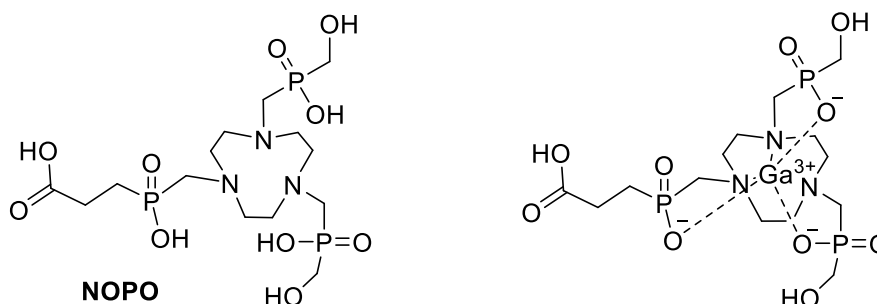


## Abstrakt

Makrocyclické sloučeniny našly jako účinné chelátory kovů tvořící mimořádně stabilní komplexy široké uplatnění v řadě biologických a medicínských aplikací. Vhodně navržené mohou efektivně vázat kovové ionty, aniž by hrozilo následné uvolnění těchto iontů do organismu. Lze je tak využít pro vázání iontů kovových radionuklidů pro vnitřní radioterapii nebo pro zobrazovací metody – pozitronovou emisní tomografii (PET) a jednofotonovou emisní počítačovou tomografii (SPECT). Komplexy  $Gd^{3+}$  lze využít pro zobrazování magnetickou rezonancí (MRI). Ligandy mohou zároveň poskytovat místo pro připojení další molekuly nebo struktury, která zajistí například vazbu na cílový protein exprimovaný na povrchu buněk vybrané tkáně, fluorescenční značku pro vizualizaci nebo třeba další komplex využitelný pro komplementární zobrazovací metodu. Jak ligand, tak spojka musí být vhodně navrženy, aby sloužily svému účelu. U ligandu je to především s ohledem na iont kovu, který má vázat, a u spojky s ohledem na konjugovaný substrát, podmínky konjugace a konečnou aplikaci.

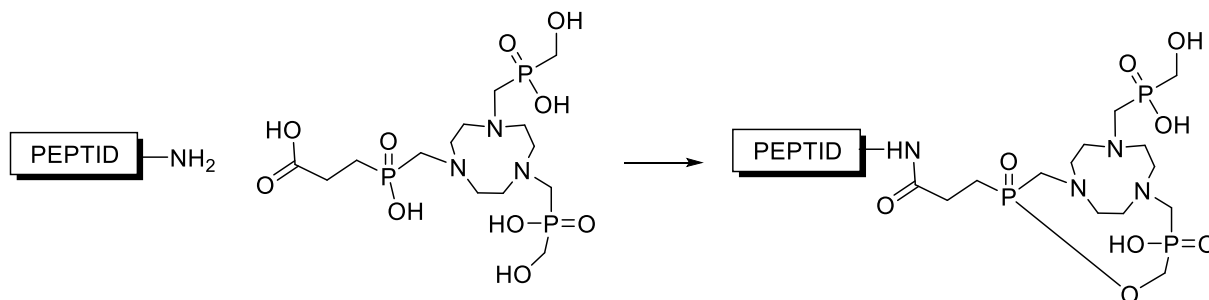
V rámci této práce jsem se zabýval syntézou a studiem vlastností především makrocyclických ligandů a jejich komplexů s několika typy spojek s potenciálním užitím v biomedicině a diagnostickém zobrazování.

První ze studovaných ligandů byl derivát 1,4,7-triazacyklononanu se třemi pendantními rameny tvořenými fosfinovými kyselinami (NOPO) navržený primárně pro komplexaci PET nuklidu  $^{68}Ga$  (Obr. 1).



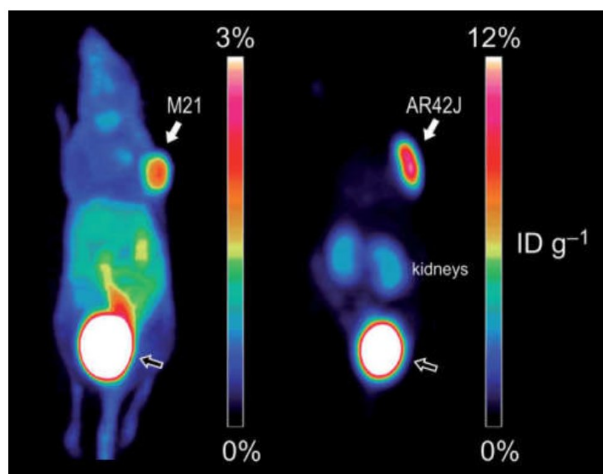
Obr. 1. Ligand NOPO a jeho komplex s  $Ga^{3+}$ .

Byla prokázána účinná a rychlá komplexace iontů  $Ga^{3+}$ , a to i v přítomnosti potenciálně konkurujících dalších kovových iontů,<sup>1</sup> a vysoká stabilita výsledného gallitého komplexu. K navázání na tzv. targeting („cílení“) peptidy bylo použito amidické vazby přes jedinou karboxylovou skupinu na pendantním rameni makrocyclu. Hydroxymethylové funkční skupiny na zbývajících dvou ramenech usnadňují komplexaci a zvyšují hydrofilicitu. V průběhu aktivace karboxylu pro vazbu peptidu byl pozorován vznik fosfilaktonu (Obr. 2).



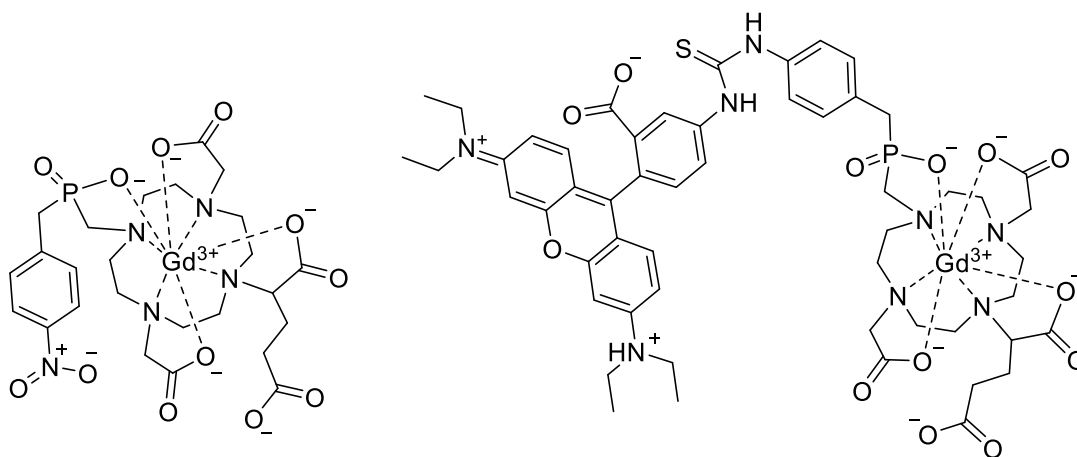
Obr. 2. Konjugace ligandu NOPO s peptidem za vzniku fosfilaktonu.

Ten však nebránil použití látky k zamýšlenému účelu a v průběhu komplexace  $\text{Ga}^{3+}$  se samovolně hydrolyzoval.<sup>2</sup> Potenciál pro použití v PET diagnostice byl úspěšně ověřen na živých zvířecích modelech s tumory<sup>1,3</sup> (Obr. 3).



Obr. 3. PET snímky (MIP, 75 min p.i) nahých myši s implantovanými nádory. Vlevo:  $^{68}\text{Ga}$ -NOPO-RGDFK (M21 lidský melanom); vpravo:  $^{68}\text{Ga}$ -NOPO-NOC (AR42J krysí pankreatický karcinom). Akumulace aktivity v močovém měchýři díky renální exkreci je označena černou šipkou. Převzato z lit.<sup>1</sup>

Dalším řešeným projektem byla příprava potenciální MRI kontrastní látky na bázi komplexů  $\text{Gd}^{3+}$  s nově navrženým ligandem (Obr. 4) založeným na 1,4,7,10-tetraazacyklododekanu (cyclenu), s jedním pendantním ramenem umožňujícím připojení peptidu přes karboxylovou funkční skupinu a dalším s fosfinovou kyselinou. Ta zvyšuje rychlost výměny vody koordinované na centrální ion  $\text{Gd}^{3+}$  a tím i účinnost výsledné kontrastní látky.

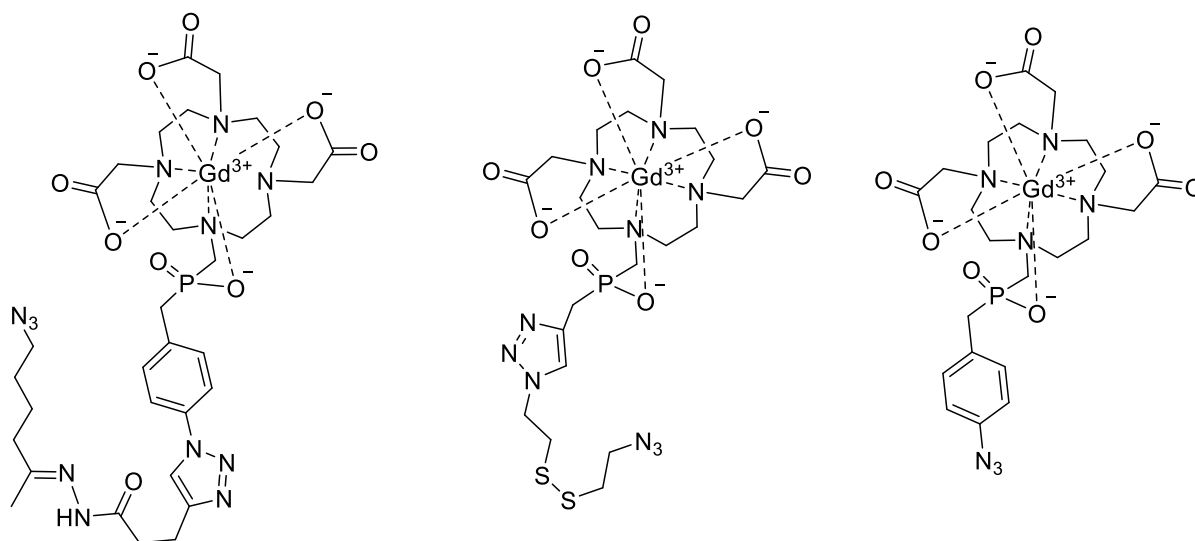


Obr. 4. Vlevo: nově připravená MRI kontrastní látka na bázi komplexu  $\text{Gd}^{3+}$ ; vpravo: konjugát  $\text{Gd}^{3+}$  komplexu s fluorescenčním rhodaminem.

Přes aminobenzylovou skupinu na fosfinovém pendantním rameni byla také připojena pomocí thio-močovinové spojky molekula fluoroforu rhodaminu. Výsledný komplex pak mohl sloužit jako duální MRI/fluorescenční kontrastní látka. Funkce MRI kontrastní látky byla po konjugaci s cílícím peptidem ověřena na zvířecím modelu.<sup>4</sup>

Dále byly připraveny tři komplexy  $\text{Gd}^{3+}$  na bázi cyclenu (Obr. 5) se třemi různými typy spojek na pendantním rameni tvořeném kyselinou fosfinovou: jedna hydrolyzovatelná při nízkém pH

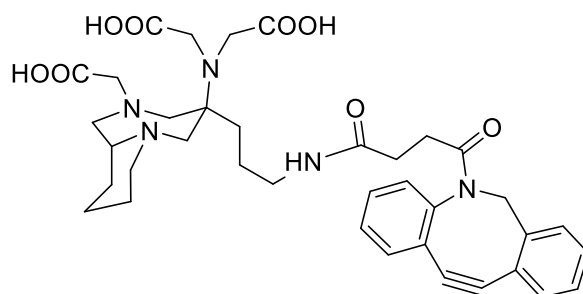
(hydrazid–hydrazonová), další redukčně štěpitelná (s disulfidickou vazbou) a poslední stabilní – neštěpitelná, sloužící jako kontrola.



**Obr. 5.** Komplexy  $Gd^{3+}$  použité k modifikaci povrchu nanodiamantů; vlevo: s pH senzitivní hydrazid–hydrazonovou spojkou; uprostřed: s redukčně štěpitelnou disulfidickou spojkou; vpravo: s neštěpitelnou spojkou jako kontrola.

Tyto komplexy byly pomocí měďnými ionty katalyzované alkyn-azidové cykloadice navázány na povrch polymerem pokrytých nanodiamantů (ND) s poruchami v krystalické mřížce dusík–vakance (NV) způsobujícími fluorescenci. Magnetický moment blízkých  $Gd^{3+}$  způsobil zkrácení relaxačního času  $T_1$  NV center, což lze při vhodném experimentálním uspořádání odečíst jako změnu intenzity fluorescence. Pokud se vlivem prostředí (jeho nízkým pH respektive redukčním potenciálem) v blízkosti nanodiamantů funkční spojky rozštěpily a komplexy  $Gd^{3+}$  od jeho povrchu oddifundovaly, vedlo to ke zvýšení intenzity fluorescence. Jejím měřením tak bylo možné určit změnu pH či redukčního potenciálu v bezprostředním okolí nanodiamantu. Byly tak připraveny nanosondy rezponzivní na chemické parametry okolí se submikrometrovým rozlišením. Tím byla potvrzena funkčnost konceptu, jenž by mohl být v budoucnu použit například ke zjišťování parametrů prostředí uvnitř buněčných organel.<sup>5</sup>

V poslední části byl připraven ligand se strukturou navrženou pro komplexaci PET nuklidu  $^{68}Ga^{3+}$ , který nesl pnutý cykloalkyn (**Obr. 6**) umožňující rychlou bioortogonální konjugaci například s azidovou či nitronovou funkční skupinou. V tomto případě se jedná o nemakrocyclický ligand, nicméně s rigidizovaným základním skeletem, který by měl zajistit dostatečnou stabilitu komplexu pro použití *in vivo*. Tato látka by mohla potenciálně sloužit pro *in vivo* PET značení, její použitelnost však zatím čeká na ověření.



**Obr. 6.** Bifunkční ligand určený k vazbě  $^{68}Ga$  a bioortogonální konjugaci přes pnutý cykloalkyn.

## Seznam citované literatury

- (1) Šimeček, J.; Zemek, O.; Hermann, P.; Wester, H.-J.; Notni, J. A Monoreactive Bifunctional Triazacyclononane Phosphinate Chelator with High Selectivity for Gallium-68. *ChemMedChem* **2012**, *7* (8), 1375–1378. <https://doi.org/10.1002/cmdc.201200261>.
- (2) Simecek, J.; Zemek, O.; Wester, H.; Notni, J. Ga-68-Labeling via Metal-Induced de-Esterification of NOPO-Peptides. *Journal of labelled compounds & radiopharmaceuticals* **2013**, *56*, S207–S207.
- (3) Šimeček, J.; Zemek, O.; Hermann, P.; Notni, J.; Wester, H.-J. Tailored Gallium(III) Chelator NOPO: Synthesis, Characterization, Bioconjugation, and Application in Preclinical Ga-68-PET Imaging. *Mol. Pharmaceutics* **2014**, *11* (11), 3893–3903. <https://doi.org/10.1021/mp400642s>.
- (4) Chilla, S. N. M.; Zemek, O.; Kotek, J.; Boutry, S.; Larbanoix, L.; Sclavons, C.; Elst, L. V.; Lukes, I.; Muller, R. N.; Laurent, S. Synthesis and Characterization of Monophosphinic Acid DOTA Derivative: A Smart Tool with Functionalities for Multimodal Imaging. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2017**, *25* (16), 4297–4303. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2017.06.008>.
- (5) Rendler, T.; Neburkova, J.; Zemek, O.; Kotek, J.; Zappe, A.; Chu, Z.; Cigler, P.; Wrachtrup, J. Optical Imaging of Localized Chemical Events Using Programmable Diamond Quantum Nanosensors. *Nat Commun* **2017**, *8* (1), 14701. <https://doi.org/10.1038/ncomms14701>.