

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Studijní obor: Bioanorganická chemie



Příprava 12/14-členných pyridinových makrocyclických ligandů
využitelných v diagnostických zobrazovacích metodách

Bakalářská práce

Vedoucí práce:

RNDr. Bohuslav Drahoš, Ph.D.

Autor práce:

Marie Pražáková

Jméno autora:	Marie Pražáková
Název práce:	Příprava 12/14-členných pyridinových makrocyclických ligandů využitelných v diagnostických zobrazovacích metodách
Název práce v angličtině:	Synthesis of 12/14-membered pyridine-based macrocyclic ligands for application in diagnostic imaging
Druh práce:	Bakalářská
Katedra:	Katedra anorganické chemie
Vedoucí práce:	RNDr. Bohuslav Drahoš, Ph.D.
Rok obhajoby:	2017

ABSTRAKT

Bakalářská práce je zaměřena na stručný přehled vybraných diagnostických zobrazovacích metod používaných v medicíně a na popis využívaných kontrastních látek a 12/14členných tetraazamakrocyclů, které v tomto směru mohou nalézt nebo již našly využití. Dále se práce zabývá syntézou 12členného tetraazamakrocyclického ligandu L_1 (3,6,9,15-tetraazabicyklo[9.3.1]pentadeca-1(15),11,13-trien) a obdobného 14členného tetraazamakrocyclického ligandu L_2 (3,7,11,17-tetraazabicyklo[11.3.1]heptadeca-1(17),13,15-trien). Oba ligandy byly připraveny Richman-Atkinsonovou syntézou s využitím *p*-toluensulfonylové chránicí skupiny. Následně byly připraveny i deriváty obou ligandů se třemi acetátovými pendantními rameny L_1Ac_3 (3,6,9-Tris(karboxymethyl)-3,6,9,15-tetraazabicyklo[9.3.1]pentadeca-1(15),11,13-trien) a L_2Ac_3 (3,7,11-Tris(karboxymethyl)-3,7,11,17-tetraazabicyklo[11.3.1]heptadeca-1(17),13,15-trien). Ligandy L_1 a L_2 a jejich deriváty L_1Ac_3 a L_2Ac_3 byly detailně charakterizovány pomocí 1H , ^{13}C a 2D NMR spektroskopie a MS spektrometrie. Připravené ligandy slouží ke komplexaci různých kovových (především lanthanoidových) iontů a takové komplexy mají všestranné využití v různých zobrazovacích metodách používaných v medicíně.

Klíčová slova:	pyridin, makrocyclus, ligand, kontrastní látka, diagnostické metody
Počet stran:	47
Jazyk:	čeština

Author's name: Marie Pražáková

Title: Synthesis of 12/14-membered pyridine-based macrocyclic ligands for application in diagnostic imaging

Type of thesis: Bachelor

Department: Department of inorganic chemistry

Supervisor: RNDr. Bohuslav Drahoš, Ph.D.

The year of presentation: 2017

ABSTRACT

The bachelor thesis is focused on brief description of selected diagnostic imaging methods used in medicine and typical contrast agents applied in these methods as well as 12/14memberd tetraazamacrocycles, which have been used or have a potential use in this way. The thesis also deals with the synthesis of 12memberd tetraazamcrocyclic ligand L_1 (3,6,9,15-tetraazabicyclo[9.3.1]pentadeca-1(15),11,13-triene) as well as analogous 14membered macrocycle L_2 (3,7,11,17-tetraazabicyclo[11.3.1]heptadeca-1(17),13,15-triene). Both ligands were prepared by using Richman-Atkins procedure with *p*-toluenesulfonyl protecting-group. Derivatives of both ligands with three acetic acid pendant arms L_1Ac_3 (3,6,9-Tris(carboxymethyl)-3,6,9,15-tetraazabicyclo[9.3.1]pentadeca-1(15),11,13-triene) and L_2Ac_3 (3,7,11-Tris(carboxymethyl)-3,7,11,17-tetraazabicyclo[11.3.1]heptadeca-1(17),13,15-triene) were prepared as well. Ligands L_1 and L_2 and their derivatives, L_1Ac_3 and L_2Ac_3 were thoughtfully characterized by 1H , ^{13}C a 2D NMR spectroscopy and MS spectrometry. These prepared ligands serve for complexation of different metal ions (mainly lanthanide) and obtained coordination compounds have a versatile application in different imaging methods in medicine.

Key words: pyridine, macrocycle, ligand, contrast agent, diagnostic methods

Number of pages: 47

Language: Czech

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci s názvem „*Příprava 12/14-členných pyridinových makrocyclických ligandů využitelných v diagnostických zobrazovacích metodách*“ vypracovala samostatně pod vedením RNDr. Bohuslava Drahoše, Ph.D. V práci jsem uvedla veškeré použité zdroje, jejichž celkový soupis je uveden v seznamu použité literatury.

V Olomouci dne:

vlastnoruční podpis autora

PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych chtěla poděkovat především RNDr. Bohuslavu Drahošovi, Ph. D. za vedení práce, trpělivý přístup, užitečné rady a ochotu vždy pomoci, a za měření NMR a MS spekter. Dále spolužákům za vytvoření příjemného prostředí během studia a především rodičům za jejich nezměrnou podporu.

Obsah

CÍLE PRÁCE.....	9
TEORETICKÁ ČÁST.....	10
1 Tomografie magnetické rezonance.....	10
1.1 Kontrastní látky pro MRI	12
1.1.1 <i>T₁ kontrastní látky</i>	13
1.1.2 <i>T₂ kontrastní látky</i>	15
2. Jednofotonová emisní výpočetní tomografie (SPECT)	15
2.1 Kontrastní látky pro SPECT	16
3. Pozitronová emisní tomografie (PET).....	17
3.1 Kontrastní látky pro PET	19
4 Optické zobrazování (OI)	21
4.1 Fluorescenční zobrazování (FI)	21
4.2 Bioluminiscenční zobrazování (BLI)	22
4.3 Techniky využívající optického zobrazování	22
4.3.1 Fluorescenční zobrazování v blízké infračervené oblasti (Near-Infrared Fluorescence Imaging)	22
4.3.2 Difúzní optická tomografie (DOT).....	22
4.3.3 Difúzní optická spektroskopie (DOS)	23
4.3.4 Fluorescenční mikroskopie (FM)	23
4.4 Kontrastní látky pro OI	23
4.4.1 Makrocikly značené fluoroforem	23
4.4.2 Luminiscenční sondy	25
5 12/14členné pyridinové makrociklické ligandy využitelné v diagnostických metodách.....	26
5.1 Využití v MRI	26
5.2 Využití ve SPECT.....	29
EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	30
SEZNAM POUŽITÝCH CHEMIKÁLIÍ	30
METODY CHARAKTERIZACE	31

Spektroskopie nukleární magnetické rezonance	31
Hmotnostní spektrometrie.....	31
Chromatografie na tenké vrstvě.....	31
6. Syntetická příprava 12- a 14členného pyridinového makrocyklu se třemi acetátovými rameny.....	32
6.1 Syntéza Ts ₃ pr (N ¹ ,N ³ -ditosyl-N ¹ -(3-(tosylamino)propyl)propan-1,3-diaminu)	32
6.2 Syntéza Ts ₃ en (N ¹ ,N ² -ditosyl-N ¹ -(2-(tosylamino)ethyl)ethan-1,2-diaminu) (první postup)	32
6.3 Syntéza Ts ₃ en (druhý postup).....	33
6.4 Syntéza makrocyklu L ₁ Ts ₃	33
6.5 Syntéza makrocyklu L ₂ Ts ₃	34
6.6 Syntéza makrocyklu L ₁ a L ₂ – deprotektce tosylových skupin	35
6.7 Syntéza L ₁ Ac ₃ a L ₂ Ac ₃	36
DISKUZE	39
7 Syntéza Ts ₃ pr	40
8 Syntéza Ts ₃ en (první postup).....	40
9 Syntéza Ts ₃ en (druhý postup).....	40
10 Syntéza makrocyklu L ₁ Ts ₃ a L ₂ Ts ₃	41
11 Syntéza makrocyklu L ₁ a L ₂ – deprotektce tosylových skupin	41
12 Syntéza L ₁ Ac ₃ a L ₂ Ac ₃	42
ZÁVĚR	44
Seznam použité literatury	45

ÚVOD

Diagnostické zobrazovací metody slouží především k zobrazování vnitřních struktur různých typů organismů. Vyhodnocením dané metody se následně získává obrazu, na kterém se různé typy struktur liší intenzitou zobrazení neboli kontrastem. Aby byl kontrast lépe viditelný a vyhodnotitelný, je užíváno kontrastních látek, které mají v těle nerovnoměrnou distribuci, která je na získaném obraze viditelná. Díky tomu lze následně odlišit tkáně, anatomické struktury, zobrazit či zvýraznit patologické jevy nebo lze zobrazit i fungování různých procesů. Užívané kontrastní látky jsou rozlišovány podle fyzikálního principu dané zobrazovací metody či podle způsobu podání. Jako kontrastní látky mohou vystupovat látky různých složení: izotopicky značené anorganické soli, značené organické sloučeniny nebo koordinační sloučeniny, které jsou tvořené ligandem a centrálním atomem kovu.

Jako ligandy mohou být použity i 12/14členné makrocyclické sloučeniny obsahující pyridin. Díky jejich schopnosti komplexace různých kovových iontů jsou vhodnými kandidáty na využití v klinické praxi a mohou být užity pro více diagnostických metod, v závislosti na tom, který kovový ion je ligandem komplexován.

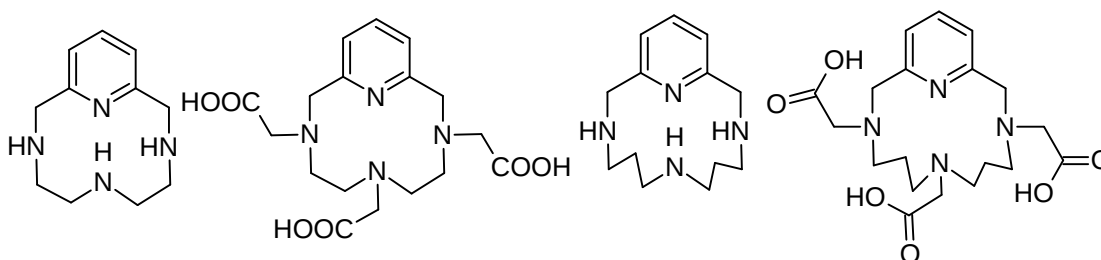
CÍLE PRÁCE

Cílem bakalářské práce bylo provedení literární rešerše, ve které byly stručně charakterizovány vybrané diagnostické zobrazovací metody a kontrastní látky používané v klinické praxi, včetně uvedení současného a potenciálního použití 12/14členných pyridinových makrocyclů jako kontrastních látek při těchto metodách.

Dalším cílem byla resyntéza 12členného pyridinového makrocyclu L_1 (3,6,9,15-tetraazabicyklo[9.3.1]pentadeka-1(15),11,13-trienu) a 14členého pyridinového makrocyclu L_2 (3,7,11,17-tetraazabicyklo[11.3.1]heptadeka-1(17),13,15-trienu) (Obr. 1) včetně charakterizace pomocí ^1H NMR, ^{13}C NMR, 2D NMR a MS spekter.

Dalším cílem byla modifikace uvedených ligandů pomocí acetátových pendantních ramen za vzniku $L_1\text{Ac}_3$ (3,6,9-Tris(karboxymethyl)-3,6,9,15-tetraazabicyklo[9.3.1]pentadeka-1(15),11,13-trien) a $L_2\text{Ac}_3$ (3,7,11-Tris(karboxymethyl)-3,7,11,17-tetraazabicyklo[11.3.1]heptadeka-1(17),13,15-trien) (Obr. 1) včetně charakterizace pomocí ^1H NMR, ^{13}C NMR, 2D NMR a MS spekter.

Připravené ligandy jsou vhodné pro komplexaci lanthanoidových iontů, kdy v závislosti na konkrétním zakomplexovaném lanthanoidovém iontu může být komplex využit v různých zobrazovacích technikách.



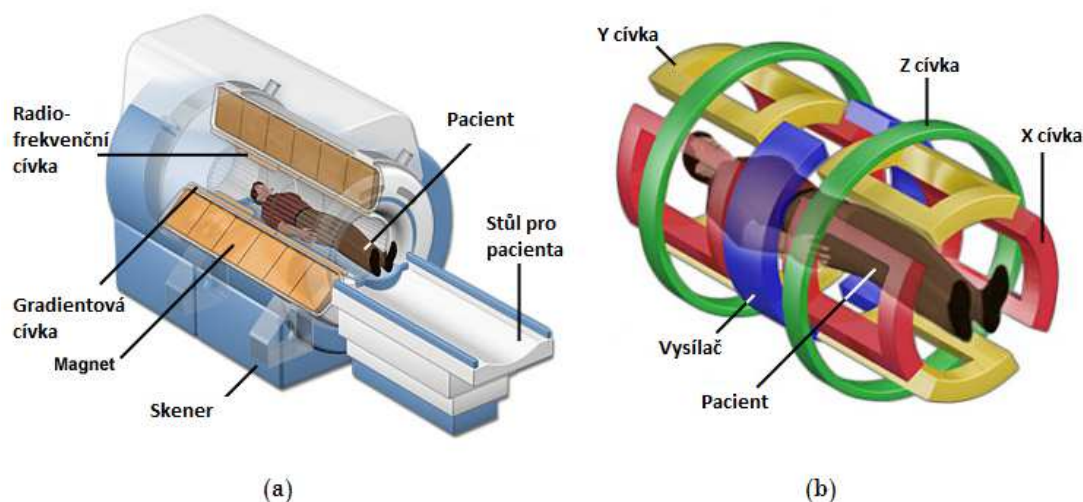
Obr. 1: Strukturní vzorce ligandů L_1 (3,6,9,15-tetraazabicyklo[9.3.1]pentadeka-1(15),11,13-trienu) (vlevo), jeho derivátu $L_1\text{Ac}_3$ (3,6,9-Tris(karboxymethyl)-3,6,9,15-tetraazabicyklo[9.3.1]pentadeka-1(15),11,13-trien) (vlevo uprostřed) a L_2 (3,7,11,17-tetraazabicyklo[11.3.1]heptadeka-1(17),13,15-trienu) (vpravo uprostřed) a jeho derivátu $L_2\text{Ac}_3$ (3,7,11-Tris(karboxymethyl)-3,7,11,17-tetraazabicyklo[11.3.1]heptadeka-1(17),13,15-trien) (vpravo)

TEORETICKÁ ČÁST

1 Tomografie magnetické rezonance

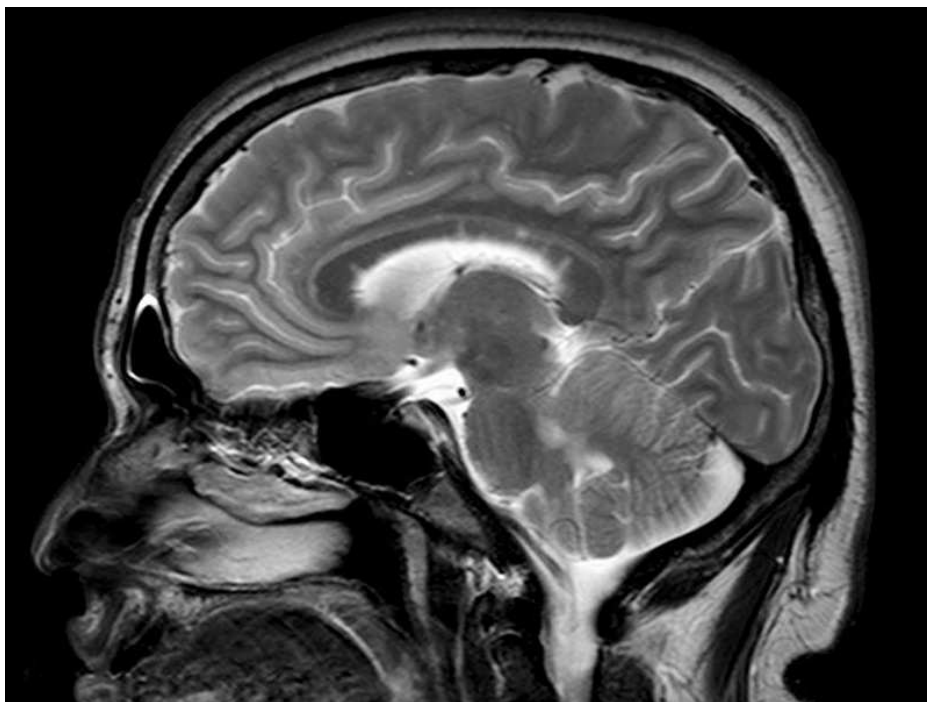
Tomografie magnetické rezonance (z angl. Magnetic Resonance Imaging –MRI) je zobrazovací technika užívaná v medicíně, především v oblasti neuroradiologie, čili v oblasti zobrazování onemocnění mozku, míchy a páteře. Pomocí MRI lze rovněž indikovat poruchy muskuloskeletálního systému. Tato metoda slouží především k zobrazování anatomických a fyziologických procesů v těle.

Metoda MRI je založena na principu nukleární magnetické rezonance (NMR), která využívá chování magnetických momentů atomových jader (jádra s nenulovým spinovým kvantovým číslem).¹ Pro měření je zapotřebí vzorek (subjekt) vložit do silného statického externího magnetického pole (v praxi je ho dosahováno pomocí supravodivých magnetů) a aplikovat radiofrekvenční puls(y) (Obr. 2). Poté je možné měřit signál.



Obr. 2: Schematické vyobrazení MRI skeneru: Průřez MRI skenerem (a) a rozložení magnetů v MRI skeneru (b)²

V MRI je nejčastěji měřeným jádrem atom vodíku ^1H , který obsahuje v jádru jediný proton a v těle se vyskytuje přirozeně, především ve formě vody a i v některých tukách. Po skončení radiofrekvenčního pulsu dochází k návratu systému do původního stavu a tento děj je nazýván relaxace. Relaxace je proces řídicí se kinetikou prvního řádu a rozeznávají se především dva nejběžnější druhy relaxace – spin-mřížková (longitudinální/podélná) a spin-spinová (transverzální/příčná). První z nich je charakterizována spin-mřížkovým relaxačním časem T_1 (rychlostní konstanta děje je $1/T_1$), kdy dochází k návratu vektoru magnetizace v ose z do původního stavu (rovnováhy) a systém ztrácí energii ve formě tepla předávanému okolí nebo díky dipolárním interakcím s okolními jádry. Druhý typ relaxace je charakterizován spin-spinovým relaxačním časem T_2 (rychlostní konstanta děje je $1/T_2$), kdy dochází k návratu vektoru magnetizace v rovině xy do původního stavu (do nuly) během kterého dochází k tzv. „rozfázování“ nebo „rozsynchronizování precese“, což je způsobeno interakcí dvou jader s opačnými spiny a případnou nehomogenitou magnetického pole.³ T_2 je vždy menší než T_1 a oba závisí především na složení okolních tkání a jejich nepřímé měření, využívá se porovnávání jejich rozdílů, je základem MRI. Hodnoty relaxačních časů se mění v závislosti na biochemických podmínkách (koncentrace vody ve tkáni, pH apod.) a proto mohou mít jednotlivé druhy tkání různý kontrast (světlost a tmavost na MRI snímku v odstínech šedé, Obr. 3). Bohužel tento kontrast je většinou nedostačující a proto jej lze zvýšit i uměle pomocí aplikace tzv. kontrastní látky (z angl. contrast agent – CA), která má v těle nerovnoměrnou distribuci. Tyto kontrastní látky interagují s protony vody a mohou modifikovat jejich T_1 nebo T_2 relaxační časy. Pro získání výsledného 3D obrazu (měří se po vrstvách) se využívají různé gradienty magnetického pole a různé typy pulzních sekvencí (speciální série radiofrekvenčních pulsů optimalizované pro získání určitého druhu signálu).



Obr. 3: Ukázka získaného obrazu po vyšetření mozku pomocí MRI⁴

Výhodou zobrazovací metody MRI je zejména nepoužívání ionizujícího záření, dobré 3D rozlišení a možnost zobrazení v libovolné rovině, a také dobrá citlivost při zobrazování měkkých tkání (která musí být v cca 40 % případech zvýšena aplikací kontrastní látky).

1.1 Kontrastní látky pro MRI

Jako kontrastní látky jsou používány látky paramagnetické – T_1 kontrastní látky nebo látky superparamagnetické – T_2 kontrastní látky.⁵ Zatímco T_1 kontrastní látky indukují pozitivní kontrast, tj. zesilují ^1H signál ve tkáni, tak T_2 kontrastní látky způsobují lokální snížení ^1H signálu, které se projeví ztmavnutím zobrazované tkáně.⁶

U kontrastních látek se setkáváme s veličinou zvanou relaxivita. Jedná se o veličinu, pomocí které se popisuje efektivita kontrastní látky. Je definována jako zvýšení rychlosti relaxace vody (rozpouštědla) ve tkáni ($1/T_1$ nebo $1/T_2$) v závislosti na koncentraci paramagnetické látky (1).

$$\frac{1}{T_i} = \frac{1}{T_i^0} + r_i[\text{CA}] \quad i = 1, 2 \quad (1)$$

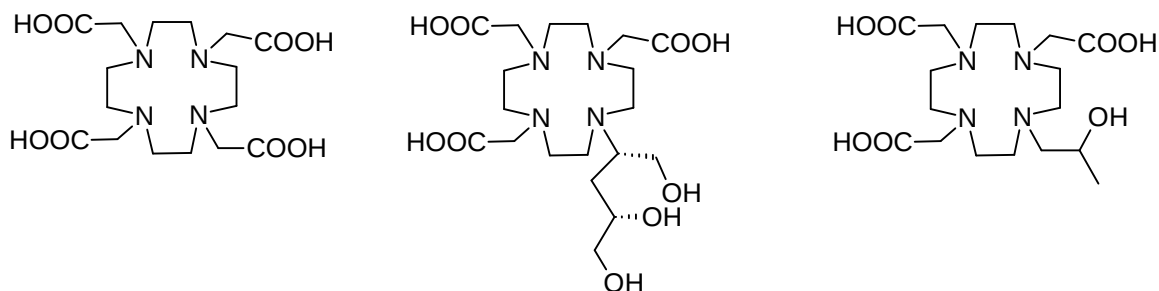
$(1/T_i = \text{pozorovaná rychlost relaxace } [s^{-1}], 1/T_i^0 = \text{diamagnetický příspěvek k rychlosti relaxace } [s^{-1}], r = \text{relaxivita } [mM^{-1}s^{-1}], [CA] = \text{koncentrace kontrastní látky v mM})$

1.1.1 T_1 kontrastní látky

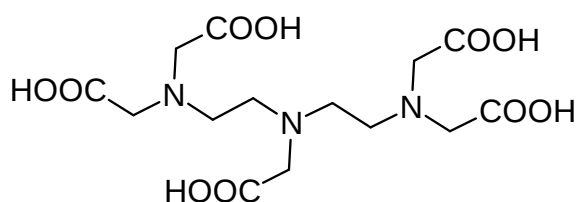
Jedná se o nejčastěji užívanou skupinu kontrastních látek založených na mechanismu longitudinální (podélné) relaxace, která je způsobena pohybem sousedících ^1H protonů, které vytváří oscilující magnetické pole, které stimuluje návrat měřených ^1H protonů H_2O do rovnováhy.⁵ Pokud do tohoto prostředí vložíme molekulu obsahující nepárové elektrony, dojde k návratu do rovnováhy rychleji a efektivněji, jelikož magnetický moment elektronu je 658x silnější než protonu. Zkrácení T_1 času se na snímku projeví hyperintenzitou (bílým stínem).³ Jako T_1 kontrastní látky jsou tedy hojně využívány sloučeniny obsahující nepárové elektrony, především sloučeniny lanthanoidů, nejčastěji se jedná o komplexní sloučeniny obsahující Gd^{3+} se sedmi nepárovými elektrony. Samotný Gd^{3+} je vysoce toxický, a proto musí být vázán do podoby komplexní sloučeniny, ze které se nesmí v organismu uvolňovat. Gadolinité komplexy mají nejčastěji koordinační číslo 9 a ligandy používané k jeho komplexaci jsou většinou oktaedentátní.⁷ Poslední vazebné místo zaujímá molekula vody, která se tak dostává do bezprostřední blízkosti silně paramagnetického Gd^{3+} , což způsobuje urychlení relaxace jejich jader ^1H .⁵ Rovněž se tato koordinovaná molekula vody vyměňuje s molekulami vody v okolí komplexu a tím zprostředkovává přenos magnetické informace z gadolinitého iontu na okolní molekuly vody.⁸ Výsledný komplex musí být rovněž stabilní, a to jak termodynamicky, tak kineticky, aby po jeho aplikaci nedošlo k rozkladu *in vivo*. Jedná se o poměrně velké makromolekuly, které nemohou proniknout do buněk, proto kolují v těle většinou jen krví.⁹

Nejpoužívanější látkou je gadoterová kyselina, známá rovněž jako Gd-DOTA (Dotarem®, DOTA = 1,4,7,10-tetraazacyklododekan-1,4,7,10-tetraoctová kyselina, Obr. 4), která je využívána ve formě roztoku soli s megluminem (N-methyl-D-glukosaminem). Dále se využívá řada gadolinitých komplexů s dalšími makrocyclickými ligandy odvozenými od cyklenu (1,4,7,10-tetraazacyklododekan) (Obr. 4). Příkladem lze uvést gadobutrol, známý rovněž jako Gd-DO3A-butrol (DO3A = 1,4,7,10-tetraazacyklododekan-1,4,7-trioctová kyselina) a strukturně podobný gadoteridol, známý rovněž jako Gd-HP-DO3A (Prohance®,

HP-DO3A = 2-(hydroxypropyl)-1,4,7,10-tetraazacyklododekan-1,4,7-trioctová kyselina). Dalším používaným gadolinitým komplexem je komplex s DTPA (DTPA = kyselina diethylenetriaminpentaoctová) a od něj odvozenými ligandy (Obr. 5). Tento komplex je nazýván gadopentetová kyselina, synonymem je Gd-DTPA, a je využíván ve formě roztoku soli s megluminem (Magnevist®).⁷ Od používání těchto komplexů se však v současnosti ustupuje, jelikož jsou méně stabilní než výše zmíněné komplexy s makrocyclickými ligandy.



Obr. 4: Strukturní vzorce ligandů odvozených od cyklenu : DOTA (vlevo), derivát DO3A (uprostřed) a HP-DO3A (vpravo)



Obr. 5: Strukturní vzorec ligandu DTPA (2, 2', 2'', 2''', 2''''-(ethan-1,2-dinitrilo)pentaoctová kyselina)

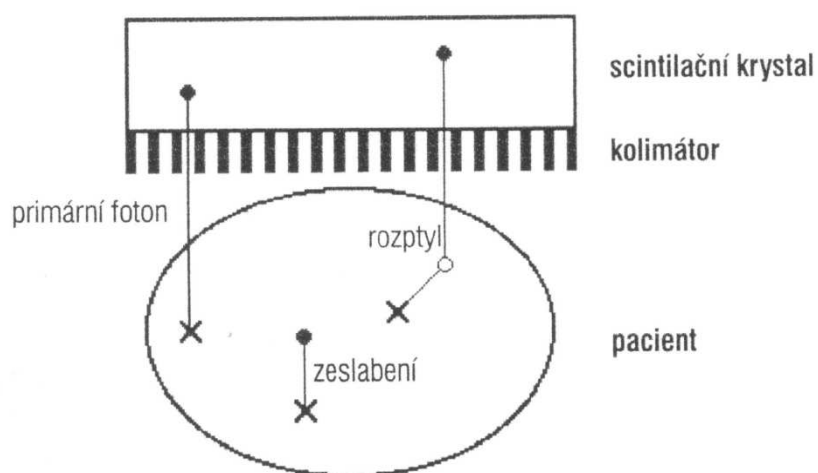
Méně často jsou jako T_1 kontrastní látky zkoumány komplexy Fe^{3+} a Mn^{2+} . Mn^{2+} má ve vysokospinových komplexech pět nepárových elektronů, pomalý elektronový relaxační čas a rychlou výměnu koordinované vody, což z něj činí možnou alternativu ke kontrastním látkám založených na komplexech s Gd^{3+} . Vysoké koncentrace volných Mn^{2+} iontů vedou k poškození nervového systému, jelikož Mn^{2+} se hromadí v mozku.¹⁰ Komplexy tedy musí být také kineticky inertní a termodynamicky stabilní. Je pouze jeden Mn^{2+} komplex, který se využívá v klinické praxi ($[\text{Mn}(\text{dpdp})]^{4-}$, Teslascan®, $\text{dpdp}^{6-} = \text{N,N'}$ -dipyridoxylethylenediamin-N,N'-diacetát-5,5'-bis(fosfát)).^{11,12}

1.1.2 T_2 kontrastní látky

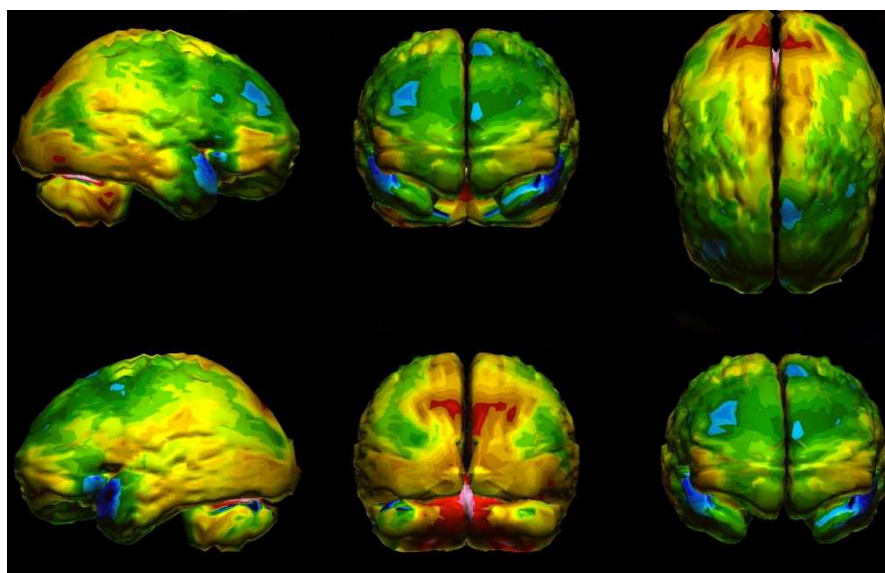
V případě T_2 kontrastních látek, se jedná ve většině případů o nanočástice oxidů železa, pokryté např. vrstvou dextranu či polyethylenglykolu. Tyto částice jsou označovány podle jejich velikosti: SPIO (Super paramagnetic iron oxides, průměr >50 nm až k několika mikronům) nebo USPIO (Ultra-Small Super Paramagnetic Iro Oxides, průměr <50 nm).⁵ Tyto částice se chovají jako pohyblivé magnety a značně snižují T_2 relaxační čas protonů H_2O v jejich okolí.

2. Jednofotonová emisní výpočetní tomografie (SPECT)

Jednofotonová emisní výpočetní tomografie (z angl. Single-Photon Emission Computed Tomography – SPECT nebo méně používané SPET) je diagnostická zobrazovací metoda využívaná v oblasti nukleární medicíny. Při této metodě se registruje záření γ emitované radioaktivní látkou nacházející se v těle. Jednofotonová se metoda jmenuje proto, že se při ní využívají radionuklidy emitující jeden foton při jejich jaderné přeměně (Obr. 6).^{13,14} Základem aparatury pro vyšetření je detektor (tzv. detekční hlava).¹⁴ Lze použít i jednoho detektoru, v současnosti jsou však využívány přístroje se dvěma detektory. Ty se otáčejí během vyšetření po malých úhlech (krokově) nebo plynule kolem pacienta. Získané obrazy z jednotlivých projekcí se ukládají do paměti počítače. Většinou se zaznamenává 120 projekcí na rotaci 360° .¹⁴ Z celé série obrazů se v počítači rekonstruuje trojrozměrný obraz distribuce radioaktivní látky ve vyšetřované oblasti, z něhož lze snadno získat obraz tomografické vrstvy (řezu) tkání (Obr. 7).¹⁴



Obr. 6: Schematické zobrazení tvorby obrazu pomocí detekce fotonů u vyšetření SPECT ¹⁵



Obr. 7: Zhotovený trojrozměrný obraz nerovnoměrné distribuce radioaktivní látky při vyšetření mozku pomocí SPECT (modrá-místo největší koncentrace kontrastní látky) ¹⁶

2.1 Kontrastní látky pro SPECT

Jako kontrastní látky pro SPECT jsou užívány radiofarmaka vyzařující γ záření – nejčastěji se jedná o sloučeniny ^{99m}Tc , ^{201}Tl , dále pak ^{123}I či ^{111}In .

Kation $^{201}\text{Tl}^+$ má biologické vlastnosti podobné draselnému kationtu. Jedná se o cyklotronový produkt, který se rozpadá elektronovým záchytem za emise charakteristického

RTG záření o energii kolem 80 keV.¹⁷ Thallium vstupuje aktivně do nádorových buněk pomocí sodno-draselné pumpy. Akumulace v nádorových buňkách je nespecifická a podílejí se na ní i jiné faktory jako např. krevní průtok, histologický typ tumoru, zvýšená permeabilita buněčné membrány atd.¹⁷ V souvislosti se SPECT vyšetřením se používá ve formě ²⁰¹Tl-chloridu. Nevýhodou této kontrastní látky je především velká radiační zátěž, proto je doporučeno aplikovat pouze 110 MBq ²⁰¹Tl-chloridu. Další nevýhodou je možnost vzniku artefaktů ve vzniklém obraze, v souvislosti s absorpcí emitovaného záření v těle.

^{99m}Tc je využíváno především ve formě ^{99m}Tc-MIBI (methoxyisobutylisonitril) a ^{99m}Tc-TF (tetrofosmin).¹⁷ Jedná se o látky lipofilní povahy. MIBI je akumulován převážně v mitochondriích viabilních buněk a většina TF se akumuluje v cytosolové frakci buněk. Tyto látky slouží k zobrazování karcinomu štítné žlázy, při zobrazování karcinomu prsu, mnohočetných myelomů atd.

¹²³I je využíván ve formě sloučeniny ¹²³In- MIBG (metajodbenzylguanidin).¹⁷ MIBG je strukturně podobný noradrenalinu. Akumuluje se v katecholaminových sekrečních granulech pomocí ATPáza-dependentní protonové pumpy. Rozdíl mezi noradrenalinem a MIBG spočívá v tom, že se MIBG neváže na postsynaptických adrenergních receptorech.¹⁷

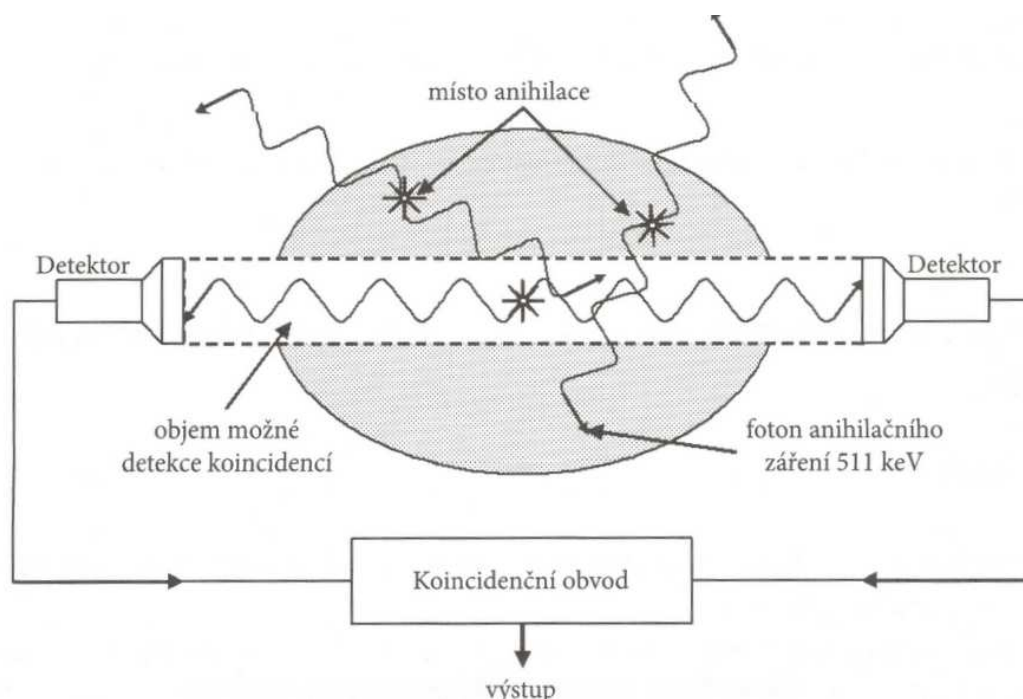
¹¹¹In je využíván ve formě ¹¹¹In – pentetreotidu.¹⁷ Ve SPECT může zvýšit senzitivitu detekce zejména v případě abdominálně lokalizovaných nádorů. Fyziologicky se tato látka koncentruje v normální tkáni štítné žlázy, ledvinách, močovém měchýři, slezině a v menším stupni i ve střevech. V přítomnosti primárního nádoru nebo metastáz jsou na obrazu patrná ložiska zvýšené koncentrace radiofarmaka.¹⁷ Tato sloučenina je využívána k indikaci neuroendokrinních nádorů, lymfomů, karcinomu prsu a melanomů.

3. Pozitronová emisní tomografie (PET)

Pozitronová emisní tomografie (z angl. Positron Emission Tomography – PET) je založena na koincidenční detekci anihilačních fotonů s energií 511 keV.¹⁸ Při přeměně β^+ zářiče dojde k emisi pozitronu, kladně nabitě antičástice elektronu. Dolet pozitronu ve tkáni je velmi krátký, jedná se zhruba o 3-4 mm. Po ztrátě kinetické energie zaniká pozitron interakcí s elektronem v blízkém okolí. Tento proces je označován jako anihilace pozitronu a

zaniknou při něm obě částice – pozitron i elektron. Z místa zániku odlétnou opačnými směry současně dva fotony s energií 511 keV a v přímém úhlu 180° . Fotony vytvořené při anihilaci se nazývají anihilační fotony nebo anihilační záření.¹⁸ Oba anihilační fotony od sebe letí po přímce rychlostí světla, a pokud dopadnou do protilehlých detektorů, pak k tomu dojde prakticky současně.¹⁸ Lze tedy předpokládat, že se poloha místa emise nachází na spojnici dvou bodů na detektorech, ve kterých byly fotony detekovány.¹⁸ Detektor je složen z velkého množství scintilačních krystalů, které jsou vzhledem k vysoké energii anihilačních fotonů složeny z látek s větší hustotou a vyšším atomovým číslem. Těmito látkami jsou např. bismut-germinát (BGO), fluorid barnatý a sloučeniny jako jsou lutecium orthosilikát (LSO) a gadolinium orthosilikát (GSO).¹⁵

PET tedy detekuje pouze ty impulsy, které na dvojici protilehlých detektorů přiletěly současně. Získá se tedy nejen informace o poloze dopadu fotonů v detektoru, ale i informace o směru jejich přiletu. Z údajů získaných detekcí velkého počtu dvojic anihilačních fotonů se pomocí počítače matematicky rekonstruuje trojrozměrný obraz distribuce radiofarmaka (Obr. 8).¹⁸

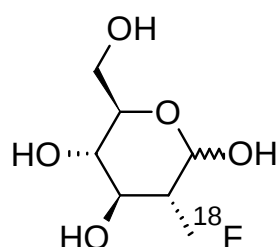


Obr. 8: Schéma lokalizace místa pozitronu s elektronem pomocí dvou scintilačních detektorů zapojených v koincidenci¹⁸

3.1 Kontrastní látky pro PET

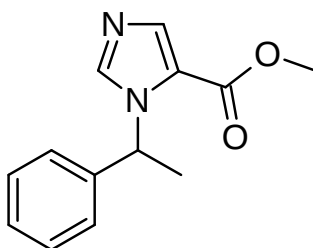
V klinické praxi je využívána látka FDG – ^{18}F fludeoxyglukosa neboli 2- ^{18}F fluor-2-deoxy-D-glukosa (Obr. 9), která je podávána nitrožilně. V buňkách pak probíhá fosforylace na FDG-6-fosfát. V buňce následně dochází k hromadění detekovatelného radionuklidu.¹⁵

V roce 2012 byl zaveden florbetapir F18 pro PET mozku sloužící ke zjištění hustoty β -amyloidních neuritických plaků u pacientů trpících Alzheimerovou chorobou a podobnými kognitivními poruchami.¹⁹

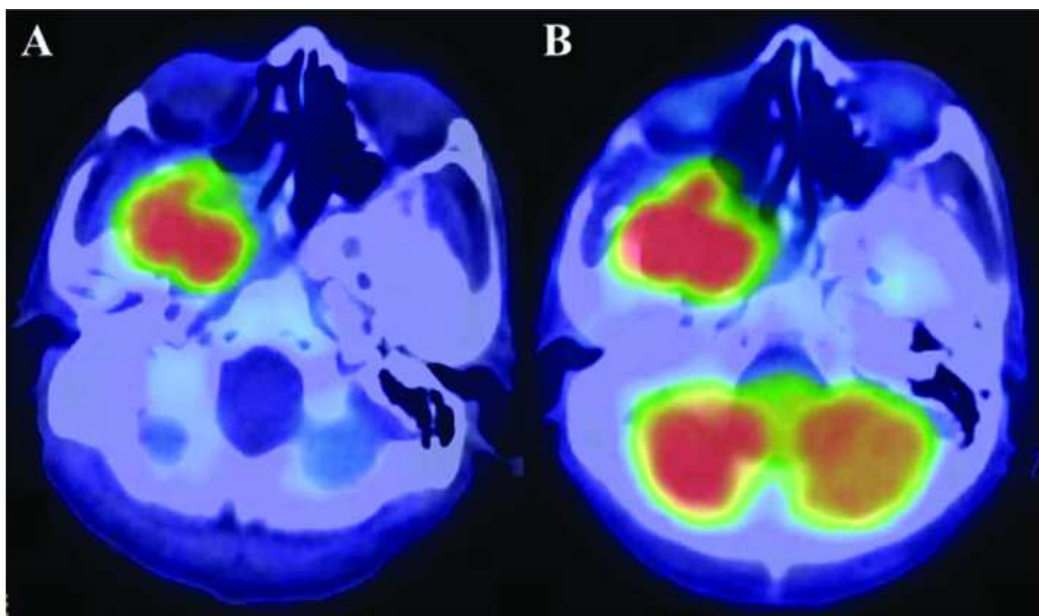


Obr. 9: Strukturní vzorec fludeoxyglukosy (^{18}F)

Dalším využívaným nuklidem je ^{11}C , který se používá ve formě (^{11}C)Metomidátu (Obr. 10). Metomidát (methyl 1-(1-phenylethyl)-1H-imidazol-5-karboxylát) je velmi účinný inhibitor 11β -hydroxylázy, což je klíčový enzym v biosyntéze kortizolu a aldosterolu v adrenálním kortexu.²⁰



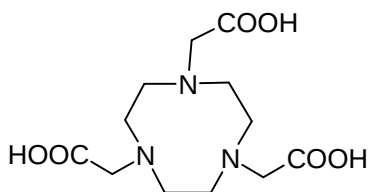
Obr. 10: Strukturní vzorec Metomidátu (methyl 1-(1-phenylethyl)-1H-imidazol-5-karboxylát)



Obr. 10: Obrázek získaný při vyšetření mozku pomocí PET vyšetření s využitím kontrastních látek se značeným ^{11}C (vlevo) a ^{18}F (vpravo) nádory zviditelňuje červená barva²¹

V omezené míře je využíváno i radiofarmak značených ^{18}F jako jsou např. ^{18}F – methylcholin, ^{18}F - DOPA (DOPA = 3,4-hydroxyfenylalanin), ^{18}F -NaF.¹⁷

Nuklidy těžších, většinou kovových prvků, jsou snadněji připravitelné, ale doprava na cílené místo je složitější a většina je rovněž ve formě volných iontů toxická. Kov je proto nutné pomocí vhodného ligandu zakomplexovat, tak aby kinetická a termodynamická stabilita komplexu vylučovala následné uvolnění kovu v těle. Z tohoto hlediska má velmi slibné vlastnosti nuklid ^{68}Ga . Pro jeho aplikaci však musí být vázán vhodným ligandem, se kterým musí vytvářet stabilní komplexní sloučeninu již v oblasti kyselého pH. Z tohoto hlediska největší význam pro komplexaci trojmocného gallia má DOTA a ligandy typu NOTA (NOTA = 2, 2', 2''-(1, 4, 7-triazononan-1, 4, 7-triyl)trioctová kyselina) (Obr. 11).^{22,23}



Obr. 11: Strukturní vzorec ligandu NOTA (2, 2', 2''-(1, 4, 7-triazononan-1, 4, 7-triyl)trioctová kyselina)

4 Optické zobrazování (OI)

Optické zobrazování (z angl. Optical Imaging – OI) je neinvazivní metoda, která slouží k zobrazování vnitřních struktur, podobně jako při užití rentgenového záření. OI využívá záření o vlnových délkách od ultrafialové po blízkou infračervenou oblast a speciálních vlastností fotonů k získání detailního obrazu orgánů, tkání, ale i velmi malých struktur jako jsou buňky či molekuly. Výhodou je větší bezpečnost, citlivost a rychlost oproti metodám využívajících ionizujícího záření. Mezi optické zobrazovací metody řadíme: fluorescenční zobrazování, bioluminiscenční zobrazování a techniky využívající optického zobrazování jako jsou: fluorescenční zobrazování v blízké infračervené oblasti, difúzní optickou tomografii, difúzní optickou spektroskopií, fluorescenční mikroskopií atd.

4.1 Fluorescenční zobrazování (FI)

Fluorescenci zařazujeme mezi fotoluminiscenční záření. Je vyvolána účinkem dopadajícího záření nebo účinkem dopadajících částic. Absorpcí fotonu s určitou energií se elektron dostane ze stavu základního do stavu výše excitovaného. V průběhu mezimolekulových srážek se nezářivými přechody dostane molekula velmi rychle až do nejnižšího excitovaného stavu (tj. dosáhne nejnižší vibrační hladiny vyššího elektronového stavu).²⁴ Pokud nedojde při těchto přechodech ke změně spinu elektronu, může se vrátit, za současného vyzáření fotonu o energii $h\nu$, do stavu základního. Tento zářivý přechod je nazýván fluorescence. Doba, během které dojde k pohlcení a vyzáření energie, odpovídá 10^{-5} až 10^{-10} s.

Fluorescenční zobrazování (z angl. Fluorescence Imaging - FI) využívá endogenních či exogenních molekul nebo materiálů, které po aktivaci emitují světelné záření. K aktivaci se užívá externího zdroje světla, jako je např. laser. Při aktivaci dochází k excitaci cílové molekuly, která následně fluoreskuje. Tato metoda je používána k lokalizaci a měření exprese genů, proteinů a dalších patofyziologických procesů.

4.2 Bioluminiscenční zobrazování (BLI)

Bioluminiscenční zobrazování (z angl. Bioluminescent Imaging –BLI) využívá přírodní emitující protein či enzym, jako je například luciferasa, který katalyzuje biochemickou reakci, při níž dochází k emisi světla. Je užito zpravodajského genu, který luciferasu produkuje. Po zavedení zpravodajského genu je krátce před zobrazením podán substrát (luciferin), který je v buňkách s luciferasou konvertován na látku produkující světlo. Oproti fluorescenčnímu zobrazování není třeba externího zdroje světla, emitované záření je však slabší a detekce vyžaduje užití chlazených CCD kamer. Mezi nevýhodu lze zařadit i nutnost zavedení zpravodajského genu.

Zobrazování se užívá ke stopování pohybu určitých buněk nebo také k lokaci specifických reakcí probíhajících uvnitř těla. Tato metoda je aplikována hlavně v oblasti genové exprese.

4.3 Techniky využívající optického zobrazování ²⁵

4.3.1 Fluorescenční zobrazování v blízké infračervené oblasti (Near-Infrared Fluorescence Imaging)

Fluorescenční zobrazování v blízké infračervené oblasti (Near-Infrared Fluorescence Imaging) zahrnuje zobrazování fluorescence fotonů v blízké infračervené oblasti – tj. oblasti vlnových délek 600–900 nm. Toto záření je využíváno především z důvodů lepší penetrace, tj. je více propustné ve tkáních.

Pomocí zdroje světla o nižší vlnové délce dochází k excitaci flouorchromu. Excitace flouorchromu je následně zaznamenávána přístrojem pomocí CCD kamery.

4.3.2 Difúzní optická tomografie (DOT)

Difúzní optická tomografie (z angl. Diffuse Optical Tomography –DOT) je založena na difúzi světla, které proniká tkání, a pomocí několika projekcí jsou následně získány tomografické obrazy. Využívá řadu laserů a detektorů, které jsou umístěny kolem pozorovaného objektu. Tato technika může poskytnout kvantitativní informace o absorpci světla, rozptylu a příjmu světla fluorescenčními kontrastními látkami.

4.3.3 Difúzní optická spektroskopie (DOS)

Difúzní optická spektroskopie (z ang. Diffuse Optical Spectroscopy – DOS) kombinuje multifrekvenční vlnu s modulovanou intenzitou a kontinuální vlnu v blízké infračervené oblasti ke stanovení absorpce tkáně a rozptylových spekter v oblasti 650–1000 nm.

4.3.4 Fluorescenční mikroskopie (FM)

Fluorescenční mikroskopie (z angl. Fluorescence Microscopy – FM) je považována za rapidně rozvíjející se techniku ideální pro zobrazování a analýzu biologických vzorků při vysokém rozlišení. Rozlišení se pohybuje okolo 20–100 nm, lze díky němu tedy zobrazit nejen buňky samotné, ale i vykreslit buněčné komponenty.²⁶ Jako důležité podtypy této techniky lze zmínit Confocal Fluorescence Microscopy (CFM) a Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy (FLIM).

Confocal Fluorescence Microscopy (CFM) je optická zobrazovací technika využívající luminiscence k vytvoření obrazu. Využívané mikroskopy mohou disponovat řadou různých světelných excitujících zdrojů, které pomocí vhodné optiky, dopraví monochromatické světlo o dané vlnové délce ke vzorku. Jako zdroj světla může být využito světla v blízké infračervené oblasti (NIR) či tzv. multi-photon excitation sources.

Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy (FLIM) je pokročilejší forma fluorescenční mikroskopie. Vytvoření obrazu je založeno spíše na emisním čase než na intenzitě signálu.²⁶ Je zde přítomen pulsující zdroj světla. Výhodou této techniky je poskytnutí kvantitativních informací, zajištění měření dynamických událostí a schopnost monitorovat buněčné komponenty s dobrým prostorovým rozlišením.²⁷

4.4 Kontrastní látky pro OI

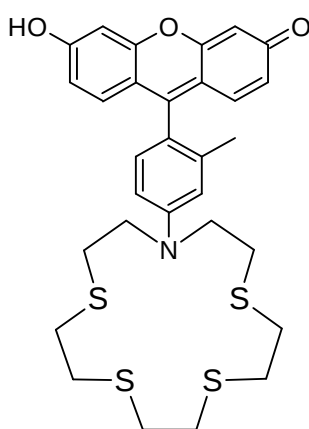
Jako kontrastní látky pro OI slouží makrocyclické komplexní sloučeniny. Tyto sloučeniny lze rozdělit na dvě podskupiny. Jedná se o makrocyclické sloučeniny, které jsou značeny fluoreskujícím barvivem nebo o komplexy, kde u samotného kovového iontu může dojít k luminiscenci.²⁸

4.4.1 Makrocykly značené fluoroforem

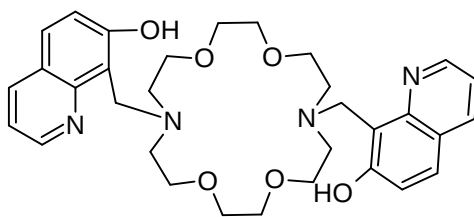
U této skupiny lze uvést dva případy formování makrocyklu značeného fluoroforem. V prvním případě mohou být makrocykly kombinovány s fluorescenční organickou jednotkou

a po selektivním navázání specifického kovového iontu dochází k vytvoření fluorescenčního senzoru. Častěji se však jedná o případ, kdy navázání kovového iontu způsobí potlačení (inhibici) procesu přenosu elektronu.²⁸

Byly získány komplexy rtuti s ligandem založeným na NS₄ crown eteru, který byl konjugován s optickým barvivem (Obr. 12).²⁹ Tyto sloučeniny mohou být využity k detekci rtuti v buňkách. Jako další makrocyclické sloučeniny rtuti, které lze využít jako senzor, lze uvést sloučeninu diaza-18-crown-6 ligandu s připojenými hydroxychinoliny (Obr. 13).³⁰ Rtuť zde vystupuje jako Hg(II) a po jejím navázání ve vodném roztoku dochází k fluorescenci.



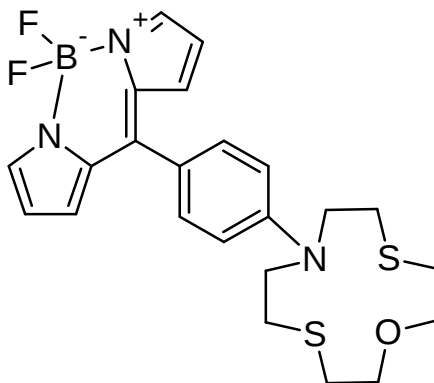
Obr. 12: Strukturní vzorec ligandu odvozeného od NS₄ crown etheru s 6-hydroxy-9-(2-methylfenyl)-3H-xanten-3-onem jako pendantním ramenem



Obr. 13: Strukturní vzorec makrocyclického ligandu odvozeném od diaza-18-crown-6 s připojenými hydroxychinolinovými skupinami.

Při buněčných testech je využíváno flouroforu BODIPY (bor dipyrromethenová jednotka) díky jeho ideální vlnové délce excitace a emise.²⁸ Na BODIPY lze připojit oxa-aza kryptand, což umožní navázání draslíku a výsledné komplexní sloučeniny lze využít v biologických systémech.³¹ Tuto komplexní sloučeninu lze následně navázat na dextran a výsledný systém lze využít jako senzor pro extracelulární koncentraci draslíku, při níž je fluorescenční odezva velmi jasná a detekovatelná komerčními přístroji.

Jako alternativu k výše zmíněnému systému pro detekci draslíku lze zmínit systém, kde jsou na BODIPY kovalentně připojeny makrocykly s různými donorovými atomy (Obr. 14).³² K fluorescenci dochází po interakci s Fe(III).

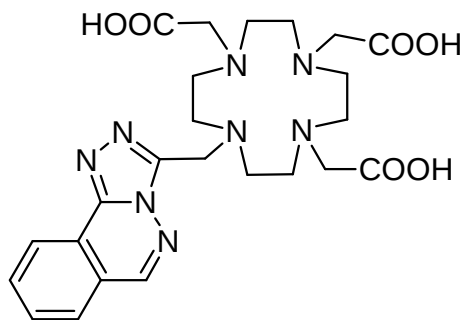


Obr. 14: Strukturní vzorec ligandu odvozeného od BODIPY s připojeným makrocyklem s různými donorovými atomy

4.4.2 Luminiscenční sondy

Luminiscenční sondy využívají komplexů s ionty lanthanoidů. Lanthanoidové ionty mají ostré emisní píky, ale jsou špatnými chromofory.²⁸ Obecně jsou excitovány užitím citlivého chromoforu (většinou je užito pyridinových skupin nebo jiných aromatických aminů), který přenesse energii na kovové centrum.³³ Lanthanoidové ionty jsou značně zhašeny přítomností OH či NH skupin, tudíž přítomnost koordinované molekuly vody je nežádoucí.

Pro „zabalení“ kovového centra jsou vhodné makrocyclické cheláty a využity mohou být rovněž i aza donory pro začlenění chromoforu. Ve vývoji těchto chelátů bylo učiněno značných pokroků. Vyvinuty byly deriváty DOTA, asymetricky N-funkcionalizované deriváty cyklenu s různými pendantními rameny aj. Výběr chromoforu je závislý na vhodném spárování energetických hladin lanthanoidových iontů.²⁸ Jako příklad lze uvést spárování DO3A makrocyclicku s chromoforem odvozeným od hydralazinu (Obr. 15). Tento ligand se ukázal citlivý na Nd(III), Yb(III), Eu(III) a Er(III).³⁴



Obr. 15: Strukturní vzorec ligandu odvozeného od DO3A s [1, 2, 4]triazolo[3, 4a]ftalazinovým ramenem

Pro biologické sondy je důležité otestovat luminiscenční vlastnosti i ve vodných roztocích, aby se ukázalo, že zhášení je minimalizováno. Z tohoto hlediska lze užít nonadentátních ligandů, kde není žádné volné místo pro koordinaci molekuly vody. Jako příklad lze uvést nonadentátní ligandy odvozené od cyklu s tetraazatrifenylovými pendantními rameny.³⁵

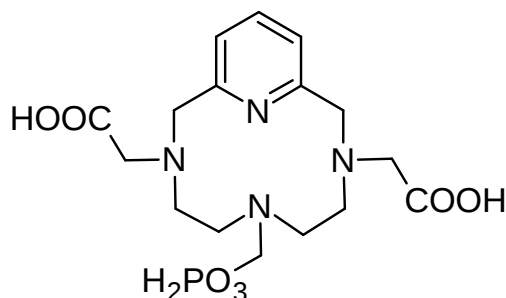
5 12/14členné pyridinové makrocyclické ligandy využitelné v diagnostických metodách

5.1 Využití v MRI

Mimo již výše zmíněných ligandů, které jsou momentálně využívány v klinické praxi, byla a je pozornost věnována studiu a syntéze mnoha nových makrocyclických ligandů odvozených od cyklických polyaza a/nebo polyoxo ligandů s různými pendantními skupinami.³⁶

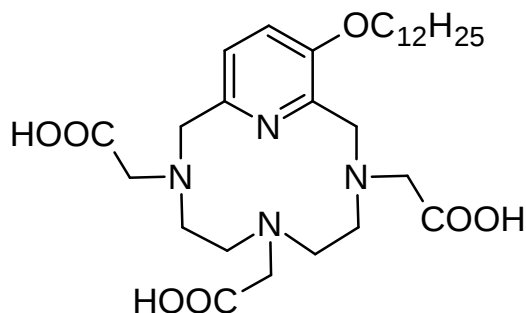
Jedním z ligandů patřící do této skupiny je ligand PCP2A (3, 9-bis(karboxymethyl)-6-dihydroxyfosforylmethyl-3, 6, 9, 15-tetraazabicyklo[9.3.1]pentadeca-1(15), 11, 13-trien, Obr. 16). Makrocyclus obsahuje pyridin a nese dvě acetátové a jedno methylfosfonátové pendantní rameno. Spolu s Gd(III) tvoří komplex vykazující vlastnosti, díky kterým se jeví jako slibná kontrastní látka pro MRI.³⁷ Tato komplexní sloučenina má velmi vysokou konstantu stability ($\log K_{\text{GdPCP2A}} = 23,4$), tudíž by nemělo dojít k *in vivo* rozpadu na volné ionty Gd^{3+} , které jsou toxické a samotné molekuly makrocyclického ligandu. Další výhodou této sloučeniny je fakt, že relaxivita je 2krát větší než hodnoty uváděné pro kontrastní látky užívané v klinické praxi. Tato vysoká relaxivita je výsledkem přítomnosti dvou molekul vody ve vnitřní

koordinační sféře a výrazně přispívá i voda navázaná přes vodíkové vazby na fosfonátovou skupinu.³⁷ U koordinované vody dochází k rychlé výměně. Sloučenina GdPCP2A může být využita k vizualizaci menších nádorových lézí a k ověření úspěšnosti transfekce při genové terapii.^{38,39}



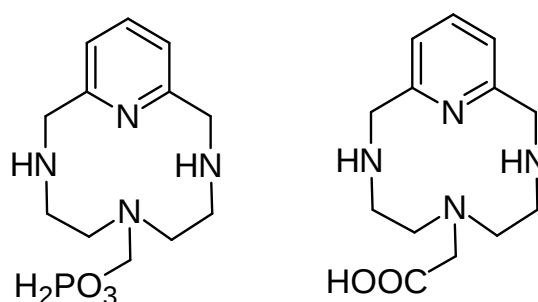
Obr. 16: Strukturní vzorec ligandu PCP2A (3, 9-bis(karboxymethyl)-6-dihydroxyfosforylmethyl-3, 6, 9, 15-tetraazabicyklo[9.3.1]pentadeka-1(15), 11, 13-trienu)

Pro MRI zobrazování krevního řečiště a jater byla navržena a syntetizována řada komplexních sloučenin odvozena od GdDTPA (gadolinový komplex diethylenetriamin pentaacetátové kyseliny), především se jedná o estery a aminy s dlouhým řetězcem. Ve vodném prostředí jsou tyto sloučeniny schopny tvořit supramolekulární systémy jako micely, nebo v přítomnosti surfaktantů a fosfolipidů, smíšené micely a liposomy.⁴⁰ Formace těchto systémů zvyšuje účinnost kontrastní látky díky zvýšení rotačního korelačního času Gd komplexu.⁴⁰ Zvýšení T_1 -relaxačního času tohoto oktaedrátního komplexu je však částečně potlačeno dlouhým residenčním časem koordinované molekuly vody. Heptadentátní komplex GdPCTA-[12] (PCTA-[12] = 12-dodecyloxy-3,6,9,15-tetraazabicyklo[9.3.1]pentadeka-1(15), 11, 13-trien-3, 6, 9-trioctová kyselina) (Obr. 17), na který jsou koordinovány dvě molekuly vody ve vnitřní sféře, má tento čas podstatně nižší. Tento komplex je rovněž stabilní.⁴¹



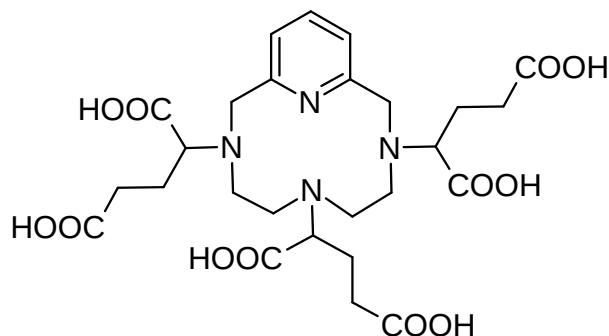
Obr. 17: Strukturní vzorec lidandu PCTA-[12](12-dodecyloxy-3, 6, 9, 15-tetraazabicyklo[9.3.1]pentadeka-1(15), 11, 13-trien-3, 6, 9-trioctová kyselina)

Mimo 12/14-členné pyridinové makrocycly, ve kterých vystupoval ion gadolinia, lze jako alternativní možnost využít iontu manganu. Jak již bylo zmíněno výše Mn^{2+} má ve vysokospinových komplexech pět nepárových elektronů a pomalý elektronový relaxační čas. U těchto komplexů rovněž dochází k rychlé výměně koordinované vody. Pro MRI byly navrženy komplexy s ligandy PCMA-[12] ([3, 6, 9, 15-tetraazabicyklo[9.3.1]pentadeka-1(15), 11, 13-trien-6-methyl]octová kyselina), který obsahuje jedno acetátové rameno, a s PCMP-[12] obsahující jedno rameno fosfonátové([3, 6, 9, 15-tetraazabicyklo[9.3.1]pentadeka-1(15), 11, 13-trien-6-methyl]fosfonová kyselina) (Obr. 18). Ve vodném prostředí tyto pentadentátní ligandy umožňují koordinaci jedné molekuly vody. Velikost kavity má vliv na termodynamickou stabilitu. Na zvýšení stability komplexu má vliv i přítomnost pyridinu, který způsobuje rigidnější strukturu.



Obr. 18: Strukturní vzorce ligandů pro PCMP-[12] ([3, 6, 9, 15-tetraazabicyklo[9.3.1]pentadeka-1(15), 11, 13-trien-6-methyl]fosfonová kyselina) (vlevo) a PCMA-[12] ([3, 6, 9, 15-tetraazabicyklo[9.3.1]pentadeka-1(15), 11, 13-trien-6-methyl]octová kyselina) (vpravo)

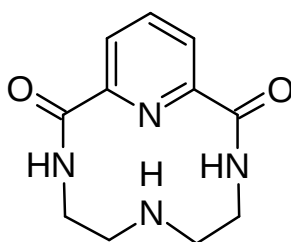
Mimo komplexy s Gd^{3+} a Mn^{2+} byla jako potenciální kontrastní látka pro MRI syntetizována sloučenina s ligandem PCTGA (z angl. pyridine containing tetraazamacrocyclic triGlutaric acid) obsahující N-glutarylové ramena a Eu^{3+} (Obr. 19).⁴² PCTGA se v komplexu s Eu^{3+} chová jako heptadentátní. Na kovové centrum se mohou do vnitřní sféry koordinovat dvě molekuly vody.



Obr. 19: Strukturní vzorec ligandu PCTGA (3, 6, 9, 15-tetraazabicyclo[9.3.1]pentadeka-1(15), 11, 13-trien-3, 6, 9-triglutarové kyseliny)

5.2 Využití ve SPECT

Mimo potenciální užití v MRI byly syntetizovány i deriváty 12/14-členných makrocyclů, které lze využít při SPECT. Konkrétně se jedná o ligand TBPĐ (3,6,9,15-tetraazabicyclo[9.3.1]pentadeka-1(15),11,13-trien-2,10-dion) (Obr. 20).⁴³ Tento ligand byl syntetizován, charakterizován a radioaktivně označen ^{99m}Tc za vzniku ^{99m}Tc -TBPĐ.⁴³ Komplex ^{99m}Tc -TBPĐ byl připraven ve vysoké čistotě, vysokém výtěžku v radioaktivním značení (účinnost značení kolem 98 %) a dobrou stabilitou *in vitro*. Biodistribuční studie této komplexní sloučeniny ukázaly, že maximální absorpce ^{99m}Tc -TBPĐ je v játrech.⁴³ Cytotoxické studie prokázaly, že látka není závažně antiproliferačně aktivní. Tato sloučenina se jeví jako slibný kandidát pro neinvazivní diagnózu nádorů.



Obr. 20: Strukturní vzorec ligandu TBPĐ (3,6,9,15-tetraazabicyclo[9.3.1]pentadeka-1(15),11,13-trien-2,10-dionu)

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

SEZNAM POUŽITÝCH CHEMIKáliÍ

Pro syntézu byly použity komerčně dostupné chemikálie a rozpouštědla, které jsou uvedené v tabulce níže. Látky byly užity bez dalších úprav či čištění.

Látka 2,6-bis(chlormethyl)pyridin ve formě hydrochloridu byla připravena dle postupu uvedeného v literatuře.⁴⁴

Tabulka 1 : Seznam použitých chemikálií

Chemikálie	Výrobce/Dodavatel
Acetonitril p.a.	VWR
Amoniak, vodný roztok, 25 % p.a.	Lach-Ner
Bis-(2-aminoethyl)amin 98%	Sigma-Aldrich
Bis-(3-aminopropyl)amin 99%	Sigma-Aldrich
Diethylether p.a.	Lach-Ner
Dichlormethan p.a.	Sigma-Aldrich
Hydroxid sodný p.a.	Penta
Chloroform p.a	Sigma-Aldrich
Isopropylalkohol p.a.	Penta
Kyselina bromoctová 98%	Sigma-Aldrich
Kyselina chlorovodíková, vodný roztok, 36 % p.a.	Penta
Kyselina sírová 98% p.a.	Lach-Ner
Methanol p.a.	Penta
<i>p</i> -Toluensulfonyl chlorid, TsCl, 99%	Acros
Síran sodný, bezvodý (Na ₂ SO ₄), p.a.	Penta
Uhličitan draselný, bezvodý, p.a.	Penta

METODY CHARAKTERIZACE

Spektroskopie nukleární magnetické rezonance

Získaná ^1H a ^{13}C NMR spektra byla změřena na 400 MHz spektrometru od firmy Varian. Změřená spektra byla referencována na signály reziduálního nedeuterovaného rozpouštědla (CDCl_3 : δ ^1H 7,27 ppm; ^{13}C 77,00 ppm; DMSO-d_6 : δ ^1H 2,50 ppm; ^{13}C 39,51 ppm). Multiplicita signálů byla následně označena symboly: s –singlet, d – dublet, t – triplet, qr – kvartet, q – kvintet, bs- broad singlet, m – multiplet. Spektra byla měřena při laboratorní teplotě, v případě, že není uvedeno jinak. Přiřazení signálů atomům vodíků či uhlíků pro ligandy L_1 , L_1Ac_3 , L_2 a L_2Ac_3 bylo provedeno na základě změření 2D-NMR spekter ^1H – ^{13}C gs-HMQC a ^1H – ^{13}C gs-HMBS (gs – gradient selected; HMQC - heteronuclear multiple quantum coherence; HMBS - heteronuclear multiple bond coherence).

Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektra byla změřena na přístroji LCQ Fleet Ion Mass Trap MS od firmy Thermo Scientific s 3D iontovou pastí a ionizací elektrosprejem v kladném a záporném módu.

Chromatografie na tenké vrstvě

Chromatografie na tenké vrstvě byla prováděna na hliníkových destičkách potažených vrstvou silikagelu impregnovaného fluorescenčním barvivem (ALUGRAM® SIL G/UV₂₅₄). Pro detekci bylo použito zhášení fluorescence pod UV lampou ($\lambda = 254 \text{ nm}$, 4 W).

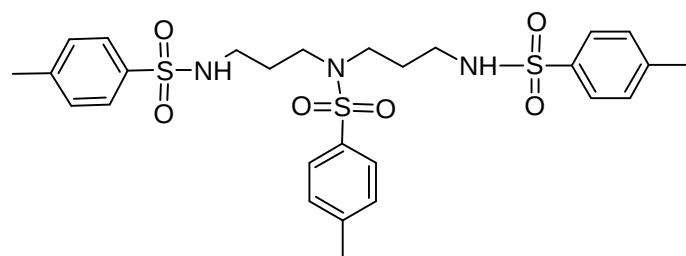
6. Syntetická příprava 12- a 14členného pyridinového makrocyklu se třemi acetátovými rameny

6.1 Syntéza Ts₃pr (N¹,N³-ditosyl-N¹-(3-(tosylamino)propyl)propan-1,3-diaminu)

Způsob syntézy vychází z modifikovaného postupu uvedeného v literatuře.⁴⁵

K roztoku 26,7 g (0,2 mol) bis-(3-aminopropyl)aminu a 24,0 g (0,6 mol) NaOH ve 200 ml destilované vody byl po kapkách přidáván roztok 114,4 g (0,6 mol) *p*-toluensulfonyl chloridu (tosyl chlorid, TsCl) v 300 ml Et₂O po dobu 1 hodiny. Reakční směs byla následně míchána hodinu při pokojové teplotě. Reakční směs byla následně ochlazená v ledu. Po oddělení etherové vrstvy následovala extrakce vodné vrstvy CH₂Cl₂ (2 x 100ml) a vysušení spojených organických fází bezvodým Na₂SO₄, které byly odpařeny na rotační vakuové odparce (RVO). Bylo získáno 118,4 g (98,0 %) produktu ve formě bezbarvého oleje.

Charakterizace:



¹H NMR(400 MHz, CDCl₃): δ 7,68 (d, ³J_{HH} = 8,2 Hz, 4H, CH_{Ts}); 7,57 (d, ³J_{HH} = 8,2 Hz, 2H, CH_{Ts}); 7,23 (d, ³J_{HH} = 8,2 Hz, 6H, CH_{Ts}); 3,02 (t, ³J_{HH} = 6,3 Hz, 4H, N-CH₂); 2,87 (t, ³J_{HH} = 6,3 Hz, 4H, N-CH₂);

1,64 (q, ³J_{HH} = 6,3 Hz, 4H, CH₂-CH₂-CH₂); 2,35 (s, 13H, CH₃)

6.2 Syntéza Ts₃en (N¹,N²-ditosyl-N¹-(2-(tosylamino)ethyl)ethan-1,2-diaminu) (první postup)

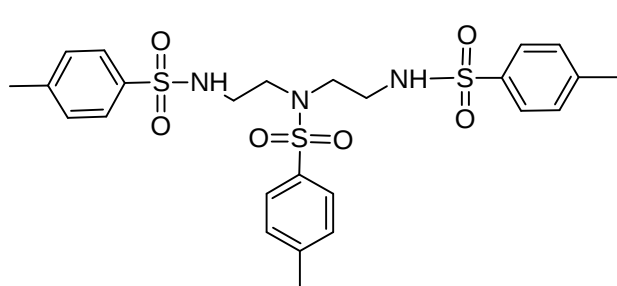
Způsob syntézy Ts₃en je obdobný jako způsob přípravy tritosylovaného bis(3-aminopropyl)aminu a vychází z modifikovaného postupu uvedeného v literatuře.⁴⁵

Z 21,0 g (0,2 mol) bis(2-aminoethyl)aminu bylo získáno 80,9 g produktu ve formě pevné bílé látky (70,3 %).

6.3 Syntéza Ts₃en (druhý postup)

Druhý postup syntézy Ts₃en odpovídá postupu, uvedeném v literatuře.⁴⁶ Vycházelo se z 20,65 g (0,2 mol) bis(2-aminoethyl)aminu a bylo získáno 165 g surového produktu. Ze surového produktu bylo dále odebráno 40 g. Navážka 40 g byla rekrystalizována z chloroformu a methanolu. Rekrystalizací bylo získáno 14,6 g (52,9 %) produktu ve formě bílé krystalické látky.

Charakterizace:



¹H NMR (400 MHz, DMSO- *d*₆): δ 7,62 (d, ³*J*_{HH} = 8,2 Hz, 4H, CH_{Ts}); 7,50 (d, ³*J*_{HH} = 8,2 Hz, 2H, CH_{Ts}); 7,31-7,40 (m, 6H, CH_{Ts}); 2,93-3,00 (m, 4H, N-CH₂); 2,70-2,83 (m, 4H, N-CH₂), 2,36 (m, 9H, CH₃)

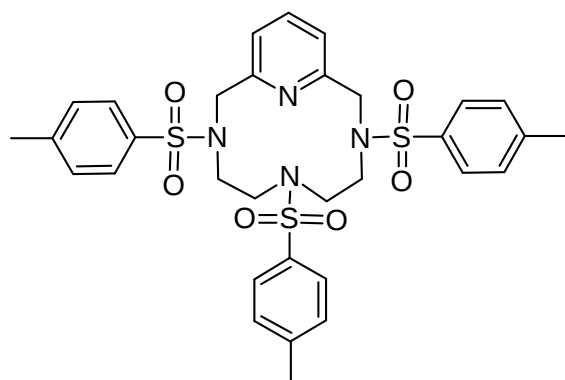
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7,72 (m, 4H, CH_{Ts}); 7,59 (d, ³*J*_{HH} = 8,2 Hz, 2H, CH_{Ts}); 7,29 (m, 6H, CH_{Ts}); 3,04–3,22 (m, 8H, N-CH₂), 2,40 (s, 9H, CH₃)

6.4 Syntéza makrocyklu L₁Ts₃

Syntéza makrocyklu L₁Ts₃ (3,6,9,15-tetraaza-3,6,9-*p*-toluensulfonylbicyclo[9.3.1]pentadeca-1(15),11,13-trien-11-yl) byla provedena na základě modifikovaného postupu uvedeného v literatuře.³⁷

K suspenzi 1,6 g (7,7 mmol) 2,6-bis(chlormethyl)pyridinu hydrochloridu, 6,0 g K₂CO₃ v 50 ml acetonitrilu bylo postupně přidáno 4,4 g (7,7 mol) Ts₃en ve formě pevné látky. Reakční směs byla následně refluxována po dobu 2 dní. K₂CO₃ byl následně zfiltrován přes fritu S4 a promyt 50 ml acetonitrilu. Filtrát byl následně odpařen na RVO. Bylo získáno 3,3 g (113 %) L₁Ts₃ ve formě světle oranžové olejovité látky.

Charakterizace:



^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 7,73 (t, $^3J_{\text{HH}} = 7,6$ Hz, 1H, CH_{py}); 7,69 (d, $^3J_{\text{HH}} = 7,8$ Hz, 4H, CH_{Ts}); 7,62 (d, $^3J_{\text{HH}} = 7,8$ Hz, 2H, CH_{Ts}); 7,40 (m, 4H, CH_{Ts}); 7,31 (d, $^3J_{\text{HH}} = 7,8$ Hz, 2H, CH_{Ts}); 7,24 (d, $^3J_{\text{HH}} = 7,6$ Hz, 2H, CH_{py}); 4,63 (s, 4H, $\text{N-CH}_2\text{-Py}$); 3,29 (t, $^3J_{\text{HH}} = 7,6$ Hz, 4H, N-CH_2); 2,73 (bs, 4H, N-CH_2); 2,41 (s, 6H, CH_3); 2,38 (s, 3H, CH_3)

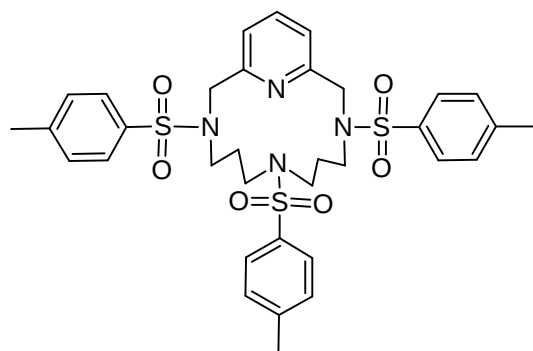
MS m/z (+): 707,24 [$\text{L}_1\text{Ts}_3 + \text{K}$] $^+$

6.5 Syntéza makrocyklu L_2Ts_3

Syntéza makrocyklu L_2Ts_3 (3,7,11,17-tetraaza-3,7,11-*p*-toluensulfonylbicyclo[11.3.1]heptadeca-1(17),13,15-trienu) byla provedena na základě modifikovaného postupu uvedeného v literatuře.³⁷

2,5 g (0,011 mol) 2,6-bis(chlormethyl)pyridinu hydrochloridu, 7 g K_2CO_3 a 7,9 g (0,011 mol) tritosylovaného bis(3-aminopropyl)aminu bylo suspendováno ve 150 ml acetonitrilu. Reakční směs byla následně refluxována po dobu 2 dní. K_2CO_3 byl následně odfiltrován přes fritu S4 a filtrát byl odpařen na RVO. Bylo získáno 9,9 g (125 %) produktu ve formě oranžové olejovité látky.

Charakterizace:



^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 7,71 (m, 1H, CH_{py}); 7,70 (d, $^3J_{\text{HH}} = 7,8$ Hz, 4H, CH_{Ts}); 7,55 (d, $^3J_{\text{HH}} = 7,8$ Hz, 4H, CH_{Ts}); 7,31 (d, $^3J_{\text{HH}} = 7,8$ Hz, 4H, CH_{Ts}); 7,25 (m, 2H, CH_{py}); 4,26 (s, 4H, $\text{N-CH}_2\text{-Py}$); 3,20 (t, $^3J_{\text{HH}} = 7,2$ Hz, 4H, N-CH_2); 2,76 (t, $^3J_{\text{HH}} = 7,2$ Hz, 4H, N-CH_2); 2,42 (s, 6H, CH_3); 2,38 (s, 3H, CH_3); 1,53 (q, $^3J_{\text{HH}} = 7,2$ Hz, 4H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$)

MS m/z (+): 719,30 [$\text{L}_2\text{Ts}_3 + \text{Na}$] $^+$

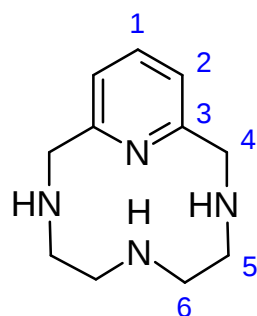
6.6 Syntéza makrocyklu L₁ a L₂ – deprotekce tosylových skupin

Příprava L₁ (3,6,9,15-tetraazabicyklo[9.3.1]pentadeka-1(15),11,13-trienu) a L₂ (3,7,11,17-tetraazabicyklo[11.3.1]heptadeka-1(17),13,15-trienu) byla provedena na základě modifikovaného postupu uvedeného v literatuře.⁴⁷

3,27 g (0,005 mol) L₁TS₃ nebo 9,9 g (0,014 mol) L₂TS₃ bylo rozpuštěno v 15 ml koncentrované H₂SO₄ a po dobu 40 minut byla reakční směs udržována při teplotě 180 °C. Po ochlazení na pokojovou teplotu a následném zchlazení v ledu bylo k reakční směsi přidáno 80 ml Et₂O, což vedlo v obou případech ke vzniku tmavě hnědé sraženiny, která byla následně dekantována 80 ml Et₂O. Sraženina byla následně rozpuštěna v minimálním množství vody. Pomocí vodného roztoku NaOH bylo upraveno pH obou roztoků na hodnotu větší než 12, dále byly roztoky extrahovány 3x 50 ml chloroformu a spojené organické frakce byly vysušeny bezvodým síranem sodným. Rozpouštědlo bylo následně v obou případech odpařeno na RVO.

Produkt L₁ byl získán ve formě bezbarvé olejovité látky, která stáním vykristalizovala v pevný bílý produkt. Bylo získáno 0,49 g L₁ (47,1 %).

Charakterizace:



¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7,48 (t, ³J_{HH} = 7,6 Hz, 1H, H1); 6,97(d, ³J_{HH}=7,4 Hz, 2H, H2); 3,92 (s, 4H, H4); 2,60-2,68 (m, 4H, 5H); 2,20 (bs, 4H, H6)

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ 7,59 (t, ³J_{HH} = 7,6 Hz, 1H, H1); 7,05 (d, ³J_{HH}=7,4 Hz, 3H, H2); 3,83 (s, 4H, H4), 2,64-2,74 (m, 4H, H5); 2,32-2,41 (m, 4H, H6)

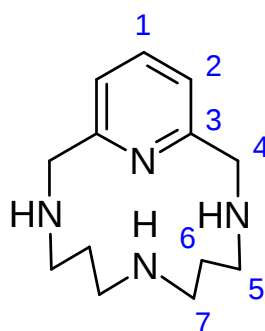
¹³C NMR (100,5 MHz, DMSO-d₆): δ 160,9 (2C, C3); 137,2 (1C, C1); 119,9 (2C, C2); 52,8 (2C, C4); 47,6 (2C, C6); 47,4 (2C, C5)

MS m/z (+) : 229,22 [L₁ + Na]⁺

Produkt L_2 byl získán ve formě bezbarvé olejovité látky, která následně vykristalizovala v pevný bílý produkt, jehož hmotnost činila 3,58 g (108,5 %).

2,78 g L_2 bylo dále přečištěno chromatograficky na sloupci silikagelu, mobilní fází pro eluci byla zvolena soustava methanol : 25% vodný roztok amoniaku (10 : 1). Byly získány dvě frakce, jejichž hmotnost po odpaření činila 1,60 g (57,5 %) a 0,45 g (16,2 %), obě po odpaření na RVO měly formu bezbarvé olejovité látky, která následně vykristalizovala v bílou pevnou látku. Na základě kontrolních ^1H NMR měření obsahovaly obě frakce pouze požadovaný produkt. Celková hmotnost produktu tedy činila 2,05 g (73,7 %).

Charakterizace:



^1H NMR (400 MHz, DMSO-d_6): δ 7,58 (t, $^3J_{\text{HH}} = 7,6$ Hz, 1H, H1); 7,05 (d, $^3J_{\text{HH}} = 7,6$ Hz, 2H, H2); 3,68 (s, 4H, H4); 3,08 (bs, 3H, NH); 2,53 (t, $^3J_{\text{HH}} = 5,3$ Hz, 4H, H7); 2,42 (t, $^3J_{\text{HH}} = 5,3$ Hz, 4H, H5); 1,51 (q, $^3J_{\text{HH}} = 5,3$ Hz, 4H, H6)

^{13}C NMR (100,5 MHz, DMSO-d_6): δ 159,9 (2C, C3); 137,0 (1C, C1); 120,9 (2C, C2); 54,1 (2C, C4); 47,6 (2C, C7); 46,4 (2C, C5); 29,0 (2C, C6)

MS m/z (+): 257,24 [$L_2 + \text{Na}$] $^+$

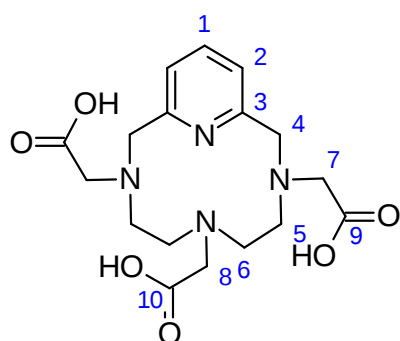
6.7 Syntéza $L_1\text{Ac}_3$ a $L_2\text{Ac}_3$

Syntéza makrocyclických ligandů $L_1\text{Ac}_3$ (3, 6, 9-Tris(karboxymethyl)- 3, 6, 9, 15-tetraazabicyklo[9.3.1]pentadeca-1(15),11,13-trien) a $L_2\text{Ac}_3$ (3, 7, 11-Tris(karboxymethyl)-3,7,11,17-tetraazabicyklo[11.3.1]heptadeca-1(17),13,15-trien) byla provedena podle modifikovaného postupu uvedeného v literatuře.⁴⁸

0,60 g (0,003 mol) ligandu L_1 bylo rozpuštěno v malém množství vody. Následně byl k roztoku přikapáván roztok 1,50 g (0,011 mol) kyseliny bromoctové v malém množství vody. pH reakční směsi bylo pomocí 1M-roztoku NaOH udržováno v alkalické oblasti, $\text{pH} > 12$. Reakční směs byla poté míchána přes noc při 50 °C. Následně byla reakční směs odpařena na RVO. Bylo získáno 2,09 g nažloutlé pevné látky obsahující produkt $L_1\text{Ac}_3$ (potvrzeno

kontrolním měřením MS spektra). Pevná látka obsahující produkt L_1Ac_3 byla následně přečištěna chromatograficky na iontoměničích. Nejprve byla provedena chromatografie na silném katexu Dowex 50 v H^+ cyklu, kdy byl produkt vymyt z kolony pomocí vodného roztoku HCl (voda : 36% aq. HCl – 4 : 1). Po odpaření HCl-frakce na RVO bylo získáno 1,10 g světle žlutého produktu obsahujícího L_1Ac_3 (potvrzeno kontrolním měřením MS spektra). Následně byla provedena chromatografie na anexu Dowex 1 x 8 v OH^- cyklu, kdy byl produkt vymyt z kolony pomocí vodného roztoku HCl (voda : 36% aq. HCl – 4 : 1). Bylo získáno 0,50 g (43,9 %) produktu L_1Ac_3 ve formě bílé pevné látky.

Charakterizace:



1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ 8,00 (t, $^3J_{HH} = 7,8$ Hz, 1H, H1); 7,52 (d, $^3J_{HH} = 7,8$ Hz, 2H, H2); 4,82 (bs, 4H, H4); 4,28 (bs, 4H, H7); 3,83 (bs, 2H, H8); 3,63 (bs, 4H, H5); 3,13 (bs, 4H, H6)

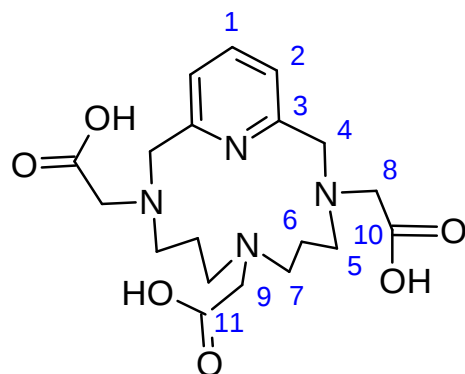
^{13}C NMR (100,5 MHz, DMSO- d_6): δ 171,4 (1C, C10); 168,3 (2C, C9); 151,6 (2C, C3); 139,6 (1C, C1); 122,8 (2C, C2); 58,3 (2C, C4); 56,3 (2C, C7); 52,8 (2C, C5), 52,0 (1C, C8); 49,9 (2C, C6)

MS m/z (+): 381,21 [$L_1 + H$] $^+$; 403,21 [$L_1 + Na$] $^+$

MS m/z (–): 423,22 [$L_1 + 2Na$] $^-$

Ligand L_2Ac_3 byl připraven obdobným způsobem, jako byl připraven L_1Ac_3 , jak je uvedeno výše. Bylo získáno 0,70 g (28 %) produktu L_2Ac_3 ve formě lehce nažloutlé pevné látky.

Charakterizace:



^1H NMR (400 MHz, DMSO-d_6 , 60 °C): δ 7,951 (t, $^3J_{\text{HH}} = 7,6$ Hz, 1H, H1); 7,57 (d, $^3J_{\text{HH}} = 7,6$ Hz, 2H, H2); 4,55 (s, 4H, H4); 3,99 (s, 4H, H8); 3,78 (s, 2H, H9); 3,34 (t, $^3J_{\text{HH}} = 6,8$ Hz, 4H, H5); 3,21 (t, $^3J_{\text{HH}} = 6,8$ Hz, 4H, H7); 1,51 (q, $^3J_{\text{HH}} = 6,8$ Hz, 4H, H6)

^{13}C NMR (100,5 MHz, DMSO-d_6 , 60 °C): δ 167,7 (3C, C10+C11); 151,5 (2C, C3); 139,4 (1C, C1); 125,7 (2C, C2); 57,3 (2C, C4); 54,7 (3C, C8+C9); 52,0 (2C, C5); 51,0 (2C, C7), 20,0 (2C, C6)

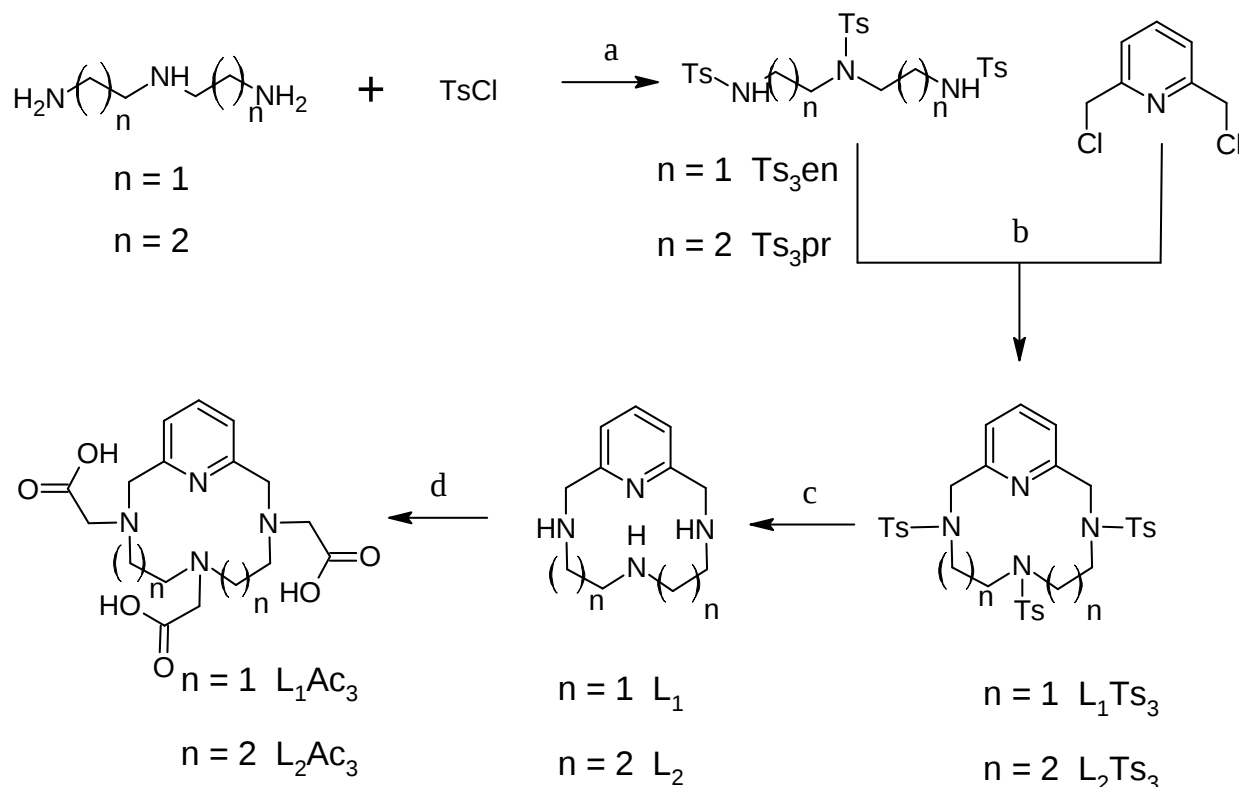
MS m/z (+): 409,21 [$\text{L}_1 + \text{H}$] $^+$

MS m/z (–): 407,23 [$\text{L}_1 - \text{H}$] $^-$

DISKUZE

Syntéza 12členného makrocyclického ligandu L_1 (3,6,9,15-tetraazabicyklo[9.3.1]pentadeca-1(15),11,13-trienu) a 14členného ligandu L_2 (3,7,11,17-tetraazabicyklo[11.3.1]heptadeca-1(17),13,15-trienu) byla provedena podle Richman-Atkinsonovy syntézy využívající tosylové chránící skupiny (kroky a–c v Obr. 21) dle mírně modifikovaných publikovaných postupů uvedených v literatuře.^{45, 46, 47, 48, 37}

Na oba ligandy byly následnou reakcí s kyselinou bromoctovou navázána acetátová pendantní ramena za vzniku ligandu L_1Ac_3 (3, 6, 9-Tris(karboxymethyl)- 3,6,9,15-tetraazabicyklo[9.3.1]pentadeca-1(15),11,13-trien) a L_2Ac_3 (3,7,11-Tris(karboxymethyl)- 3,7,11,17-tetraazabicyklo[11.3.1]heptadeca-1(17),13,15-trien), jak je ukázáno v kroku d na Obr. 21.



Obr. 21: Schéma syntézy 12členného markocyclického ligandu ($n=1$) se třemi acetátovými pendantními rameny L_1Ac_3 a 14členného markocyclického ligandu ($n=2$) se třemi acetátovými pendantními rameny L_2Ac_3 : (a) Et_2O , aq. $NaOH$; (b) $MeCN$, K_2CO_3 , reflux 12h; (c) H_2SO_4 , 180 °C, 40 min; (d) $BrCH_2COOH$, aq. $NaOH$, 50 °C. Ts = *p*-toluensulfonyl

7 Syntéza Ts₃pr

Ts₃pr byl připraven reakcí bis(3-aminopropyl)aminu s tosyl chloridem v přítomnosti báze.⁴⁵ Časová náročnost se pohybovala v rozmezí 1-2 dnů. Podle literatury měla vzniknout bílá pevná látka, v tomto případě byl ale produkt získán ve formě bezbarvého oleje. Proto byla vyzkoušena jeho rekrystalizace ze směsi rozpouštědel dichlormethan/diethylether, která ovšem vedla opět k bezbarvému oleji.

8 Syntéza Ts₃en (první postup)

Ts₃en byl připraven reakcí bis(2-aminoethyl)aminu s tosyl chloridem v přítomnosti báze.⁴⁵ Po ukončení reakce a získání produktu ve formě bílého prášku bylo z ¹H NMR spekter zjištěno, že produkt je směsí mono-, di- a tri- tosylovaného aminu. Proto byl tedy produkt znovu rozpuštěn ve 200 ml vody a 200 ml CH₂Cl₂. K reakční směsi bylo následně přidáno 38,1 g (0,2 mol) TsCl a reakční směs byla po dobu 2 dní míchána. Vyloučená bílá krystalická látka byla zfiltrována přes fritu S4 a vysušena na vzduchu. Z výsledků TLC a naměřených ¹H NMR spekter bylo zjištěno, že získaná látka je směsí produktu (tritotsylovaný amin), ale i meziproduktů (ditotsylovaný amin) a zbytků rozpouštědel, a tudíž získaná látka dále nebyla použita.

9 Syntéza Ts₃en (druhý postup)

Syntéza vycházela z postupu uvedeného v literatuře.⁴⁶ Oproti výše uvedenému prvnímu postupu, kdy byl TsCl rozpuštěn v diethyleteru a následně byl tento roztok přikapáván k reakční směsi (bis(2-aminopropyl)amin, NaOH, voda), při druhém postupu byly TsCl a NaOH postupně přidávány k roztoku bis(2-aminoethyl)aminu rozpuštěném ve vodě ve formě pevných látek, a následovně byl do reakční směsi přidán i diethyleter. Během přidávání NaOH byla teplota reakční směsi udržována pod 40 °C. Přidávání TsCl byla teplota udržována pod 20 °C. Během přidávání však docházelo k vysrážení produktu a meziproduktu a látky tedy zcela nezreagovaly. Po odsátí na fritě S4 a promytí diethyletherem, byla látka vysušena na vzduchu a provedena TLC chromatografie, která potvrdila přítomnost

nezreagovaného výchozího TsCl a meziproduktů (různě tosylované aminy). Byla tedy provedena rekrytalizace, kdy v literatuře byl použit chloroform,⁴⁶ ale v tomto případě, z důvodu lepší rozpustnosti, byla použita směs chloroformu a methanolu (2:1). K rekrytalizaci bylo odebráno 40 g surového produktu a bylo získáno 14,6 g (52,9 %) čistého produktu ve formě bílé krystalické látky. Úspěšnost krystalizace byla potvrzena změřením ¹H NMR spektra, které se shodovalo se spektrem uvedeném v literatuře.⁴⁶

10 Syntéza makrocyklu L₁Ts₃ a L₂Ts₃

Syntéza L₁Ts₃ a L₂Ts₃ byla provedena pomocí cyklizační reakce 2,6-bis(chlormethyl)pyridinu hydrochloridu s Ts₃en nebo Ts₃pr. V obou případech bylo využito stejného postupu, tj. reakce obou výchozích látek ve vroucím acetonitrilu v přítomnosti bezvodého K₂CO₃ jako báze.³⁷ Oproti postupu uvedeném v literatuře,³⁷ kdy byl reflux prováděn po dobu 16 h v dusíkové atmosféře, byl v tomto případě reflux prováděn po dobu 2 dní bez užití dusíkové atmosféry. Po ukončení reakce bylo provedeno měření MS spekter, které potvrdilo vznik kýžených produktů. Vzhledem k vysokým výtěžkům 113 % a 125 % a na základě změřených ¹H NMR spekter a MS spekter bylo zjištěno, že získané látky mimo produktu L₁Ts₃ nebo L₂Ts₃ obsahují i vedlejší produkty, jako jsou dvakrát větší 24- a 28členné cykly nebo necyklické pravděpodobně polymerní produkty. Vysoké výtěžky v porovnání s literaturou (75%) byly způsobeny přítomností nedoodpařených zbytků rozpouštědel a solí. Vzhledem k dostatečné čistotě látek (¹H NMR) a vzhledem ke zkušenostem s malými výtěžky při čištění těchto látek pomocí sloupcové chromatografie, bylo v obou případech přistoupeno k dalšímu reakčnímu kroku – deprotekcí v kyselině sírové, bez jejich čištění.

11 Syntéza makrocyklu L₁ a L₂ – deprotekcí tosylových skupin

Syntéza makrocyklu L₁ a L₂ byla provedena deprotekcí tosylových skupin. Deprotekce tosylových skupin může být provedena několika způsoby – hydrolýzou HBr v přítomnosti fenolu,⁴⁹ redukcí sodíkovým amalgamem v methanolu nebo lithium aluminium hydridem^{50,51} nebo zahřátím v koncentrované kyselině sírové.⁴⁷

Mimo ochlazení na pokojovou teplotu, bylo zvoleno i následné ochlazení v ledu, aby bylo vysrážení produktu ve formě hydrogensulfátu rychlejší a efektivnější. Sraženina byla následně rozpuštěna v malém množství vody a obzičtěna. Následovala extrakce pomocí 3x50 ml chloroformu a vysušení pomocí bezvodého síranu sodného. Spojené organické frakce byly odpařeny na RVO.

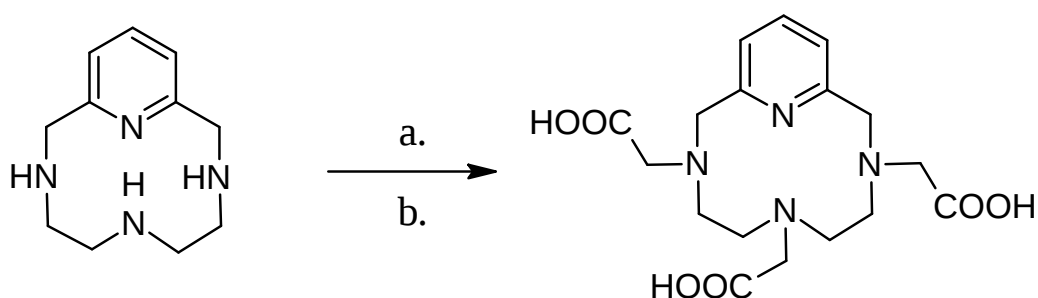
Po získání produktů byly změřeny ^1H NMR a MS spektra. Vyhodnocením spekter bylo zjištěno, že L_1 je v dostatečné čistotě, aby mohlo být přistoupeno k dalšímu reakčnímu kroku.

Látka získaná po deprotekcí L_2Ts_3 obsahovala mimo L_2 i nečistoty a dvakrát větší 24-členný cyklus, z tohoto důvodu byla dále čištěna pomocí chromatografie na sloupci silikagelu. První zvolenou mobilní fází pro eluci čistého L_2 byla soustava isopropylalkohol-amoniak (aq. 25 %)-voda (7:3:2). Byly izolovány tři frakce, z nichž dvě obsahovaly zbytky silikagelu a nečistoty a jejich celková hmotnost po odpaření rozpouštědla na RVO činila 0,34 g (9,5 %). Hmotnost frakce obsahující produkt L_2 po odpaření na RVO činila 2,78 g (77,6 %) a byla získána ve formě bezbarvé olejovité látky, která následně vykristalizovala v pevnou bílou látku. Z ^1H NMR spekter bylo však zjištěno, že nečistoty nebyly zcela odstraněny, a z tohoto důvodu se přistoupi k opětovnému přečištění pomocí sloupcové chromatografie avšak s jinou mobilní fází. Druhou mobilní fází byla soustava amoniak, 25 % vodný roztok – voda (10:1). Byly získány dvě frakce, které byly následně odpařeny na RVO a charakterizovány pomocí ^1H NMR spekter. Bylo zjištěno, že obě frakce obsahují pouze čistý produkt L_2 a tudíž bylo přistoupeno k dalšímu reakčnímu kroku – zavádění acetátových ramen.

12 Syntéza L_1Ac_3 a L_2Ac_3

Dříve publikované postupy zavádění acetátových ramen vychází z reakce aminů (aminových cyklů) s různými deriváty kyseliny octové jako alkylačním činidlem. Pro modifikaci 12/14členných azamakrocyclů byl tímto derivátem např. ethylester kyseliny bromoctové (výtěžek 65 %)⁵² nebo kyselina chloroctová (výtěžek 60 %).³⁷ Pro syntézu v této práci bylo využito reakce s kyselinou bromoctovou, za udržování $\text{pH} > 12$ pomocí přidávání 1M NaOH, která byla využita pro přípravu jiných derivátů obsahující acetátová pendantní ramena jako např. BP2A (BP2A = 2,11-Diaza[3.3](2,6)pyridinophan-N,N"-dioctová kyselina), která je strukturně podobná s L_1Ac_3 .⁴⁸

Po ukončení reakce a odpaření na RVO, byly L_1Ac_3 a L_2Ac_3 chromatograficky čištěny pomocí iontoměničů. Nejprve byla provedena chromatografie na silném katexu Dowex 50 v H^+ cyklu, produkt byl následně z kolony vymýván vodným roztokem amoniaku (25% vodný roztok amoniaku : voda – 1 : 5), produkty se ale nepodařilo z kolony vymýt, proto byl pro vymytí produktů zvolen roztok HCl (voda : 36% vodný roztok HCl – 4 : 1), kdy bylo vymytí z kolony úspěšné. Tímto postupem byl odstraněn zbytek nezreagované kyseliny bromoctové (případně jiných vedlejších produktů, které nemohou tvořit kationty). Následně bylo provedeno čištění na anexu Dowex 1 x 8 v OH^- cyklu, kdy byl produkt z kolony vymyt vodným roztokem HCl (voda : 36% vodný roztok HCl – 4 : 1). Procentuální výtěžek pro L_1Ac_3 činil 49,3 % a pro L_2Ac_3 28 %. Během chromatografie došlo k ztrátám části produktu. L_1Ac_3 a L_2Ac_3 byly získány ve formě bílých pevných látek. Porovnáním s výtěžky, kterých bylo dosaženo podle dříve publikovaných postupů uvedených v literatuře (Obr. 22),^{37, 48} kdy dosažené výtěžky odpovídaly ~60 %, se zavádění acetátových pendantních ramen pomocí kyseliny bromoctové jeví jako méně efektivní. Optimalizací reakčních podmínek (rychlost přidávání reaktantů, přesnější kontrola pH) a postupů chromatografického čištění by jistě bylo možné výtěžky reakcí zvýšit minimálně na úroveň popsanou v literatuře, bohužel z časových důvodů nebyla tato optimalizace provedena.



Obr. 22: Schéma syntézy 12členného makrocyclického ligandu se třemi acetátovými rameny L_1Ac_3 s využitím: (a) 1. AcOEtBr, Na_2CO_3 , 2. H_3O^+ , H_2S ; (b) $ClCH_2COOH$, OH^-

ZÁVĚR

V rámci práce byla provedena literární rešerše, ve které byly popsány vybrané typy diagnostických zobrazovacích metod, jejich fyzikálně-chemická podstata včetně současně užívaných kontrastních látek. Dále byly popsány deriváty 12/14členných makrocyclických ligandů, které našly uplatnění či mají potenciálního užití v koordinačních sloučeninách jako kontrastní látky pro popsané diagnostické metody, především pro MRI.

Byla provedena resyntéza 12členného a 14členného makrocyclického ligandu, kdy bylo využito Richman-Atkinsonovy syntézy, která využívá chránící *p*-toluensulfonylové (tosylové) skupiny. Oba cykly byly získány s dobrými výtěžky a ve vysoké čistotě.

Dále byly připraveny deriváty těchto ligandů nesoucí tři acetátová pendantní ramena, kdy bylo využito alkylační reakce s kyselinou bromoctovou v bazickém prostředí. Příprava touto cestou se vzhledem k menším výtěžkům ukázala jako méně efektivní oproti postupům dříve publikovaným v literatuře. Připravené ligandy byly detailně charakterizovány pomocí ^1H NMR, ^{13}C NMR, 2D NMR a MS spekter.

Připravené makrocyclické ligandy a jejich deriváty mohou sloužit ke komplexaci různých kovových iontů (především lanthanoidových iontů) a takové komplexy, v závislosti na konkrétním zakomplexovaném kovovém iontu, mohou nalézt všestranné využití v podobě kontrastních látek v různých zobrazovacích metodách používaných v medicíně.

Seznam použité literatury

- ¹ J. Nekula, M. Heřman, J. Vomáčka, M. Köcher, Radiologie, *Univerzita Palackého v Olomouci*, **2003**, 22–23
- ² MRI: A guided tour, [online], **2015**, dostupné z : https://www.researchgate.net/figure/299512554_fig2_Figure-9-a-MRI-Scanner-Cutaway-b-MRI-Scanner-Gradient-Magnets-MRI-A-Guided-Tour
- ³ J. Vomáčka, J. Nekula, J. Kozák, Zobrazovací metody pro radiologické asistenty, *Univerzita Palackého v Olomouci*, **2012**, 48 -49
- ⁴ MRI guidelines in MS Updated, [online], 2015, dostupné z: <http://www.medscape.com/viewarticle/845593>
- ⁵ A. Merbach, É.Tóth, L. Helm, The chemistry of Contrast Agents in Medical Magnetic Resonance Imaging, *Wiley*, **2013**, 18-20
- ⁶ M.T. Vlaadingerbroek, J.A. den Boer, Magnetic Resonance Imaging. Theory and Practice, *Springer*, **1996**
- ⁷ F. Hampl, S. Rádl, J. Paleček, Farmakochemie, *VŠCHT Praha*, **2015**, 562-566
- ⁸ J. Kotek, I. Lukeš, *Chem. listy*, **2010**, 1163-1174
- ⁹ J. Vomáčka, J. Nekula, J. Kozák, Zobrazovací metody pro radiologické asistenty, *Univerzita Palackého v Olomouci*, **2012**, 70-71
- ¹⁰ B. Gallez, C. Baudelet, M. Geurts, *Magn. Reson. Imag.* **1998**, 16, 1211-1215
- ¹¹ S. M. Rocklage, W. P. Cacheris, S. C. Quay, F. E. Hahn, K. N. Raymond, *Inorg. Chem.* **1989**, 28, 477-485
- ¹² B. Drahoš, J. Kotek, I. Císařová, P. Hermann, L. Helm, I. Lukeš, É. Tóth, *Inorg. Chem.* **2011**, 50, 12785-12801
- ¹³ K. Kupka, J. Kubinyi, M. Šámal, Nukleární medicína, *P3K*, **2007**, 32-36
- ¹⁴ P. Koranda et.al., Nukleární medicína, *Univerzita Palackého v Olomouci*, **2014**, 29-30
- ¹⁵ K. Kupka, J. Kubinyi, M. Šámal, Nukleární medicína, *P3K*, **2015**, 50-61
- ¹⁶ NeuroSPECT Imaging, [online], dostupné z: <http://neurospectofflorida.com/>
- ¹⁷ M. Mysliveček, P. Koranda, V. Hušák, Nukleární medicína v diagnostice nádorů a zánětů, *Univerzita Palackého v Olomouci*, **2002**, 13-27
- ¹⁸ P. Koranda et.al., Nukleární medicína, *Univerzita Palackého v Olomouci*, **2014**, 30-31
- ¹⁹ F. Hampl, S. Rádl, J. Paleček, Farmakochemie, *VŠCHT Praha*, **2015**, 567-570

-
- ²⁰ J. Hennings, ,Ö. Lindhe, M. Bergström, B. Langstrom, A. Sundin, P. Hellman, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2006**,91(4), 1410-1414
- ²¹ A. Tempaku et. al., *Oncology Letters* 2014, 8, 1509-1512
- ²² W. A. Breeman, M. de Jong,E. de Blois , B. F. Bernard, M. Konijnenberg , E. P. Krenning,*Eur. J. Nucl.Med. Mol. Imag.* **2005**, 32, 478
- ²³ J. P. André, H. R. Mäcke, M. Zehnder, L. Macko, K. G. Akyel ,*Chem. Commun.* **1998**, 1301
- ²⁴ J. Vacík, *Obecná chemie, Státní pedagogické nakladatelství Praha*, **1986**, 125
- ²⁵ What is Optical Imaging?, [online], 2016, dostupné z: <http://snmmi.files.cms-plus.com/FileDownloads/Patients/FactSheets/What%20is%20Optical%20imaging%202016.pdf>
- ²⁶ J.A. Amaroso, J. A. S. Pope , *Chem. Soc. Rev.* **2015**, 44, 4723-4742
- ²⁷ ed. A. de Bettencourt-Dias, *Luminescence of Lanthanide ions in Coordination Compounds and Nanomaterials*, Wiley, **2014**
- ²⁸ R. E. Mewis, S. J. Archibald, *Coord. Chem. Rev.* **2010**, 254, 1686-1712
- ²⁹ S. Yoon, E.W.Miller, Q. He, P.H. Do, C.J. Chang, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **2007**, 46 6658.
- ³⁰ M.L. Ho, K.Y. Chen, L.C. Wu, J.Y. Shen, G.H. Lee, M.J. Ko, C.C. Wang, J.F. Lee, P.T. Chou, *Chem. Commun.* **2008**, 2438.
- ³¹ W. Namkung, P. Padmawar, A.D. Mills, A.S. Verkman, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 7794
- ³² J.L. Bricks, A. Kovalchuk, C. Trieflinger, M. Nofz, M. Buschel, A.I. Tolmachev, J. Daub, K. Rurack, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 13522.
- ³³ A. Thibon, V.C. Pierre, *Anal. Bioanal. Chem.* **2009**, 394, 107
- ³⁴ B.P. Burton-Pye, S.L. Heath, S. Faulkner, *Dalton Trans.* **2005**, 146.
- ³⁵ R.A. Poole, G. Bobba, M.J. Cann, J.C. Frias, D. Parker, R.D. Peacock, *Org. Biomol. Chem.* **2005**, 1013.
- ³⁶ R. M. Izatt, K. Pawlak, J. S. Bradshaw, *Chem. Rev.* **1991**,91, 1721.
- ³⁷ S. Aime, M. Botta, L. Frullano, S. Geninatti Crich, G. Giovenzana, R. Paliarin, G. Palmisano, F. R. Sirtori, M. Sisti, *J. Med. Chem.* **2000**, 43, 4017-4024
- ³⁸ E. C. Wiener, S. Konda, A. Shadron, M. Brechbiel, O. Gansow, *Invest. Radiol.* **1997**, 32, 748-754

-
- ³⁹ A. Y. Louie, M. M. Huber, E. T. Ahrens, U. Rothbacher, R. Moats, R. E. Jacobs, S. E. Fraser, T. J. Meade, *Nat. Biotechnol.* **2000**, 18, 321-325
- ⁴⁰ R. Hovland, C. Glogard, A. J. Aasen, J. Klaveness, *Org. Biomol. Chem.* **2003**, 1, 644-647
- ⁴¹ C. Ferroud, H. Borderies, E. Larsi, A. Guy, M. Port, *Tetrahedron Lett.* **2008**, 49, 5972-5975
- ⁴² J. Moreau, J. C. Pierrard, J. Rimbault, E. Guillon, M. Port, M. Aplincourt, *Dalton Trans.* **2007**, 1611-1620
- ⁴³ N. Yadav, K. Chuttani, A. K. Mishra, B. Singh, *Chem. Biol. Drug. Des.* **2016**, 87, 730-736
- ⁴⁴ V. S. I. Sprakel, J. A. A. W. Elemans, M. C. Feiters, B. Luccnese, K. D. Karlin, R. J. M. Wolte, *Eur. Jour. Org. Chem.*, **2006**, 10, 2281-2295.
- ⁴⁵ A. Bencini, A. Bianchi, E. Garcia-Espana, M. Giusti, M. Micheloni, P. Paoletti, *Inorg. Chem.*, **1987**, 26, 681-684
- ⁴⁶ W. Clegg, P. J. Cooper, K. I. Kinnear, D. J. Rushton, J. C. Lockhart, *J. Chem. Soc.* **1993**, 1259
- ⁴⁷ I. Lázár, *Synt. Commun.* **1995**, 25 (20), 3181-3185
- ⁴⁸ W. D. Kim, D. C. Hrncir, G. E. Kiefer, A. D. Sherry, *Inorg. Chem.* **1995**, 34, 2225-2232
- ⁴⁹ I. Meumier, A. K. Mishra, B. Hanquet, P. Cocolios, R. Guillard, *Can. J. Chem.* **1995**, 73, 685
- ⁵⁰ F. Chavez, A. D. Sherry, *Org. Chem.* **1989**, 54, 2990
- ⁵¹ H. Stetter, K. H. Mayer, *Chem. Ber.* **1961**, 94, 1410
- ⁵² J. Wen, Z. Geng, Y. Yin, Z. Wang, *Inorg. Chem. Commun.* **2012**, 16-20