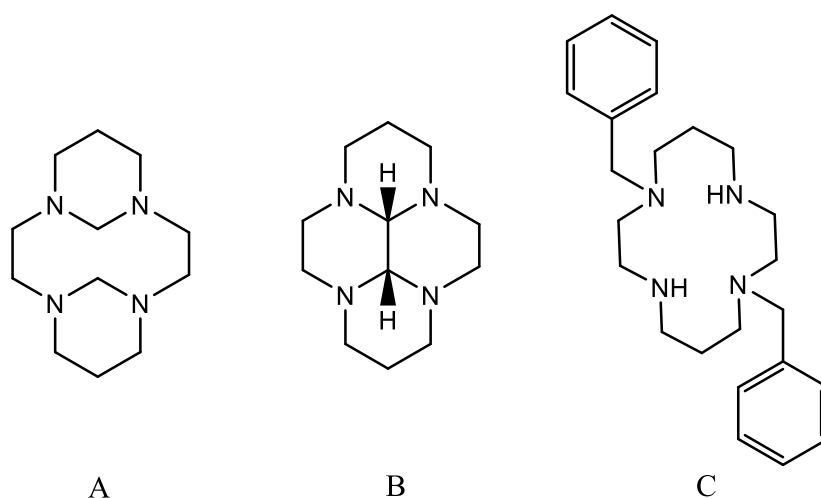
Všetky spomínané ramená odvozené od kyselín fosforu sú tiež hydrofilnejšie v porovnaní s karboxymetylovými, a teda by mali byť jednoduchšie vylučované obličkami. Vďaka afinite fosfonátového ramena (v prípade, že je v komplexe fosfonátových ramien viac) k hydroxyapatitu v kostiach však treba počítať aj so zvýšeným vychytávaním takto derivovaných makrocyklov kosťami.²⁵

1.8. Spôsoby chránenia amínových skupín cyklámu

Pri syntéze nových derivátov cyklámu modifikovaných na amínových skupinách, môže nastať problém pri zavádzaní niektorých skupín, najmä keď má výsledný ligand obsahovať rôzne substituenty, t.j. má byť nesymetricky substituovaný. Z tohto dôvodu je často treba špecificky ochrániť určité amínové skupiny. Pre cyklám boli navrhnuté rôzne spôsoby chránenia rôznych polôh. Pre syntézu 1,8-asymetricky disubstituovaných derivátov cyklámu je dôležité chrániť amínové skupiny v oboch zvyšných polohách, prípadne použiť ortogonálne chránenie troch amínových skupín; t.j. keď je východiskovou látkou dvakrát chránený cyklám môže sa jedna zo zvyšných polôh obsadiť inou skupinou, čím vzniká široká škála možností chránenia.

V ďalšom texte je za chránenie cyklámu pokladané chránenie amínových skupín cyklámu. Pri uvádzaní chrániacich skupín do polôh 1,8 spomeniem len skupiny, ktoré sa dajú zaviesť priamo na nechránený cyklám.

1.8.1. Chránenie cyklámu v polohe 1,8



Obrázok 1.8.: Rôzne typy chránenia cyklámu po substitúcii v polohách 1,8

Bis(aminálové) chránenie s formaldehydovým mostíkom

V tomto prípade nejde o chránenie v pravom zmysle slova, keďže chrániaca skupina neslúži len na chránenie aminoskupiny, na ktorej sa nachádza. Zavedené bis(aminálové) mostíky (Obr.1.8-A) chránia dve polohy, keďže smerujú výslednú substitúciu len do dvoch polôh. Príkladom použitia môže byť zavádzanie metylkarboxylovej skupiny²⁶ na cyklám.

Chrániaca skupina sa na makrocyklus zavádza reakciou s formaldehydom.²⁶ Odstránenie mostíka po reakcii s elektrofilmi prebieha bázickou hydrolyzou.²⁶

Chránenie ako cis-bis(aminál) s glyoxalovým mostíkom

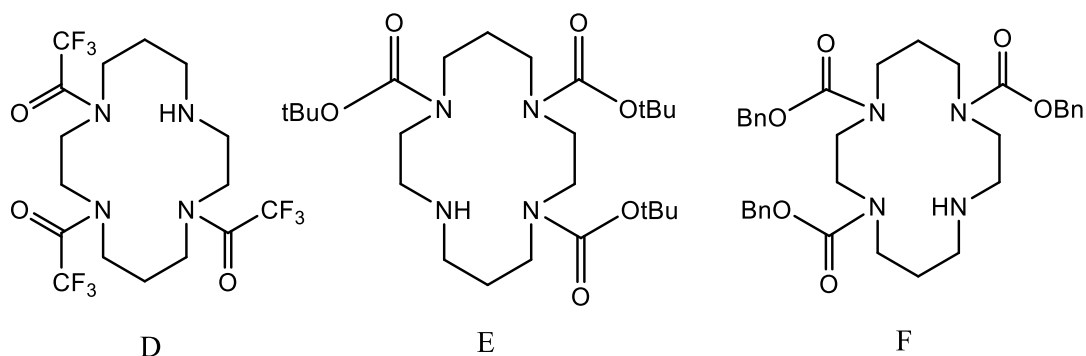
Reakciou cyklámu s glyoxalom v acetonitrile dostávame chránený cyklám (v podobe *cis*-bis(aminálu) (Obr.1.8-B)). Reakcia má z kinetických dôvodov pomerne dobrý výťažok. Následná bis-kvarternizácia je zo stérických a nábojových dôvodov (rovnako ako pri bis(aminálovom) chránení s formaldehydovým mostíkom) umožnená len do žiadaných 1,8 polôh.²⁷ Dôležitý je pri tomto spôsobe chránenia fakt, že atómy vodíkov na glyoxalovom mostíku budú vzájomne v *cis* polohe.²⁷ K odstráneniu glyoxalového mostíka pri vzniku disubstituovaných derivátov z *cis*-bis(aminálu) dochádza miešaním s roztokom 10% NaOH pri laboratórnej teplote.²⁷

Benzylové chránenie

Dve benzylové skupiny v polohách 1,8- sa na cyklám zavedú reakciou cyklámu, ktorý je chránený ako bis(aminál) s formaldehydovým, resp. *cis*-bis(aminál) s glyoxalovým mostíkom, s prebytkom benzylbromidu v acetonitrile.²⁸ Samotný chránený cyklám (Obr.1.8-C) sa získa pridaním roztoku bázy (napr. NaOH).^{28,27} Po uskutočnení želaných reakcií na cykláme sa benzylová skupina dá odstrániť hydrogenáciou (s využitím 10% Pd/C a H₂). Pokiaľ by sa hydrogenácia nedala použiť, môže sa benzylová skupina z makrocyklu odstrániť reakciou s chloroformátmi.²²

1.8.2. Selektívne chránenie troch polôh cyklámu

Výhodným spôsobom chránenia z hľadiska ďalšej syntézy môže byť chránenie pomocou amidov karboxylových kyselín a karbamátov.



Obrázok 1.9.: Rôzne typy trojnásobného chránenia cyklámu

Chránenie pomocou trifluoracetylovej skupiny

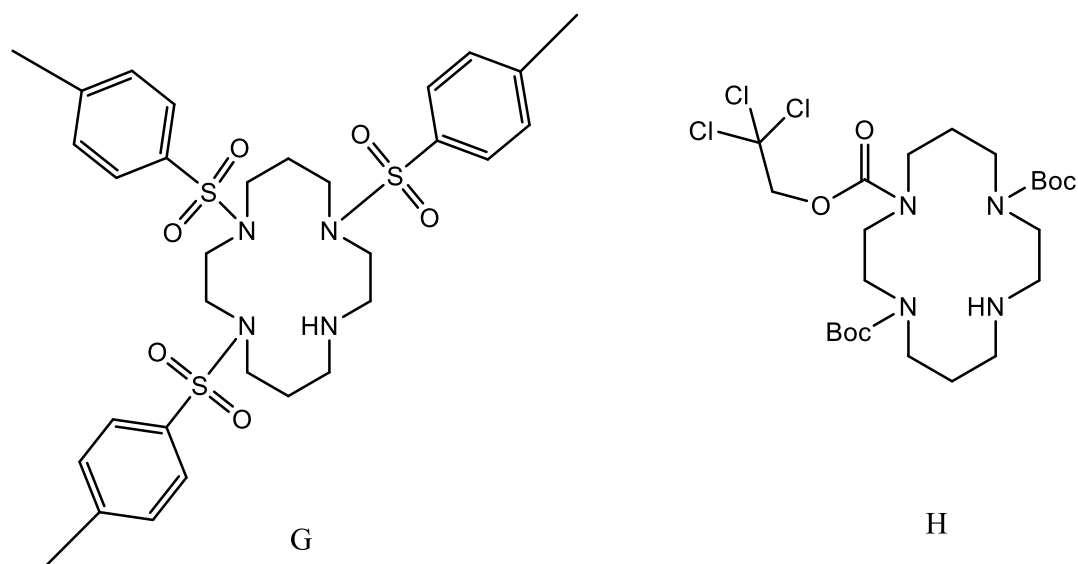
Cyklám reaguje s anhydridom kys. trifluoroctovej (TFAA) alebo etylesterom kys. trifluoroctovej (EtOTFA) v prítomnosti 10 ekvivalentov trietylamínu za vzniku trikrát chráneného cyklámu (Obr.1.9.-D). Zaujímavosťou je, že aj pri prebytku EtOTFA prebehne reakcia len do troch polôh.²⁹ Výhodou tejto metódy je jej jednoduchosť a vysoké výťažky.²⁹ Odstránenie týchto skupín dosiahneme bázičkou hydrolyzou, napr. s vodným roztokom NH_3)³⁰ alebo s roztokom NaOH v MeOH / H_2O .²⁹

Chránenie pomocou t-butyloxykarbonylovej skupiny

Ak sa cyklám a trietylamín rozpustia vo vhodnom rozpúšťadle (DCM alebo chloroform), postupne sa pomaly pridá di-*terc*-butyldikarbonát (tzv. Boc anhydrid) a zmes sa ponechá reagovať, dostaneme cyklám chránený trikrát *t*-butyloxykarbonylovou skupinou (Boc) (Obr.1.9.-E).³¹ Skupina sa na záver reakčnej sekvencie odstráni kyslou hydrolyzou (napr. pomocou 20% TFA v DCM³², alternatívne sa dá použiť HCl v bezvodom acetonitrile alebo metanole).³³

Chránenie pomocou benzyloxykarbonylovej (Cbz) skupiny

Táto skupina sa na cyklám zavádza rovnakým spôsobom ako vyššie uvedená Boc skupina. Východiskovou látkou je cyklám, trietylamín a dibenzoyldikarbonát. Výsledkom je opäť trisubstituovaný cyklám (Obr.1.9.-F).³⁴ Odstránenie benzyloxykarbonylovej skupiny prebieha hydrogenáciou na paládiovom katalyzátore v metanole.³⁴



Obrázok 1.10.: Rôzne typy trojnásobného chránenia cyklámu

Chránenie tosyláciou

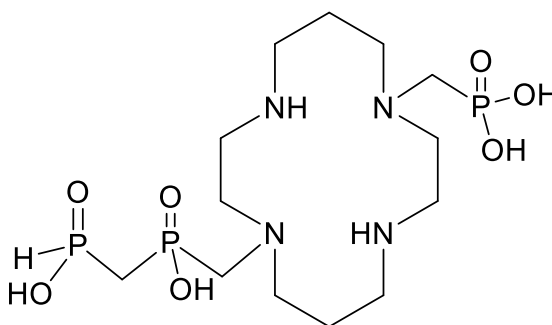
Trojité tosylácie (Obr.1.10-G) sa dá dosiahnuť priamo, reakciou cyklámu s tosylchloridom a nadbytkom trietylamínu, s dobrým výťažkom (80%)³⁵ Odstránenie chrániacej skupiny si však vyžaduje veľmi tvrdé podmienky (kyslá hydrolyza, napr. niekoľkodňovou reakciou s konc. H₂SO₄ pri 100 °C alebo 48% vodným roztokom HBr v AcOH za refluxu).³⁶

Chránenie 2,2,2-trichlóretoxykarbonylovou (Troc) skupinou

V prípade, že na cykláme sa už nachádzajú dve chrániace skupiny, je možné získať trikrát chránený cyklus zavedením tretej, ortogónálne reaktívnej skupiny. Takouto skupinou môže byť napr. Troc (Obr.1.10.-H). Na cyklám sa zavedie reakciou dvakrát chráneného cyklu (napr. dvakrát chránený skupinou Boc) s trichlóretyl chloroformátom (Troc-Cl).³⁷ Odstránenie chrániacej skupiny redukciou prebieha pomocou zinku v prostredí octovej kyseliny.³⁷

2. Ciele práce

V teoretickom úvode bol naznačený potenciál rôznych izotopov medi v rádiomedicíne. Pre rádionuklidy medi sa ako najvhodnejší ligand ukazujú deriváty cyklámu, ktorý má voči Cu^{2+} zvýšenú selektivitu. V teoretickom úvode boli popísané rôzne spôsoby, akými pendantné ramená ligandu ovplyvňujú vlastnosti celého komplexu. Medzi vhodné pendantné ramená patria deriváty kyselín fosforu. Cieľom práce bolo pripraviť asymetricky substituovaný derivát cyklámu so substituentmi v polohe 1,8- (Obr.2.1.), aby sa otestovali výhody spojenia fosfonátovej a bis-(fosfinátovej) skupiny pri komplexácii Cu^{2+} .



Obr.2.1.: Derivát cyklámu s fosfinátovým a bis-(fosfinátovým) pendantným ramenom

Ďalším cieľom bolo preskúmať rôzne možnosti ortogónálneho chránenia cyklámu, ktoré by sa dali využiť pri príprave vyššie uvedeného derivátu.

3. Experimentálna časť

3.1. Všeobecné postupy a použité chemikálie

Všetky použité chemikálie pochádzajú od komerčne dostupných dodávateľov (Fluka, Fluorochem, Lachem, Penta a Sigma-Aldrich).

3.2. Metódy charakterizácie

3.2.1. Tenkovrstvová chromatografia (TLC)

Priebeh reakcií bol kontrolovaný pomocou tenkovrstvovej chromatografie na chromatografických doštičkách Silica gel 60 F254 (Merck a VWR). Vizualizácia škvŕn na doštičkách bola uskutočnená pomocou UV detekcie (detekcia látok obsahujúcich aromatický kruh), 0,5% roztoku ninhydrínu v etanole (detekcia látok obsahujúcich aminoskupiny), Dragendorfovoho činidla (vodný roztok $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3$ a KI v octovej kyseline, detekcia makrocyclov) a KMnO_4 (vodný roztok KMnO_4 a Na_2CO_3 , detekcia organických látok).

3.2.2. Hmotnostná spektrometria (MS)

Hmotnostné spektrá v pozitívnom a negatívnom móde boli získané meraním na prístroji Waters ACQUITY QDa (duálny ortogonálny elektrosprej interface (Z-sprej) pre API (ionizácia za atmosferického tlaku); quadropolový analyzátor; full scan v rozsahu 30 až 1250 m/z ; integrovaná turbomolekulárna vákuová pumpa a externá rotačná vákuová pumpa). Spektrá boli na tomto prístroji merané RNDr. Margarétou Vojtíčkovou Ph.D.

3.2.3. NMR spektroskopia

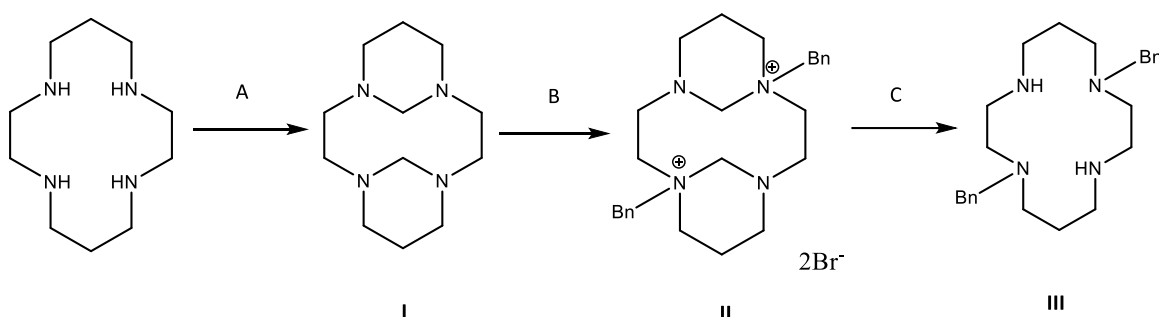
NMR spektrá pripravených látok boli merané na NMR spektrometri Varian VNMRS 300 MHz, prípadne NMR spektrometri Varian INOVA 400 MHz. Rezonančné frekvencie jednotlivých jadier sú uvedené v Tab. 3.1. Spektrá boli referencované na TMS ($\delta\text{H} = 0,00$ ppm, $\delta\text{C} = 0,00$ ppm v CDCl_3) a analyzované v programe MestReNova. Všetky merania boli uskutočnené pri 25 °C. Spektrá merané na prístroji Varian INOVA 400 boli zmerané RNDr. Margarétou Vojtíčkovou Ph.D.

Tab. 3.1. Rezonančné frekvencie meraných jadier

Merané jadro	Rezonančné frekvencie [MHz]	
	VNMRS 300	INOVA 400
^1H	299,94	399,95
^{31}P	121,4	161,9

3.3. Syntetická časť

3.3.1. Príprava 1,8-dibenzylcyclámu (III)



Reakcia A (príprava látky I)

Cyklám (9,98 g; 49,8 mmol) bol rozpustený v destilovanej vode (600 ml) vo varnej banke (1000ml), zmes bola miešaná v chladiacom kúpeli (ľad + voda). Pridal sa roztok formaldehydu (30%; 10 ml; 2,5 ekv.; 130 mmol), za miešania sa vyzrážal výsledný produkt. Reakčná zmes bola miešaná ďalšiu hodinu. Zrazenina bola odfiltrovaná na frite (S2), filtrát bol odparený na RVO a pridaný k retentátu. Výťažok bol 11,29 g (71%).

Reakcia B (príprava látky II)

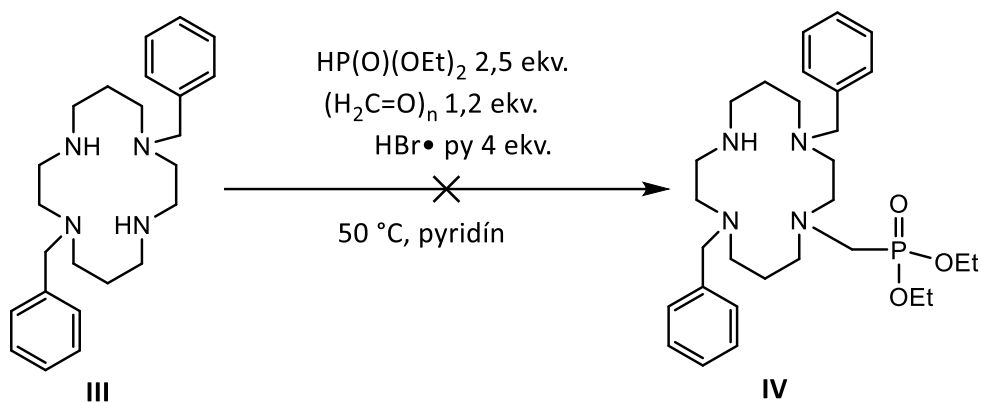
Do banky (250ml) s miešadlom bola navážená (7,00 g; 21,8 mmol) látka I a rozpustená v acetonitrile (175 ml). Pasteurovou pipetou sa prikvapkal benzylobromid (9,8 ml; 3,6 ekv.; 81,9 mmol). Počas pridávania sa zmes najskôr vyčírila, potom sa vylúčeným produktom opäť zakalila do biela. Reakčná zmes bola ponechaná reagovať 23 hodín. Produkt sa prefiltraval za zníženého tlaku na frite (S2), premyl éterom (cca 5 ml) a presušil prúdom vzduchu. Reakcia prebehla kvantitatívne (výťažok bol 12,3 g).

Reakcia C (príprava látky III)

Do vodného roztoku NaOH (10%, 175 ml) sa vsypala látka **II** (7,00 g; 12,4 mmol). Vznikla do biela zafarbená emulzia a priliaľ sa CHCl_3 (70 ml), do ktorého prešiel výsledný amín. Zmes sa ponechala miešať 30 minút pri laboratórnej teplote. Produkt bol celkovo extrahovaný 4×70 ml CHCl_3 . Do spojených organických fáz sa pridali 2 lyžičky bezvodého Na_2SO_4 na vysušenie. Po hodine sa zmes prefiltrovala cez vatú a filtrát sa odparil na RVO. Produkt mal podobu žltého oleja. Reakcia prebehla kvantitatívne (výťažok bol 4,7 g).

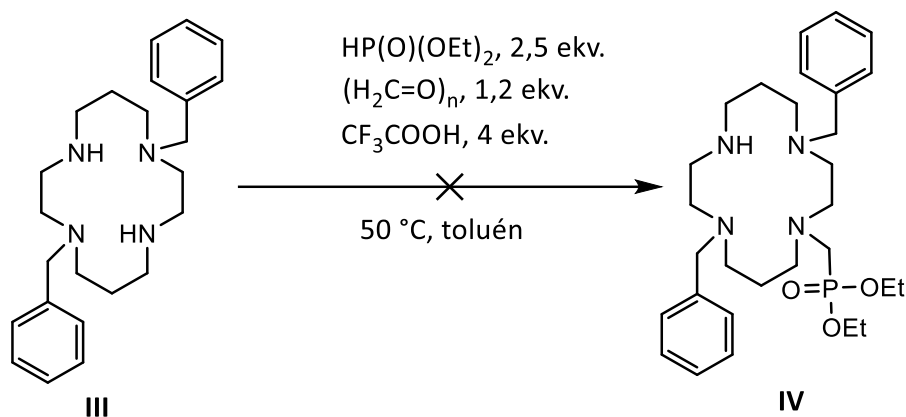
3.3.2. Pokusy o zavedenie monofosfonátového ramena na 1,8-dibenzyl cyklám

Reakcia D



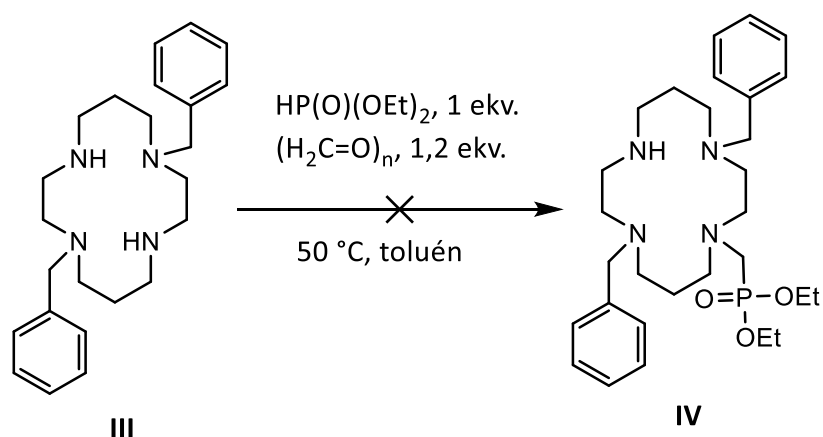
Do slzovej banky (25 ml) s miešadlom sa preniesla látka **III** (163 mg; 0,43 mmol). Banka sa prefúkla argónom, uzavrela septom a látka **III** sa rozpustila v pyridíne (5 ml). Pridal sa HBr·py (274 mg; 4 ekv.; 1,71 mmol), paraformaldehyd (15,4 mg; 1,2 ekv.; 0,51 mmol) a dietylfosfit (0,138 ml; 2,5 ekv.; 1,07 mmol). Reakčná zmes sa nechala zahrievať pri teplote 50 °C a priebeh reakcie sa kontroloval pomocou ³¹P NMR. Po siedmich dňoch nebol zistený vznik produktu, takže sa teplota zahrievania zmesi zdvihla na 80 °C. Pri tejto teplote sa zmes nechala reagovať ďalší deň, reakcia však neprebehla.

Reakcia E



Látka **III** (161 mg; 0,42 mmol) bola presypaná do slzovej banky (25 ml) s miešadlom. Banka bola prefúknutá prúdom argónu, uzavretá septom a pomocou injekčnej striekačky sa do nej pridal bezvodý toluén (5 ml). Pomocou mikrostriekačky Hamilton sa pridala kys. trifluóroctová (130 μ l; 4 ekv.; 1,69 mmol) a dietylfosfit (136 μ l; 2,5 ekv.; 1,06 mmol). Na záver sa prisypal paraformaldehyd (15,2 mg; 1,2 ekv.; 0,51 mmol) a reakčná zmes bola ponechaná miešať sa pri teplote 50 °C. Výsledkom bol vznik heterogénnej zmesi. Priebežne sa vykonávala kontrola pomocou ³¹P NMR. Keďže aj po siedmich dňoch bola konverzia minimálna, zdvihla sa teplota na 80 °C a zmes sa nechala reagovať ešte deň. Pomocou ³¹P NMR však nebola pozorovaná žiadna zmena.

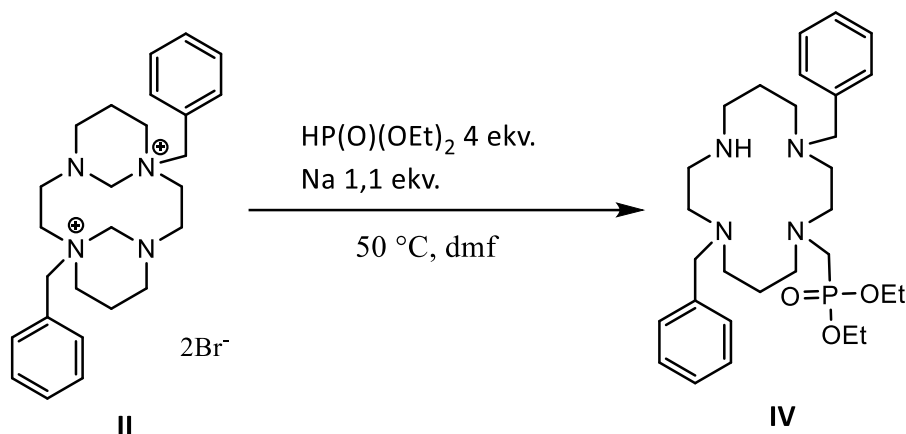
Reakcia F



Do slzovej banky (25 ml) s miešadlom sa navážila látka **III** (141 mg; 0,37 mmol). Banka sa prefúkla argónom, uzavrela septom a pridal sa bezvodý toluén (5 ml) a pomocou mikrostriekačky Hamilton dietylfosfit (48 μ l; 1 ekv. 0,37 mmol). Prisypal sa paraformaldehyd (13,4 mg; 1,2 ekv.; 0,45 mmol) a reakčná zmes sa ponechala cez noc miešať pri teplote 50 °C. Pomocou ³¹P NMR bolo zistené, že reakcia neprebehla, takže sa

zmes nechala reagovať ešte dva dni. Keďže výsledok kontroly bol rovnaký, zdvihla sa teplota zahrievania na 80 °C a reakčná zmes sa ponechala v uvedených podmienkach reagovať ešte jeden deň. Keď sa zistilo, že reakcia stále neprebehla, k reakčnej zmesi sa pridalo ešte 143 µl (3 ekv.; 1,1 mmol) dietylfosfitu a zmes sa ponechala reagovať ďalší deň. Pomocou ³¹P NMR bolo však opäť zistené, že reakcia neprebehla.

Reakcia G



Do slzovej banky (25 ml) s miešadlom sa vložil očistený sodík (13 mg; 1,1 ekv.; 0,57 mmol). Banka bola prefúknutá argónom a uzavrela sa septom. Sodík sa rozpustil pridaním dietylfosfitu (0,27 ml; 4 ekv.; 2,06 mmol). Pridal sa suchý DMF (3 ml) a zmes sa nechala 5 min. miešať pri laboratórnej teplote. Na záver sa prisypala východisková látka **II** (0,29 g; 0,514 mmol). Reakčná zmes v banke sa ponechala miešať a reagovať pri teplote 50 °C cez noc. Potom sa k zmesi pridala vodný roztok NaOH (2M, 10 ml) a DCM (10 ml). Vodná fáza sa extrahovala s 3 × 10 ml DCM. Spojené organické fázy sa odparili na RVO. Takto spracovaná reakčná zmes sa delila chromatograficky na stĺpci silikagélu (25 g). Ako mobilná fáza sa použil EtOH/ konc. vodný roztok NH₃ = 10/1. Výťažok reakcie (látka **IV**) bol 61,0 mg (22%).

Látka **IV** (61,0 mg; výťažok 22%)

TLC: MF = EtOH/NH₃ = 10:1; R_f = 0,24

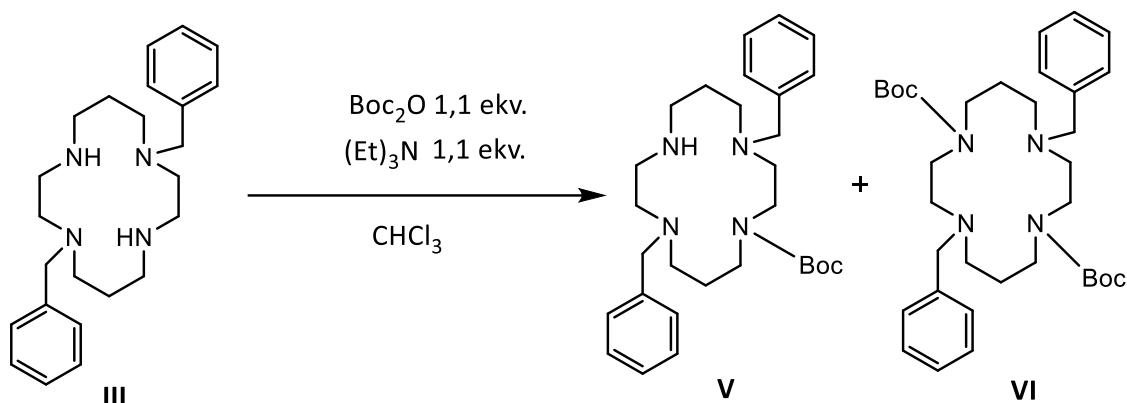
¹H-NMR (CDCl₃): δ 1,19 (t, 6H, O-CH₂-CH₃); 1,61 (m, 2H, CH₂-CH₂-CH₂); 1,78 (m, 2H, CH₂-CH₂-CH₂); 2,27–2,92 (m, 18H, ring CH₂ a N-CH₂-P); 3,42–3,69 (m, 5H, N-CH₂-Ph a NH); 3,97 (p, 4H, O-CH₂-CH₃); 7,14–7,29 (m, 10H, C₆H₅)

MS (ESI): (+) 531,5 [M+H]⁺, vypočítaná M_r = 530,7

³¹P{¹H}-NMR: (CDCl₃): 27,2 (s)

3.3.3. Pokusy o vytvorenie ortogonálne chráneného cyklámu

Reakcia H



Do banky (100 ml) s miešadlom sa pridala látka **III** (0,496 g; 1,30 mmol). Banka bola prefúknutá argónom a uzavretá septom. K zmesi sa pridala bezvodý CHCl_3 (20 ml). Oddelene sa v slzovej banke (50 ml) s miešadlom, ktorá bola tiež prefúknutá argónom a uzavretá septom, rozpustil Boc_2O (0,313 g; 1,1 ekv.; 1,43 mmol) v bezvodom CHCl_3 (20 ml). K roztoku látky **III** sa pridala TEA, ponechalo sa miešať 5 min. Roztok Boc_2O sa pomocou injekčnej striekačky previedol do prikvapkávacieho lievika. Z neho sa roztok po kvapkách pridával k látke **III**. Zmes sa ponechala reagovať 24 hodín. Pridala sa destilovaná voda (20 ml) a celá zmes sa previedla do oddeľovacieho lievika. Zmes sa extrahovala pomocou CHCl_3 (3×15 ml), do spojených organických fáz sa pridala bezvodý MgSO_4 na vysušenie. Po prefiltrovaní MgSO_4 cez vatú sa filtrát odparil na RVO. Keďže TLC platnička (EtOH/ konc. vodný roztok $\text{NH}_3 = 50/1$) ukazovala vznik viacerých produktov (pravdepodobne disubstituovaný – škvrna na štarte; trisubstituovaný– $R_f = 0,75$; a tetrasubstituovaný cyklám– $R_f = 0,89$), čistila sa výsledná zmes chromatografiou na stĺpci silikagélu (50 g). Zachytávali sa postupne tri frakcie. Najskôr sa eluovalo pomocou EtOAc (cca 200 ml), potom čistým EtOH (cca 170 ml), na záver sa ako mobilná fáza použila EtOH/DEA = 95:5 (cca 170 ml). Jednotlivé frakcie boli odparené na RVO.

Látka **V** (72,2 mg; výťažok 12%)

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

MF = EtOH/ NH_3 = 50:1; $R_f = 0,75$

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ 0,74 (s, 9H, C- CH_3); 1,01–1,36 (d, 4H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$); 1,76–2,28 (12H, ring CH_2); 2,67–2,84 (m, 4H, ring CH_2); 2,93–3,14 (2 \times d, 4H, N- $\text{CH}_2\text{-C}_6\text{H}_5$); 6,60–6,87 (m, 10H, C_6H_5)

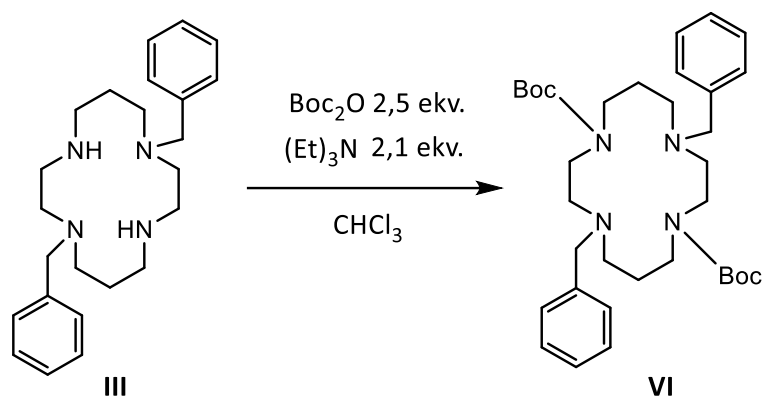
Látka **VI** (300,1 g; výt'azok 40%)

TLC: MF = Hexán/EtOAc = 3:1; $R_f = 0,5$

MF = EtOH/NH₃ = 50:1; $R_f = 0,89$

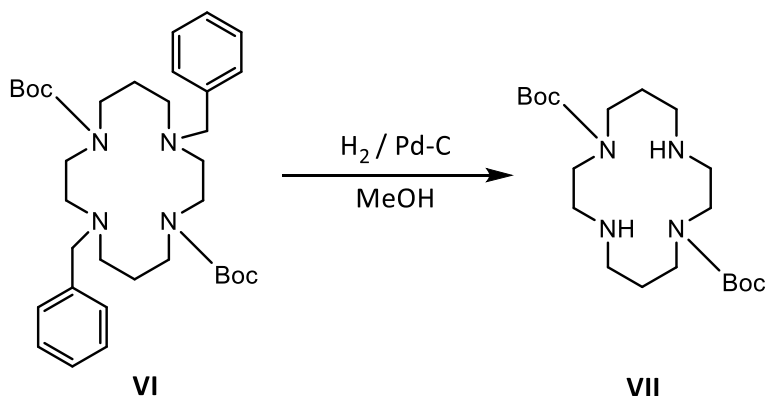
¹H-NMR (CDCl₃): δ 1,35 (s, 18H, C-CH₃); 1,67–1,96 (m, 4H, CH₂-CH₂-CH₂); 2,29–2,83 (m, 8H, ring CH₂), 3,13–3,39 (m, 8H, ring CH₂); 3,57 (s, 4H, N-CH₂-C₆H₅), 7,12–7,39 (m, 10H, C₆H₅);

Reakcia I



Pri príprave látky **VI** sa použil rovnaký postup ako pri príprave zmesi látok **V** a **VI** v reakciách H. Použil sa Boc_2O (0,711 g; 2,5 ekv.; 3,26 mmol) a TEA (0,18 ml; 2,1 ekv.; 2,73 mmol). Reakčná zmes sa po skončení reakcie „prefiltrovala“ cez stĺpec silikagélu (6×4 cm) v EtOAc. Výsledný tetrasubstituovaný produkt mal podobu bieleho prášku. Výt'azok reakcie bol 0,484 g (64%).

Reakcia J



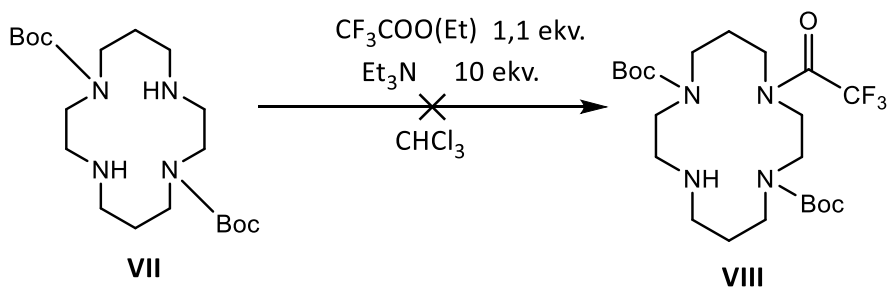
Látka **VI** (0,3 g; 0,52 mmol) sa navážila do banky (50 ml) s miešadlom. Do banky sa pridala kys. octová (ľadová, 1,5 ml) a pridala sa metanol (2,5 ml) (kým sa látka **VI** v zmesi nerozpustila). Prisypalo sa Pd/C (54,5 mg) a opatrne sa aplikovaním vákuua odsal vzduch

nad zmesou. Na ústie banky sa zaviedol balón naplnený vodíkom. Reakcia prebiehala 21 h. TLC platnička (EtOH/ konc. vodný roztok NH₃ = 25/1) potvrdila úplné zreagovanie látky **VI**. Obsah banky sa prefiltraval cez skladaný filter a filtrát sa odparil na RVO. K odparku sa pridal vodný roztok NaOH (10%, 10 ml) a DCM (30 ml). Vodná vrstva sa potom extrahovala ešte 3 × 25 ml DCM. Organické vrstvy sa spojili v Erlenmayerovej banke (250 ml), vložilo sa miešadlo, prisypali sa 2 lyžičky bezvodého Na₂SO₄ a zmes sa nechala miešať 2 hodiny. Obsah Erlenmayerovej banky sa prefiltraval cez vatú a filtrát sa odparil na RVO. Produktom bol bezfarebný olej, čistota a identita látky bola potvrdená ¹H-NMR spektrom³⁷. Výťažok reakcie bol 0,135 g (65%).

Látka **VII** (135 mg; výťažok 65%)

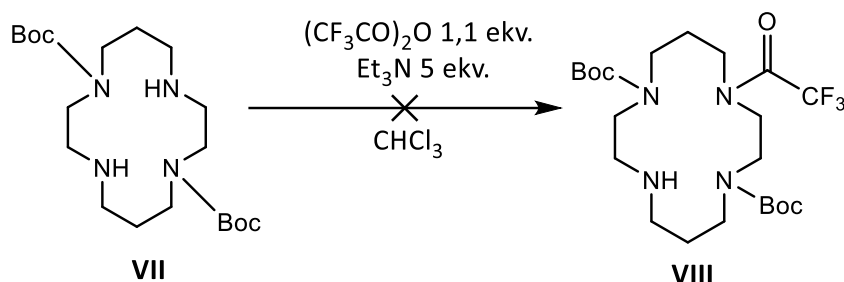
¹H-NMR (CDCl₃): δ 1,40 (s, 18H, C-CH₃); 1,73 (m, 4H, CH₂-CH₂-CH₂); 2,62 (t, 4H, CH₂-CH₂-CH₂); 2,75 (t, 4H, NH-CH₂); 3,31 (t, 8H, C=O-N-CH₂);

Reakcia K



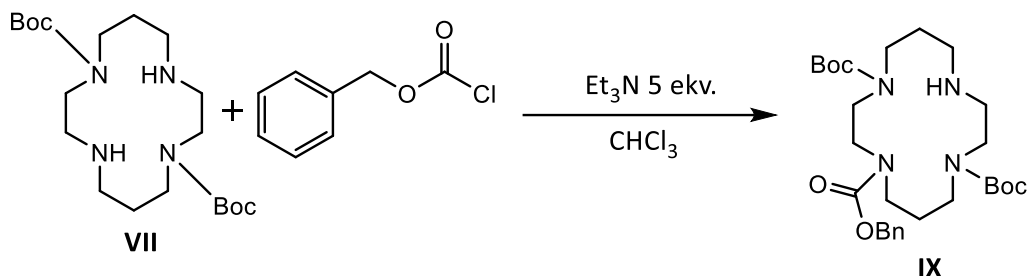
Látka **VII** (167 mg; 0,42 mmol) sa preniesla do slzovej banky (25 ml) s miešadlom. Banka sa prefúkla argónom a uzavrela septom. Injekciou sa do nej pridal TEA (0,58 ml; 10 ekv.; 4,17 mmol) a banka sa vložila do kúpeľa ľad-voda. Do prikvpkávacieho lievika sa pripravila zmes etyltrifluóracetátu (55 µl; 1,1 ekv.; 0,46 mmol) v suchom CHCl₃ (3 ml) a za miešania sa pomaly po dobu 30 min. prikvpkávala k zmesi v banke. Reakčná zmes sa ponechala miešať cez noc. Keďže pri následnej kontrole pomocou hmotnostného spektrometru nebol zistený vznik produktu, nechala sa zmes zahrievať na 50 °C po dobu 2 dní. Ani po uplynutí tejto doby však nebol pozorovaný vznik produktu.

Reakcia L



Do slzovej banky (25ml) sa odvážila látka **VII** (36 mg; 0,09 mmol). Banka sa prefúkla argónom, pridalo sa miešadlo a uzavrela septom. Pridal sa suchý CHCl_3 (1 ml) na rozpustenie látky **VII**. Do slzovej banky sa pridala TEA (63 μl ; 5 ekv.; 0,450 mmol). Oddelene sa pripravil roztok trifluóracetanhydridu (14 μl ; 1,1 ekv.; 0,10 mmol) v 1 ml suchého CHCl_3 . Zmes v slzovej banke sa vložila do kúpeľa ľad-voda. Pomaly, po dobu 15 min. sa za miešania z prikvapávacieho lievika pridával pripravený roztok trifluóracetanhydridu. Reakčná zmes sa ponechala miešať 2 dni. Ani po dvoch dňoch nebola zistená prítomnosť produktu pomocou hmotnostného spektrometra. Zmes sa nechala reagovať ďalšie 2 dni pri zahriatí na $50\text{ }^\circ\text{C}$, avšak vznik produktu stále nebol pozorovaný.

Reakcia M



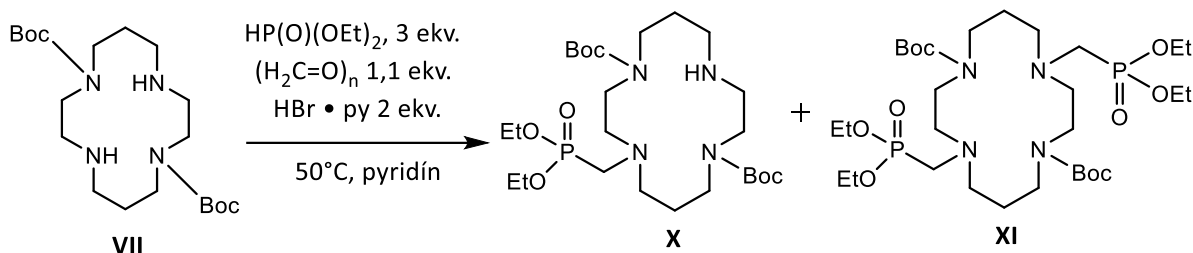
Do slzovej banky (25ml) bola navážená látka **VII** (73,1 mg; 0,18 mmol). Toto množstvo sa rozpustilo v suchom CHCl_3 (1,5 ml). Pridalo sa miešadlo, banka bola prefúknutá argónom a uzavretá septom. Do slzovej banky sa pridala TEA (127 μl ; 5 ekv.; 0,91 mmol). Oddelene sa pripravil roztok benzyl-chlórformiátu (26 μl ; 1 ekv; 0,18 mmol) v suchom CHCl_3 (1 ml). Zmes v banke sa ochladila na teplotu $0\text{ }^\circ\text{C}$ pomocou kúpeľa ľad-voda. Roztok benzyl-chlórformiátu sa pomocou injekčnej striekačky pomaly po kvapkách pridával po dobu 30 min., k miešanej zmesi v slzovej banke. Po pridaní sa odstránil kúpeľ a zmes sa ponechala pri laboratórnej teplote reagovať cez noc. Pomocou hmotnostného

spektrometru bola zistená prítomnosť produktu. Reakčná zmes bola extrahovaná 3 × 10 ml destilovanej vody a organická fáza bola odparená na RVO.

MS (ESI): (+) 535,42 [M+H]⁺, vypočítaná M_r = 534,3

3.3.4. Pokusy o zavedenie monosfosfonátového ramena na 1,8-diBoc cyklám

Reakcia N



Látka **VII** (113,9 mg; 0,29 mmol) sa preniesla do vialky, do ktorej bolo vložené miešadlo. Injekčnou striekačkou pridali 2 ml suchého pyridínu na rozpustenie látky **VII**. Pridal sa paraformaldehyd (9,4 mg; 1,1 ekv.; 0,31 mmol) a HBr·py (91 mg; 2 ekv.; 0,57 mmol). Na záver sa injekčnou striekačkou pridala dietylfosfit (0,11 ml; 3 ekv.; 0,85 mmol). Vialka bola prefúknutá prúdom argónu a uzavretá septom. Zmes sa zahriala na teplotu 45 °C a ponechala sa reagovať. Nasledujúci deň bola odobraná vzorka na ³¹P NMR, ktoré ukazovalo 50% konverziu. Zmes sa teda ponechala reagovať. Po 3 dňoch sa opäť rovnakým postupom pomocou NMR zistilo, že reakcia už ďalej neprebíha (dosiahla sa konverzia 61%) a reakčná zmes bola odparená na RVO. Ostal dooranžova sfarbený olej.

Zmes bola delená chromatografiou na stĺpci silikagélu (3 × 8 cm). Ako mobilná fáza sa použil MeOH/DCM = 95/5. Odoberali sa frakcie (12 ml). Vo frakciách 5-21 bola zachytávaná látka **XI**. Vo frakciách 22-50 vytekala zmes látok **X** a **XI**. Tieto frakcie boli spojené a prečisťované ďalšou chromatografiou na stĺpci silikagélu (1 × 10 cm). Ako mobilná fáza sa použil MeOH/DCM = 97/3. Zachytávali sa 6 ml frakcie. Vo frakciách 3-10 vytekala látka **XI**, vo frakciách 11 a 12 zmes látok **X** a **XI** a vo frakciách 13-20 čistá látka **X**. Frakcie s rovnakými látkami boli spojené a odparené na RVO. Látka **XI** mala podobu žltého oleja a výťažok bol 82 mg (41%). Látka **X** mala podobu bezfarebného oleja a výťažok bol 26 mg (9%).

Látka **X** (26,0 mg; výťažok 9%)

TLC: MF = MeOH/DCM = 95:5; R_f = 0,11

MF = MeOH/DCM = 97:3; R_f = 0,15

MS (ESI): (+) 551,45 [M+H]⁺, vypočítaná M_r = 550,35

¹H-NMR (CDCl₃): δ 1,34 (t, 6H, O-CH₂-CH₃); 1,47 (s, 18H, C-CH₃); 1,84 (t, 2H, CH₂-CH₂-CH₂); 2,10 (t, 2H, CH₂-CH₂-CH₂); 2,72–3,52(m, 19H, ring CH₂ a N-CH₂-P); 4,13 (p, 4H, O-CH₂-CH₃)

³¹P{ ¹H}-NMR (CDCl₃): 25,2 (s)

Látka **XI** (82,0 mg; výťažok 41%)

TLC: MF = MeOH/DCM = 95:5; R_f = 0,36

MF = MeOH/DCM = 97:3; R_f = 0,56

MS (ESI): (+) 701,55 [M+H]⁺, vypočítaná M_r = 700,39

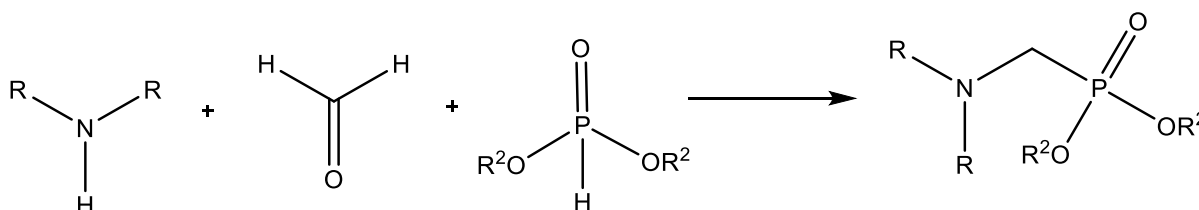
¹H-NMR (CDCl₃): δ 1,31 (t, 12H, O-CH₂-CH₃); 1,43 (s, 18H, C-CH₃); 1,70–1,77 (m, 4H, CH₂-CH₂-CH₂); 2,88–2,96 (m, 4H, N-CH₂-P); 3,24–3,38 (m, 8H, ring CH₂); 2,66–2,79 (m, 6H, ring CH₂); 4,10 (p, 8H, O-CH₂-CH₃)

³¹P{ ¹H}-NMR (CDCl₃): 25,2 (s)

4. Diskusia

4.1. Pokusy o monosubstitúciu na dvakrát chránenom cykláme

Deriváty kyselín fosforu sa na makrocykly zavádzajú pomocou tzv. fosfo-Mannichovej reakcie. Na obrázku 4.1. je uvedený jeden z typov tejto reakcie, ktorý sa nazýva Kabachnik-Fieldsova reakcia. Reaguje pri nej amín s aldehydom a látkou obsahujúcou P-H väzbu. Reakciou vzniká veľké množstvo vedľajších produktov, najmä vďaka viacnásobným alkyláciám na amínovej skupine.³⁸



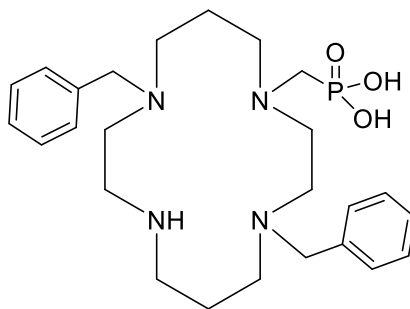
Obrázok 4.1.: Kabachnik-Fieldsova reakcia so zavádzaním metylfosfonátu

4.1.1. Príprava 1,8-dibenzylcyklámu (látka III)

Modifikovaním postupu³⁷ bol pripravený cyklám chránený v polohe 1,8- benzylovými skupinami. Charakteristické spektrá všetkých pripravených látok (**I-III**) sa zhodovali s publikovanými dátami.³⁷

4.1.2. Príprava látky IV

Našou snahou bolo pripraviť dvakrát chránený cyklám (poloha 1,8-) s naviazaným fosfonátovým ramenom a voľnou aminoskupinou, ktorá by sa dala ďalej modifikovať iným pendantným ramenom (Obr.4.2.). Chrániace benzylové skupiny mali byť odstránené hydrogenáciou. Produkt mal vzniknúť reakciou fosfo-Mannichovho typu, v ktorej by reagoval formaldehyd, dietylfosfit a chránený cyklám za kyslej katalýzy. Výsledkom mala byť štatistická zmes di-, tri- a tetrasubstituovaného cyklámu s preferenciou trisubstituovaného cyklu. Túto preferenciu sme chceli dosiahnuť použitím jedného ekvivalentu, resp. veľmi mierneho prebytku formaldehydu.



látka IV

Obrázok 4.3.: Požadovaný produkt monosubstitúcie na chránenom cykláme – látka IV

Reakcia D

V reakčnej zmesi vznikol biely zákal. Na ³¹P NMR spektre bol nepatrný náznak píku v oblasti, kde by sa dal očakávať pík produktu. Ani zahriatie z 50 °C na 80 °C však nevedlo k navýšeniu pozorovaného píku, a teda ani k vzniku významnejšieho množstva tejto látky.

Reakcia E

Pokúsili sme sa pripraviť látku **IV** podobným spôsobom ako v prípade reakcie D. Zmenili sme použité rozpúšťadlo a namiesto pyridínu sme použili toluén. Na kyslú katalýzu sa použila kyselina trifluóroctová. V reakčnej zmesi boli pozorované 2 fázy. Látka **IV** však vôbec nevznikala, nepomohlo ani zahrievanie reakčnej zmesi na teplotu 80 °C.

Reakcia F

Pri ďalšej modifikácii reakcie D sa vynechala kyslá katalýza a reaktivita mala byť moderovaná použitím jedného ekvivalentu dietylfosfitu. V ³¹P NMR spektre bol pozorovaný pík v očakávanej oblasti vzniku produktu, ktorý aj po niekoľkých dňoch reakcie látok v daných podmienkach tvoril len približne 5% z celkovej plochy píkov zmesi.

Reakcia G

Pri tomto postupe sme predpokladali vznik N–C–P väzby s využitím otvorenia bis(aminálom) chráneného derivátu cyklámu pomocou nukleofilu. Donorom fosfonátového ramena nemal byť dietylfosfit, ale jeho *in situ* generovaná sodná soľ. Reaktivita mala byť moderovaná množstvom použitého sodíka (1,1 ekvivalentu). Keďže reakcia bola odskúšaná v menších množstvách (13 mg Na) bolo nevyhnutné zabezpečiť čo najsuchšie prostredie. Rozpúšťadlom bol suchý, predestilovaný, dimetylformamid a reakcia prebiehala v argónovej atmosfére (pod balónikom) v banke uzavretej gumovým septom. Kontrola pomocou ³¹P NMR ukázala vznik píku pri 25 ppm, ktorého intenzita naznačovala, že reakcia prebehla z 87%. Výsledná reakčná zmes sa delila chromatografiou na stĺpci silikagélu, kde sa ako mobilná fáza použil EtOH/NH₃ (konc. vodný roztok) = 10/1. Ako prvý mal kolónu opúšťať najmenej polárny, tetrasubstituovaný cyklám, za ním mal nasledovať požadovaný trisubstituovaný cyklám. Látku **IV** (Obr.4.2.) sa podarilo charakterizovať pomocou hmotnostného spektrometra a ¹H NMR spektra. Výťažok reakcie bol 22%. Látka **IV**, ako trisubstituovaný derivát cyklámu, vznikala v menšom množstve. Väčšinu produktu reakcie tvoril tetrasubstituovaný cyklám (51%).

Reakciu sa žiaľ napriek niekoľkým pokusom nepodarilo zreprodukovat', priebežná kontrola sa uskutočňovala pomocou ³¹P NMR, pričom sa sledovala intenzita píku s chemickým posunom okolo 25 ppm, ktorá zodpovedala vznikajúcej látke **IV**. Tá v danom

stechiometrickom pomere k intenzite píkov nezreagovaného dietylfosfitu, ktorý bol v reakcii v nadbytku, naznačovala stupeň konverzie reakcie. Pri opakovaní reakcie nepomohlo ani zväčšenie množstva reaktantov (44,8 mg Na), dosiahla sa len 8% konverzia. Reakcia bola odskúšaná aj s miernym nadbytkom sodíka (1,2 ekvivalentu), výsledok bol však podobný ako v ostatných prípadoch (dosiahla sa 12% konverzia). Vyskúšaná bola aj možnosť v priebehu reakcie do reakčnej zmesi dodatočne pridať sodnú soľ dietylfosfitu (0,3 ekv.), k zmene to však nevedlo.

Testovali sme aj možnosť zavedenia metylfosfonátových ramien na obe nechránené aminoskupiny cyklámu, pomocou prebytku vybraných reaktantov (3 ekv. Na, 12 ekv. dietylfosfitu). Cieľom bolo overiť správnosť postupu pri reakcii G, keďže reakcia prebiehajúca do oboch nechránených polôh už bola popísaná.³⁹ Reakčná zmes bola aj po jednom dni homogénna a ³¹P NMR spektrum ukázalo, že reakcia prebehla z 94%.

Vyskúšané bolo aj oddelené generovanie soli dietylfosfitu (z 9,7 mg Na) a jej pomalé pridávanie k roztoku dibenzylcyklámu v 8 ml DMF, aby sa zabezpečilo lepšie rozpustenie východiskového dibenzylcyklámu, a tým sa zlepšila homogénnosť zmesi (výsledkom bola 12% konverzia).

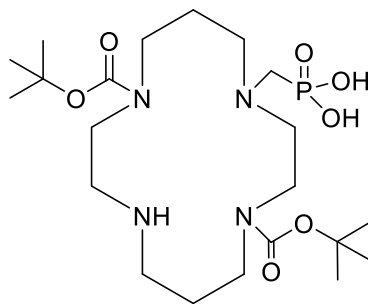
Problémom pri reprodukovaní reakcie bolo pravdepodobne nedostatočne suché prostredie (neskôr aj napriek používanému predestilovanému rozpúšťadlu). Najmä pri použití malých množstiev reaktantov mohlo na povrchu sodíka dochádzať k vytvoreniu malej, ťažko pozorovateľnej vrstvy NaOH, ktorá by spotrebovala časť množstva sodíka potrebného na vytvorenie soli. Vzniknutá vrstva NaOH mohla ovplyvňovať aj homogénnosť zmesi. Ďalším problémom mohla byť čistota sodíka, ktorý bol síce vždy čerstvo okrájaný, ale mohol napriek tomu obsahovať nejaké nečistoty.

4.1.3. Príprava látky X

Reakcia N

Pokus o prípravu látky X fosfo-Mannichovou reakciou vychádzal z dvakrát chráneného cyklámu. Cieľom bolo dostať štatistickú zmes, v ktorej by dominovala látka X (popri látke XI a východiskovej látke VII) (Obr.4.3.). Reakcia bola moderovaná použitím jedného ekvivalentu, resp. mierneho prebytku paraformaldehydu (podobne ako pri reakcii D). Po troch dňoch bola pomocou spektra zistená konverzia 61%, ktorá sa ďalej nezvyšovala. Napriek tomu, že TLC platnička naznačovala bezproblémový priebeh delenia, zistili sa pri následnej chromatografii ťažkosti. Ako prvá z kolóny tiekla látka XI.

Po odobratí veľkého množstva frakcií (17), v ktorých sa látka **XI** nachádzala rozriedená, začala z kolóny vytekať zmes látok **X** a **XI**. Látka **XI** vytekala v malých množstvách z kolóny aj v posledných frakciách spolu s látkou **X** a východiskovou látkou (**VII**). Pri následnej chromatografii zmesových frakcií sa podarilo za použitia polárnejšej zmesi (MeOH/DCM 97:3) izolovať látku **X** v podobe bezfarebného oleja. Výťažok reakcie bol však (aj kvôli problematickému čisteniu) malý a látka **X** bola získaná v menšom množstve (9% : 41% látky **XI**).



látka **X**

Obrázok 4.3.: Požadovaný produkt monosubstitúcie na chránenom cykláme – látka **X**

4.2. Príprava ortogonálneho chránenia cyklámu

Cieľom bolo pripravenie trikrát chráneného cyklámu, v ktorom by dve chrániace skupiny boli benzylové a jedna skupina by bola *tert*-butyloxykarbonylová (látka **V**). Východiskovou látkou bola látka **III**. Očakávaný bol vznik štatistickej zmesi, v ktorej by prevaha trisubstituovaného cyklámu bola zabezpečená pridaním jedného ekvivalentu, resp. mierneho prebytku (1,1 ekvivalentu) Boc₂O. Reakcia prebiehala v bázickom prostredí, kde trietylamín zabezpečoval deprotonáciu látky **III**, a tým urýchl'oval reakciu. Kvôli zabezpečeniu prevahy trisubstituovaného produktu sa použil jeden ekvivalent, resp. mierny prebytok (1,1 ekv.) trietylamínu. TLC platnička (Hexán/EtOAc = 3/1) ukazovala vznik troch frakcií, ktoré sa získali chromatografiou na stĺpci silikagélu. Prvá frakcia sa získala eluovaním s čistým EtOAc, druhá s čistým EtOH a tretia zmesou EtOH/DEA = (95/5). Kolónu mala opúšťať najskôr látka **VI**. Jej prítomnosť v prvej frakcii bola po izolácii potvrdená pomocou ¹H NMR spektra. Prvá frakcia mala podobu bezfarebného oleja, z ktorého však po chvíli vznikli biele kryštály. V druhej frakcii bola pomocou ¹H NMR spektra potvrdená látka **V** (Obr.4.3.). Frakcia mala podobu žltého oleja. Jednotlivé frakcie boli odvážené a prepočet na látkové množstvo ukazoval preferovaný vznik

tetrasubstituovaného cyklámu (78% : 22% trisubstituovaného). Reakcia prebehla z 51% (vo vzťahu k východiskovej látke **III**).

Pri snahe znížiť reaktivitu, a tým zvýšiť pomer vznikajúceho trisubstituovaného produktu sa použilo subekvivalentné množstvo trietylamínu aj Boc_2O (0,8 ekvivalentu pri oboch zložkách). Roztok Boc_2O sa k zmesi bázy a cyklámu pridával po kvapkách do zmesi chladenej kúpeľom ľad-voda. Takto uskutočnená reakcia síce zväčšila pomer vznikajúceho trisubstituovaného cyklámu (68% tetrasubstituovaného : 32%) avšak znížila celkové množstvo vznikajúcich produktov. To ukazovalo, že reakcia bola, napriek rovnakému reakčnému času ako pri prvom pokuse, uskutočnená len z 29%.

Keďže v oboch prípadoch boli získané množstvá trisubstituovaného cyklámu veľmi malé oproti množstvám reaktantov, bolo ďalšou snahou pripraviť výlučne tetrasubstituovaný produkt. Bola teda nastavená reakcia dibenzyl cyklámu s 2,5 ekv. Boc_2O a 2,1 ekv. trietylamínu. Reakcia prebiehala 24 hodín a roztok Boc_2O bol prikvapkávaný za laboratórnej teploty. Kontrola pomocou TLC platničky (hexán/ EtOAc = 3/1) ukázala prítomnosť jednej škvrny, ktorá predstavovala tetrasubstituovaný produkt. Produkt bol na dočistenie prefiltrovaný cez stĺpec silikagélu. Nízky výťažok (64% oproti kvantitatívnemu výťažku uvádzanému v literatúre³⁷) bol pravdepodobne spôsobený stratami na stĺpci silikagélu.

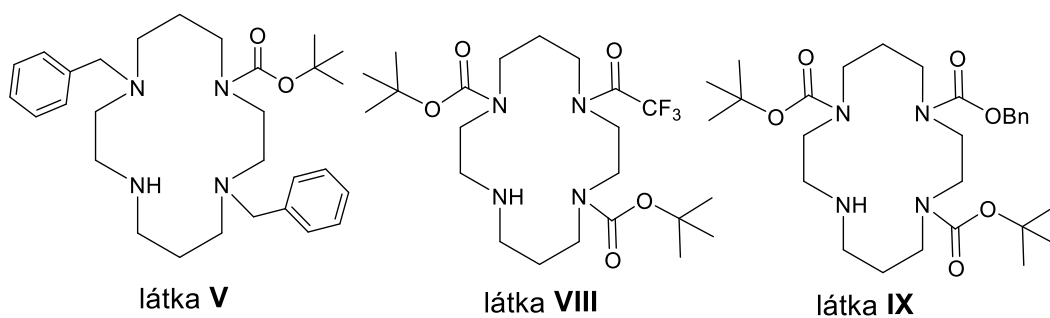
Následne sme sa zamerali na kombinácie skupiny Boc s inou chrániacou skupinou. Pre tento účel bolo potrebné odstrániť benzylové skupiny pomocou hydrogenácie. Oproti uvedenému postupu³⁷ bolo potrebné pridať viac octovej kyseliny, a tiež väčšie množstvo metanolu na rozpustenie východiskovej látky. Reakcia by mala prebiehať kvantitatívne³⁷, nami získaný výťažok (65%) by sa pravdepodobne dal zvýšiť, keby hydrogenácia prebiehala za zvýšenej teploty.

Ďalšou z možností ortogonálneho chránenia bola teda kombinácia dvoch skupín Boc a jednej trifluoracetylovej skupiny (látka **VIII**) (Obr.4.3.). Reakcia bola riadená použitím 1,1 ekvivalentu etylesteru kys. trifluoroctovej, ktorý sa pridával za zníženej teploty. Ako vedľajší produkt vznikol etanol, ktorý ako kyselina naprotonovával poslednú voľnú aminoskupinu cyklu, čím bránil naviazaniu sa chrániacej skupiny do uvedenej polohy na cykláme. Pridaný bol aj trietylamín, ktorý plnil úlohu „pufru“ (konkurent amínových skupín cyklámu z hľadiska viazania protónu). Reakcia neprebíhala ani po dvojdňovom zahriatí zmesi na teplotu 50 °C.

Ďalšou snahou bolo zvýšiť reaktivitu východiskovej látky zavádzajúcej TFA skupinu na cyklám. Miesto esteru sa použil reaktívnejší anhydrid za rovnakých podmienok ako

vyššie spomínaná reakcia s etylesterom kys. trifluoroctovej. Výsledky oboch reakcií boli podobné, vzniknutý žltý roztok produkt neobsahoval. Reakcia bola odskúšaná aj bez prídavku trietylamínu, výsledok bol však opäť rovnaký. Dôvodom neúspechu bolo pravdepodobne stérické bránenie pomerne objemných Boc aj TFA skupiny.

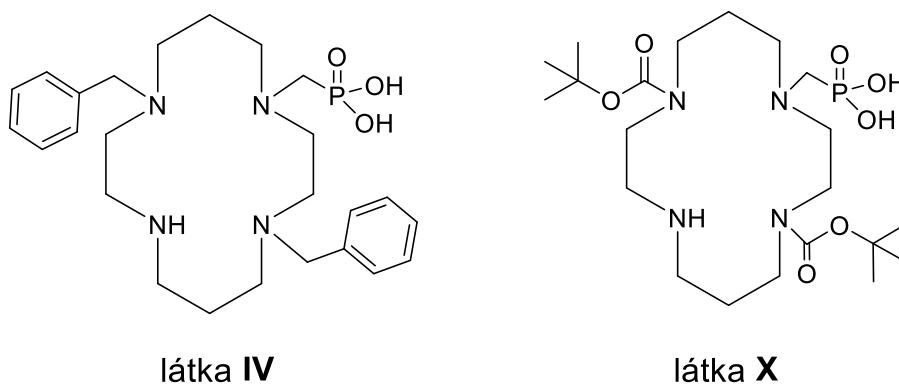
Potenciálne vhodnou skupinou na kombináciu so skupinami Boc je skupina Cbz, ktorá je menej objemným substituentom. Vyskúšalo sa teda jej zavedenie na dvakrát chránený cyklám (výsledkom mala byť príprava látky **IX**) (Obr.4.3.). Reakcia bola riadená použitím jedného ekvivalentu benzyl-chlórformiátu, ktorý sa pridával za zníženej teploty. Reakcia prebiehala aj bez použitia bázy. Do termínu odovzdania práce sa však nepodarilo látku **IX** izolovať.



Obrázok 4.3.: Skúmané spôsoby ortogonálneho chránenia cyklámu

5. Záver

Cieľom tejto bakalárskej práce bolo preskúmať syntetické možnosti monosubstitúcie derivátov kyselín fosforu na dvakrát chránenom cykláme. Fosfo-Mannichovou reakciou cyklámu chráneného dvoma benzylovými skupinami sa podarilo pripraviť malé množstvo látky **IV** (Obr.5.1.) (61 mg). Rovnakým typom reakcie cyklámu chráneného Boc skupinami v polohe 1,8- bolo pripravené malé množstvo derivátu cyklámu s jedným fosfonátovým ramenom – látka **X** (Obr.5.1.) (26 mg).



Obrázok 5.1.: Pripravené trisubstituované deriváty cyklámu

Ukázalo sa však, že v oboch prípadoch preferenčne vzniká produkt, v ktorom sa fosfonátové rameno substituovalo do dvoch polôh. Z tohto dôvodu sa následne zisťovali možnosti ortogonálneho chránenia cyklámu, ktoré by zabezpečili selektívnu substitúciu do jednej polohy na makrocykle.

Preskúmané boli tiež možnosti prípravy ortogonálne chránených derivátov cyklámu. Pripravený bol cyklám chránený ortogonálne kombináciou skupín Boc a Cbz. Tento derivát cyklámu, nebol kvôli nedostatku času izolovaný z reakčnej zmesi a vyčistený. Po vyčistení bude tento ligand potenciálne slúžiť pre následnú syntézu asymetricky substituovaného cyklámu s jedným pendantným ramenom. Odskúšané bolo aj chránenie pomocou kombinácie skupín Boc a TFA, ktoré sa však ukázala ako neúspešná.

6. Zoznam použitých skratiek

AcOH – octová kyselina

CT – počítačová tomografia (Computed Tomography)

DCM – dichlórmetán

DEA – Dietylamín

DMF– dimetylformamid

ESI – elektrónová sprejová ionizácia (Electrospray Ionization)

EtOAc – etyl acetát

EtOH – etanol

EZ – elektrónový záchyt

FDA – U.S. Food and Drug Administration

MeOH – metanol

MF – mobilná fáza

MRI – Magnetic resonance imaging

MS – hmotnostná spektrometria (Mass Spectrometry)

NMR – nukleárna magnetická rezonancia (Nuclear Magnetic Resonance)

R_f – retardačný faktor

RVO – rotačná vákuová odparka

SOD – Superoxid dismutáza

TEA – trietylamín

TFA – trifluóroctová kyselina

TLC – chromatografia na tenkej vrstve (Thin-Layer Chromatography)

7. Použitá literatúra

1. Havránek, E. et al. *Rádiofarmaká, Univerzita Komenského v Bratislave*, **2017**, ISBN: 978-80-223-4139-4
2. Wadas, T.J.; Wong, E.H.; Weisman, G. R.; Anderson, C.J. *Chem. Rev.*, **2010**, 110, 2858–2902
3. Maus, J. (2003): Image of a PET scanner, [online],
https://en.wikipedia.org/wiki/Positron_emission_tomography, (cit. 19.6.2021)
4. Hess, E.; Takacs, S.; Scholten, B.; Tárkányi, F.; Coenen, H.H.; Qaim, S.M. *Radiochim. Acta*, **2001**, 89, 357–362
5. Blower, P. J.; Lewis, J. S.; Zweit, J. *Nucl. Med. Biol.*, **1996**, 23, 957-980
6. Curiumpharma (2020): FDA approval of Detectnet, [online],
<https://www.curiumpharma.com/2020/09/08/radiomedix-and-curium-announce-fda-approval-of-detectnet-copper-cu-64-dotatate-injection-in-the-u-s/>, (cit. 16.5.2021)
7. Bindu, K. C.; Harmon, F.; Starovoitova, V.N.; Stoner, J.; Wells, D.P. *AIP Conf. Proc.*, **2013**, 1525, 407-411
8. Kubíček, V.; Böhmová, Z.; Ševčíková, R.; Vaněk, J.; Lubal, P.; Poláková, Z.; Michalíková, R.; Kotek, J.; Hermann, *Inorg. Chem.*, **2018**, 57, 6, 3061-3072
9. Sun, X.; Wuest, M.; Weisman, G.R.; Wong, E.H.; Reed, D.P.; Boswell, C.A.; Motekaitis, R.; Martell, A.E.; Welch, M.J.; Anderson, C.J. *J. of Med. Chem.*, **2002**, 45, 2, 469-477
10. Wong, E.H.; Weisman, G.R.; Hill, D.C.; Reed, D.P.; Rogers, M.E.; Condon, J.S.; Fagan, M.A.; Calabrese, J.C.; Lam, K.C.; Guzei, I.A.; Rheingold, A.L. *J. Am. Chem. Soc.*, **2000**, 122, 43, 10561–10572
11. Pazderová, L.; David, T.; Hlinová, V.; Plutnar, J.; Kotek, J.; Lubal, P.; Kubíček, V.; Hermann, P. *Inorg. Chem.*, **2020**, 59, 12, 8432–8443
12. Bernhardt, P.V.; Bramley, R.; Engelhardt, L.M.; Harrowfield, J.M.; Hockless, D.C.R.; Korybut-Daszkiwicz, B.R.; Krausz, E.R.; Morgan, T.; Sargeson, A.M. *Inorg. Chem.*, **1995**, 34, 14, 3589–3599
13. Donnelly, P.S.; Harrowfield, J.M.; Skelton, B.W.; White, A.H. *Inorg Chem.*, **2001**, 22, 5645-5652

14. Heroux, K.J.; Woodin, K.S.; Tranchemontagne, D.J.; Widger, P.C.; Southwick, E.; Wong, E.H.; Weisman, G.R.; Tomellini, S.A.; Wadas, T.J.; Anderson, C.J.; Kassel, S.; Golen, J.A.; Rheingold, A.L. *Dalton Trans.*, **2007**, June, 21, 2150-62.
15. Anderson, C.J.; Ferdani, R. *Cancer Biother. Radiopharm.*, **2009**, 24, 4, 379-393
16. Cole, D.A.; Mercer-Smith, J.A.; Schreyer, S.A.; Norman, J.K.; Lavallee, D.K. *Int. J. Rad. Appl. Instrum. [B]*, **1990**, 17, 5, 457-464
17. Jeong, H.-G.; Choi, M.-S. *Isr. J. Chem.*, **2016**, 56, 2-3, 110-118
18. Waghorn, P.A. *J. Labelled Comp. Radiopharm.*, **2014**, 57, 4, 304-309
19. Bass, L.A.; Wang, M.; Welch, M.J.; Anderson, C.J. *Bioconjugate Chem.*, **2000**, 11, 4, 527-532
20. Boswell, C.A.; Sun, X.; Niu, W.; Weisman, G.R.; Wong, E.H.; Rheingold, A.L.; Anderson, C.J. *J. Med. Chem.*, **2004**, 47, 6, 1465-1474
21. David, T.; Hlinová, V.; Kubíček, V.; Bergmann, R.; Striese, F.; Berndt, N.; Szöllösi, D.; Kovács, T.; Máthé, D.; Bachmann, M.; Pietzsch, H.-J.; Hermann, P. *J. Med. Chem.*, **2018**, 61, 19, 8774-8796
22. Kotek, J.; Vojtíšek, P.; Císařová, I.; Hermann, P.; Jurečka, P.; Rohovec, J.; Lukeš, I. *Collect. Czech. Chem. Commun.*, **2000**, 65, 1289-1316
23. Paurová, M.; Havlíčková, J.; Pospíšilová, A.; Vetrík, M.; Císařová, I.; Stephan, H.; Pietzsch, H.-J.; Hrubý, M.; Hermann, P.; Kotek, J. *Chem. - Eur. J.*, **2015**, 21, 4671-4687
24. David, T.; Kubíček, V.; Gutten, O.; Lubal, P.; Kotek, J.; Pietzsch, H.-J.; Rulíšek, L.; Hermann, P. *Inorg. Chem.*, **2015**, 54, 24, 11751-11766
25. Stigers, D.J.; Ferdani, R.; Weisman, G.R.; Wong, E.H.; Anderson, C.J.; Golen, J.A.; Moore, C.; Rheingold, A.L. *Dalton Trans.*, **2010**, 39, 1699-1701
26. Pandya, D.N.; Kim, J.Y.; Park, J.Ch.; Lee, H.; Phapale, P.B.; Kwak, W.; Choi, T.H.; Cheon G.J.; Yoon, Y.R.; Yoo, *Chem. Commun.*, **2010**, 46, 3517-3519
27. Kotek, J.; Hermann, P.; Vojtíšek, P.; Rohovec, J.; Lukeš, I. *Collect. Czech. Chem. Commun.*, **2000**, 65, 243-266
28. Royal, G.; Dahaoui-Gindrey, V.; Dahaoui, S.; Tabard, A.; Guillard, R.; Pullumbi, P.; Lecomte, C. *Eur. J. Org. Chem.*, **1998**, 9, 1971-1975

29. Yang, W.; Giandomenico, C.M.; Sartori, M.; Moore, D.A.; *Tetrahedron Lett.*, **2003**, 44,12, 2481-2483
30. Greene, T.W.; Wuts, P.G.M. Protective groups in organic synthesis, 3. ed., *Wiley-Interscience*, **1999**, ISBN: 978-04-711-6019-9
31. Herrero, C.; Ouaranta, A.; El Ghachtouli, S.; Vauzeilles, B.; Leibl, W.; Aukaloo, A. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2014**,16, 12067-12072
32. Camus, N.; Halime, Z.; Le Bris, N.; Bernard, H.; Platas-Iglesias, C.; Tripier, R. *J. Org. Chem.*, **2014**, 79, 5, 1885–1899
33. Peters, A.D.; McCallion, C.; Booth, A.; Adams, J.A.; Rees-Unwin, K.; Pluen, A.; Burthem, J.; Webb, S.J. *Org. Biomol. Chem.*, **2018**,16, 6479-6490
34. C. Schickaneder, F. W. Heinemann, and R. Alsfasser, *Eur. J. Inorg. Chem.*, **2006**, 2357-2364
35. Dischino, D.D.; Delaney, E.J.; Emswiler, J.E.; Prasad, G.T.; Srivastava, S.K.; Tweedle M.F.; *Inorg. Chem.*, **1991**, 30, 6, 1265-1269
36. Denat, F.; Brandés, S.; Guillard, R.; *Synlett*, **2000**, 5, 561-574
37. Chartres, J.D.; Lindoy, L.F.; Meehan, G.V. *Tetrahedron*, **2006**, 62, 17, 4173 - 4187
38. Katritzky, A.; Ramsden, C.; Scriven, E.; Taylor, R. Comprehensive Heterocyclic Chemistry III, *Elsevier Science*, **2008**, ISBN: 978-00-804-4991-3
39. Svobodová, I.; Havlíčková, J.; Plutnar, J.; Lubal, P.; Kotek, J.; Hermann, P. *Eur. J. Inorg. Chem.*, **2009**, 24, 3577-3592