

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Anorganická chemie

Studijní obor: 4XANOR



Mgr. Ondřej Zemek

Design ligandů pro medicijní aplikace
Ligand design for medicinal applications

Disertační práce

Školitel: prof. RNDr. Jan Kotek, Ph.D.

Praha, 2022

Charles University

Faculty of Science

Study programme: Inorganic Chemistry

Branch of study: 4XANOR



Mgr. Ondřej Zemek

Ligand design for medicinal applications
Design ligandů pro medicijnální aplikace

Doctoral thesis

Supervisor: prof. RNDr. Jan Kotek, Ph.D.

Prague, 2022

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci na téma **Design ligandů pro medicínální aplikace** zpracoval samostatně pod vedením školitele prof. RNDr. Jana Kotka, Ph.D., a použité literární zdroje jsem řádně citoval. Tato práce nebyla použita k získání jiného vysokoškolského titulu.

V Praze dne 6. 10. 2022

Poděkování

Největší poděkování patří mému školiteli Honzovi Kotkovi, za to že mé studium zaštil a v jeho průběhu mi poskytl jak velkou volnost, tak i podporu a v jeho závěru nemalou měrou přispěl k tomu, že tato práce nabyla reálné podoby.

Dále bych rád poděkoval prof. Petru Hermannovi za mnoho rad, podnětů a doporučení a Vojtovi Kubíčkovvi za zajištění chodu laboratoře.

Nemalý dík patří také Filipovi, Kubovi, Míše, Michalovi, Mírovi, BJ, Janovi, Robertovi, Mirce a mnoha dalším z „velkého i malého labu“ za vytvoření skvělé atmosféry při práci v laboratoři i po ní.

Za plodnou spolupráci bych rád poděkoval Jakubovi Šimečkovi, Johannesu Notnimu a Petru Cíglrovi.

Velký dík patří také Petrovi, Liborovi, Lucce, Anet a Sabině za podporu a povzbuzení v různých náročnějších životních etapách.

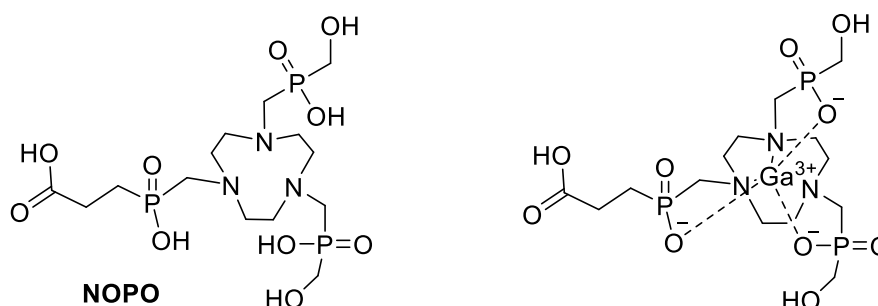
A na závěr patří můj obrovský vděk rodině, která mě ve studiu podporovala intenzivně a dlouho.

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.

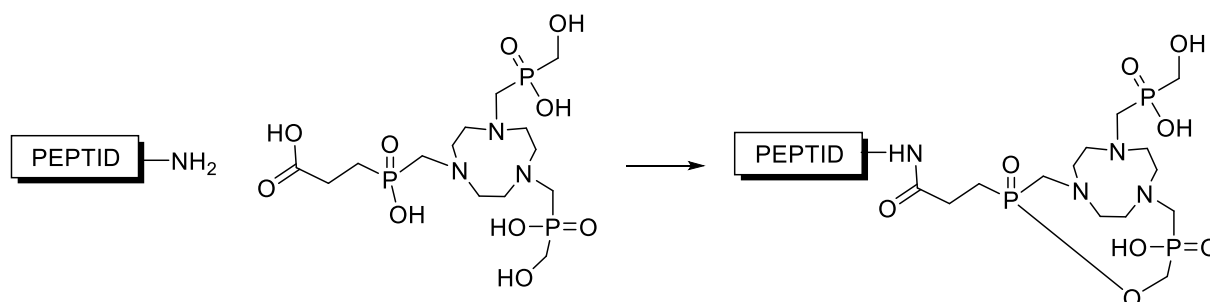
V rámci této práce jsem se zabýval syntézou a studiem vlastností především makrocyclických ligandů a jejich komplexů s několika typy spojek s potenciálním užitím v biomedicíně a diagnostickém zobrazování.

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).



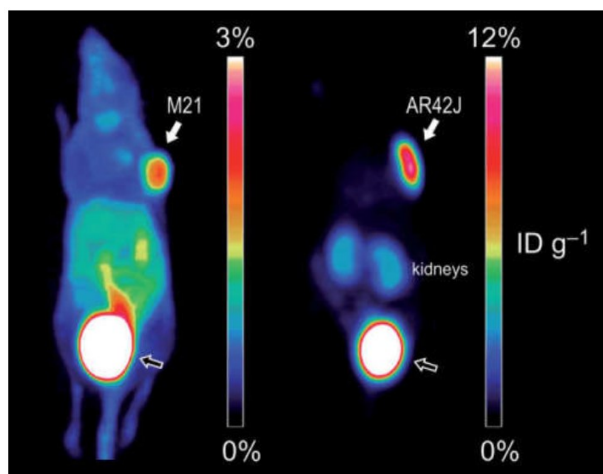
Obr. 1. Ligand NOPO a jeho komplex s Ga^{3+} .

Byla prokázána účinná a rychlá komplexace iontů Ga^{3+} , a to i v přítomnosti potenciálně konkurujících dalších kovových iontů,¹ 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).



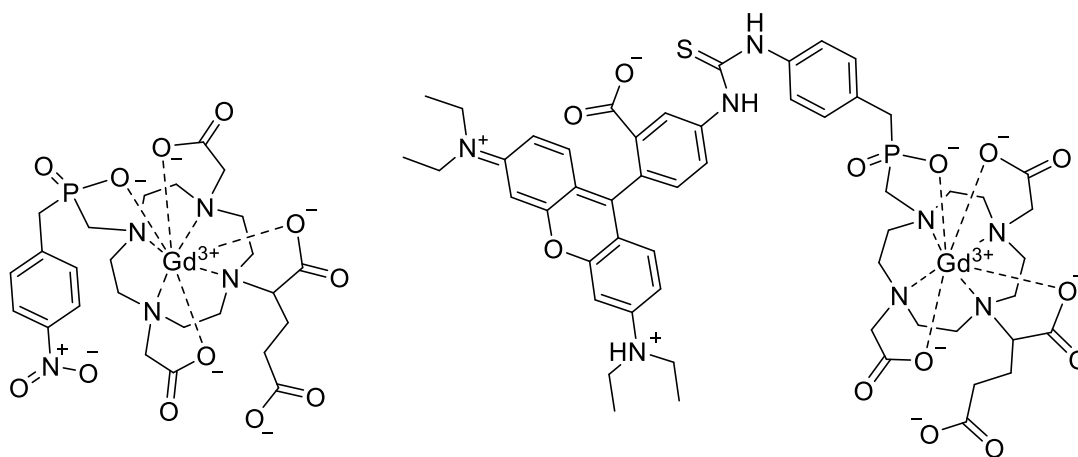
Obr. 2. Konjugace ligandu NOPO s peptidem za vzniku fosfilaktonu.

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



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

Dalším řešeným projektem byla příprava potenciální MRI kontrastní látky na bázi komplexů 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 Gd^{3+} a tím i účinnost výsledné kontrastní látky.

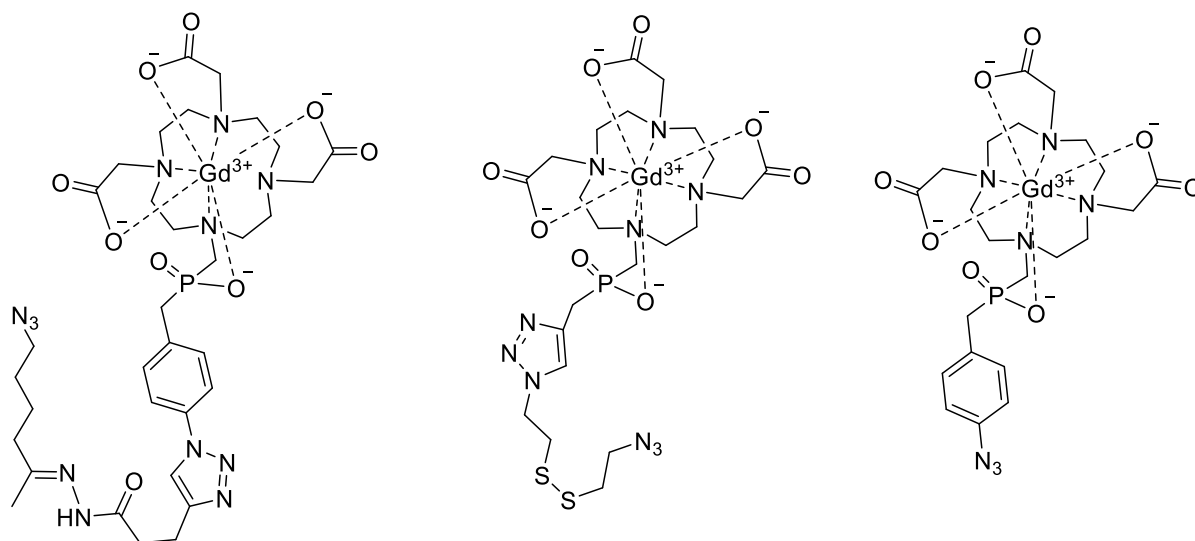


Obr. 4. Vlevo: nově připravená MRI kontrastní látka na bázi komplexu Gd^{3+} ; vpravo: konjugát Gd^{3+} komplexu s fluorescenčním rhodaminem.

Přes aminobenzyllovou skupinu na fosfinovém pendantním rameni byla také připojena pomocí thiočovinové 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.⁴

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

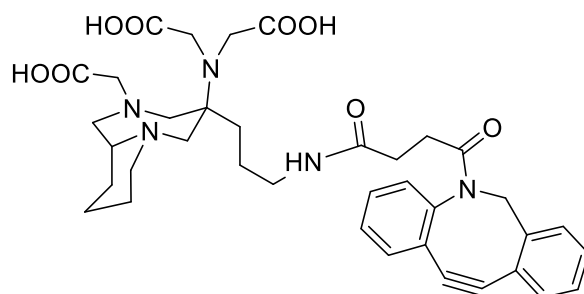
(hydrazid–hydrazonová), další redukčně štěpitelná (s disulfidickou vazbou) a poslední stabilní – neštěpitelná, sloužící jako kontrola.



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.⁵

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.

Abstract

Macrocyclic compounds are widely used in a number of biological and medical applications due to their effective and strong chelating abilities. If aptly designed, they bind metal ions without risk of releasing these ions into organism. Thus, they can be used to bind metal radionuclides ions for endoradiotherapy or clinical imaging methods, namely positron emission tomography (PET) and single photon emission computed tomography (SPECT). Gd^{3+} complexes may be utilized in magnetic resonance imaging (MRI). Simultaneously, these ligands can provide way to attach a linker to another structure or moiety designed, for example, for binding onto target protein present on the cell surface, as a fluorescent marker, or for binding different complex for complementary imaging method. Both the ligand and the linker must be properly designed to serve their purposes, *i.e.* the ligand mainly according to metal ion to be bound, and the linker according to conjugated substrate, conditions of conjugation and final application.

This thesis deals with synthesis and study of properties of mainly macrocyclic ligands and their complexes with several types of linkers. These compounds are potentially applicable in diagnostic imaging and biomedicine.

First of the studied ligands was 1,4,7-triazacyclononane (TACN) derivative with three phosphinic acid pendant arms (NOPO) designed primary for complexation of PET nuclide ^{68}Ga (Figure 1).

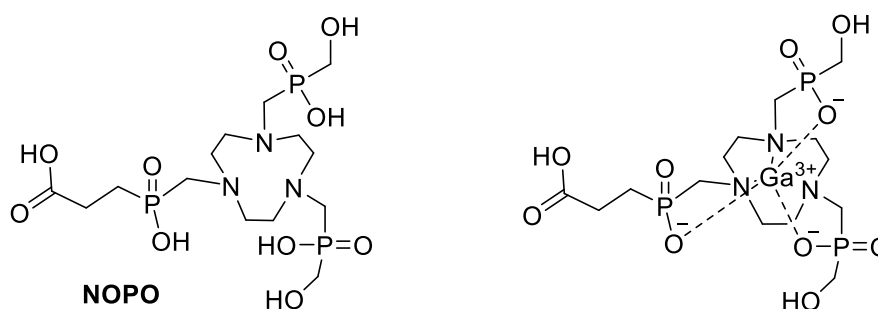


Figure 1. NOPO Ligand and NOPO complex with Ga^{3+} .

Fast complexation of Ga^{3+} ions was proved even in the presence of other potentially concurrent metal ions.¹ The formed gallium complex also boasted a high stability. The binding of targeting peptides through amide bond was achieved with the only carboxylic acid present on pendant arms of macrocycle. The hydroxomethylens on the other two arms facilitate complexation and render the complex more hydrophilic. Activation of carboxylic acid during peptide conjugation was accompanied with formation of phosphilactone (Figure 2).

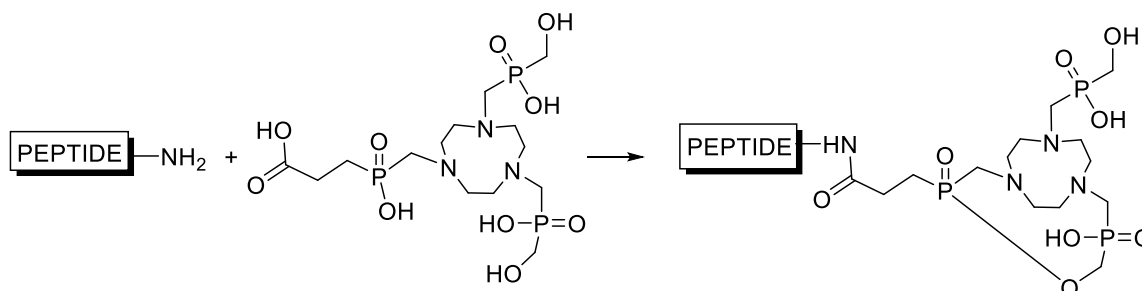


Figure 2. NOPO ligand conjugation with peptide accompanied with phosphilactone formation.

As the lactone was spontaneously cleaved during Ga^{3+} complexation, the intended application was not impeded.² Potential for PET diagnostic was demonstrated on living animal models with implanted tumours^{1,3} (Figure 3).

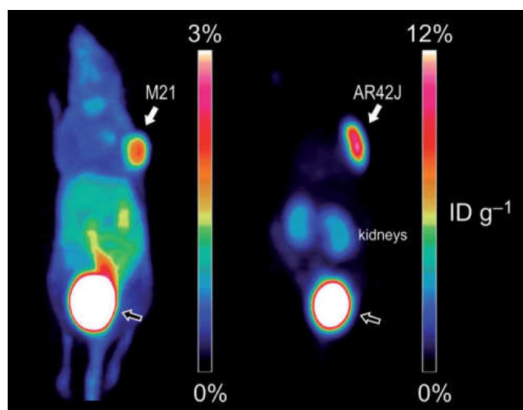


Figure 3. PET images (MIP, 75 min p.i.) of nude mouse tumour xenografts. Left: ^{68}Ga -NOPO-RGDfK (M21 human melanoma); right: ^{68}Ga -NOPO-NOC (AR42J rat pancreas carcinoma). Accumulation of activity is observed in the urinary bladder (indicated by outline arrows) due to renal excretion. From ref.¹

Next project dealt with synthesis of potential MRI contrast agent based on Gd^{3+} complex with newly designed ligand (Figure 4). It consisted of 1,4,7,10-tetraazacyclododecane (cyclen) with one pendant arm allowing for peptide conjugation *via* carboxylic functional group and another with phosphinic acid. This moiety speeds up exchange of water molecules coordinated to the central Gd^{3+} ion and thus enhances effectiveness of the contrast agent.

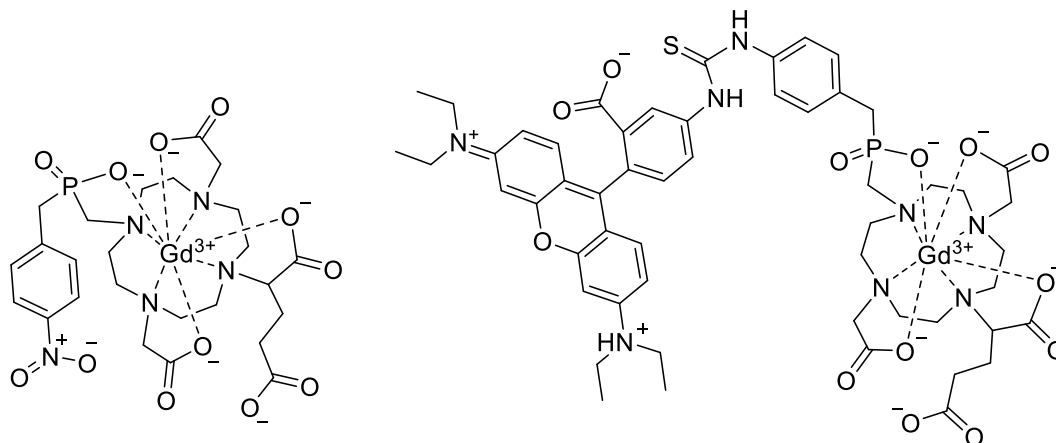


Figure 4. Left: newly synthesized Gd^{3+} based MRI contrast agent; right: Gd^{3+} complex conjugated with fluorescent dye (rhodamine).

Fluorescent dye (rhodamine) was also attached to aminobenzyl functional group on phosphinic pendant arm *via* thiourea linker. Resulting complex could be used as dual MRI/fluorescent contrast agent. Complex was also conjugated to targeting peptide and MRI contrast agent capability was demonstrated on an animal model.⁴

In the next project three Gd^{3+} complexes based on cyclen (Figure 5) were prepared. On their phosphinic pendant arm one of them bears low pH sensitive (hydrazide–hydrazone) hydrolysable

linker, another one reductively cleavable (disulphidic) linker and the last one stable linker, serving as reference.

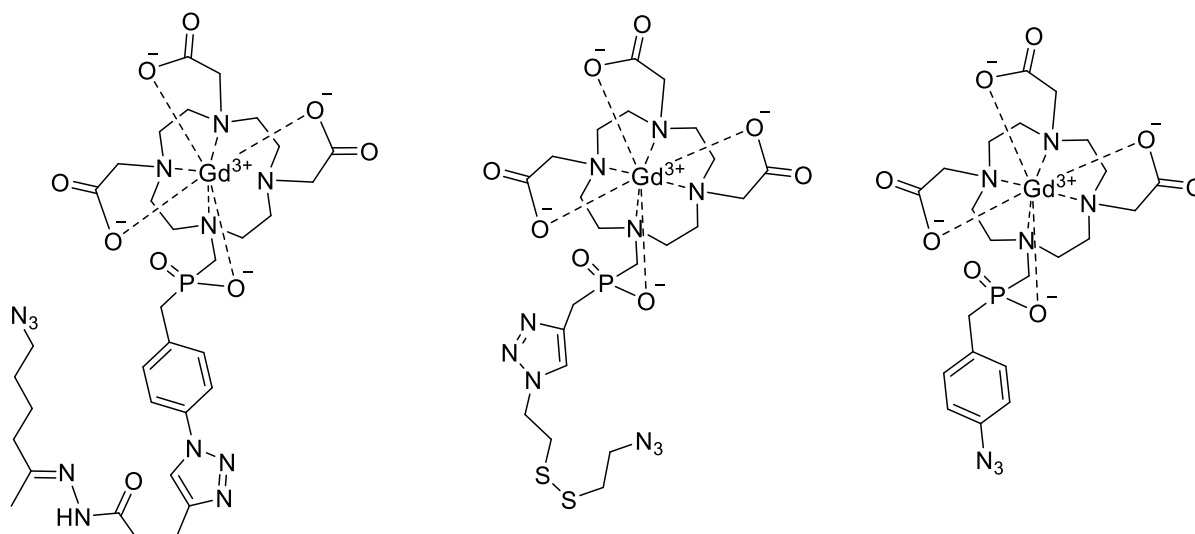


Figure 5. Gd^{3+} complexes used for decoration of nanodiamonds surfaces; left: with pH sensitive hydrazone–hydrazone linker; middle: with reductively cleavable disulphidic linker; right: with stable linker for reference.

These complexes were bound with Cu^+ catalysed alkyne-azide cycloaddition to polymer coating on nanodiamonds (ND) fluorescent thanks to presence of nitrogen–vacancy (NV) defect in their crystal lattice. Magnetic moment of Gd^{3+} in proximity of ND caused decrease of relaxation time T_1 of NV centres. This can be measured with special technique as change in fluorescence intensity. If the ND environment (low pH or reductive potential, respectively) causes cleavage of the linkers and Gd^{3+} complexes to diffuse from its surface the fluorescence intensity rises. Measuring the fluorescence allows for assessment of change in pH or in reduction potential, respectively, in ND vicinity. Nanosensor responsive to chemical properties of environment with submicrometre resolution were thus constructed. This serves as proof of concept that can be in the future used, for example, in measurements of chemical parameters inside cellular organelles.⁵

In the last project, ligand with structure designed for complexation of PET nuclide ^{68}Ga was synthesized. This ligand has strained cycloalkyne attached (Figure 6), allowing for fast and bioorthogonal conjugation with azide or nitron functional group. This ligand is not based on macrocycle, but the rigidized structure should provide sufficient complex stability for *in vivo* application. This compound has potential to be used as *in vivo* PET marker, but its real applicability has not been tested yet.

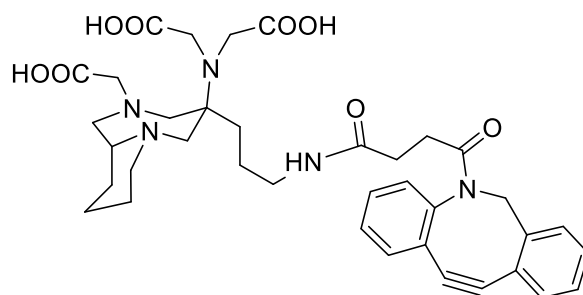


Figure 6. Bifunctional ligand designed for ^{68}Ga complexation and bioorthogonal conjugation with strained cycloalkyne.

Obsah

1 Seznam použitých zkratk	2
2 Úvod	4
2.1 Zobrazovací metody	4
2.1.1 Fluorescenční metody	4
2.1.2 PET	4
2.1.3 SPECT	5
2.1.4 MRI	6
2.2 Design ligandů	6
2.2.1 Obecné nároky	6
2.2.2 Ligandy pro radiodiagnostiku a radioterapii	7
2.2.3 MRI kontrastní látky	8
2.3 Možnosti vazby ligandů k biologicky aktivním molekulám	10
2.3.1 [3+2] dipolární cykloadice azid-alkyn	10
2.3.2 Staudingerova ligace	11
2.3.3 Pnutím poháněná [2,3] cykloadice mezi alkynem a azidem	13
2.3.4 Pnutím poháněná [2,3] cykloadice mezi alkynem a nitronem	14
2.3.5 Reakce isothiokyanátů	14
2.3.6 Adice thiolu na maleimid	15
2.3.7 Vznik amidové vazby	16
2.3.8 Dielsova-Alderova reakce s inverzními elektronovými nároky (IEDDA)	18
3 Cíle práce	21
4 Diskuze získaných výsledků	23
4.1 Deriváty triazacyklononanu pro komplexaci ⁶⁸ Ga	23
4.2 Bifunkční ligandy pro bimodální MRI a optické zobrazování	27
4.3 Kontrastní látky reagující na změnu vnějších podmínek („smart“)	30
4.4 Rigidizovaný bioortogonálně bifunkční ligand pro PET	37
5 Závěr	42
6 Seznam použité literatury	44
Seznam příloh a deklaráce podílu autora	54

1 Seznam použitých zkratek

ACN	acetonitril
ATP	adenosin trifosfát
BARAC	biarylazacyklooktynon
BCN	bicyclo[6.1.0]non-4-yn
CP	cyklopropen
CT	počítačová tomografie
CuAAC	měďnými ionty katalyzovaná [2,3] cykloadice mezi alkyne a azidem (Copper(I)-Catalysed Alkyne-Azide Cycloaddition)
DA	Dielsova-Alderova reakce
DBCO	dibenzocyklooktyn
DEX	dexamethason
DIFO	difluorovaný cyklooktyn
DO2A	1,4,7,10-tetraazacyklododekan-1,7-dioctová kyselina
DO3A	1,4,7,10-tetraazacyklododekan-1,4,7-trioctová kyselina
DOTA	1,4,7,11-tetraazacyklododekan-1,4,7,11-tetraoctová kyselina
DTPA	diethylentriamin pentaoctová kyselina
EDC	ethyl(dimethylaminopropyl)karbodiimid
EDG	elektron-donující skupina (Electron-Donating Group)
EMA	evropská agentura pro léčivé přípravky (European Medicines Agency)
EWG	elektron-odtahující skupina (Electron-Withdrawing Group)
FDA	Úřad pro kontrolu potravin a léčiv USA (Food and Drug Administration)
FDG	2-deoxy-2-[¹⁸ F]fluoroglukosa
FITC	fluoresceinisothiokyanát
GFP	zelený fluorescenční protein (Green Fluorescent Protein)
GSH	glutathion
HATU	1-[bis(dimethylamino)methylen]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]pyridinium-3-oxid hexafluorofosfát (Hexafluorophosphate Azabenzotriazole Tetramethyl Uronium)
HBTU	2-(1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorofosfát (Hexafluorophosphate Benzotriazole Tetramethyl Uronium)
HOMO	nejvyšší obsazený molekulový orbital (Highest Occupied Molecular Orbital)
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie (High Performance Liquid Chromatography)

IEDDA	Dielsova-Alderova reakce s obrácenými elektronovými nároky (Inverse Electron Demand Diels-Alder)
IgG	imunoglobulin G
LUMO	nejnižší neobsazený molekulový orbital (Lowest Unoccupied Molecular Orbital)
MRI	zobrazování (nukleární) magnetickou rezonancí (Magnetic Resonance Imaging)
MS	hmotnostní spektrometrie (Mass Spectrometry)
NADH	nikotinamid dinukleotid
ND	nanodiamanty
NHS	<i>N</i> -hydroxysukcinimid
NV	pár dusík–vakance (Nitrogen–Vacancy pair)
ODMR	opticky detekovaná magnetická rezonance
PET	pozitronová emisní tomografie (Positron Emission Tomography)
RITC	rhodaminisothiokyanát
RTG	rentgen
PIDAZTA	4-amino-4-methylperhydro-pyrido[1,2-a][1,4]diazepin- <i>N,N',N'</i> -trioctová kyselina
PSMA	prostatě specifický membránový antigen (Prostate Specific Membrane Antigen)
SPAAC	pnutím poháněná [2,3] cykloadice mezi alkynem a azidem (Strain-Promoted Azide-Alkyne Cycloaddition)
SPANC	pnutím poháněná [2,3] cykloadice mezi alkynem a nitronem (Strain-Promoted Azide-Nitrone Cycloaddition)
SPECT	jednofotonová emisní počítačová tomografie (Single Photon Emission Computed Tomography)
sTCO	pnutý trans-cyklookten (strained <i>trans</i> -cyclooctene)
TACN	1,4,7-triaazacyklononan
<i>t</i> -Bu ₃ DO3A	tris(<i>terc</i> -butylester) kyseliny 1,4,7,10-tetraazacyklododekan-1,4,7-trioctové
TBTU	(2-(1 <i>H</i> -benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium tetrafluoroborát (Tetrafluoroborate Benzotriazole Tetramethyl Uronium)
TCO	<i>trans</i> -cyklookten (<i>trans</i> -cyclooctene)
TEM	transmisní elektronový mikroskop
TFA	trifluorooctová kyselina
TMTH	3,3,6,6-tetramethylthiacykloheptyn

2 Úvod

2.1 Zobrazovací metody

2.1.1 Fluorescenční metody

Neinvazivní zobrazení tkáňových případně buněčných struktur *in vivo* optickými metodami je do hloubky značně omezeno absorpcí a rozptylem záření v okolní tkáni. I použití optimálních vlnových délek viditelné a blízké infračervené oblasti (600–1300 nm podle typu tkáně) umožňuje zobrazení jen do hloubky několika milimetrů či maximálně jednotek centimetrů.^{6,7} Kvůli nízkému kontrastu mezi jednotlivými typy tkání je zpravidla nutné použít kodlišení vhodná barviva. Výhodou jsou fluorescenční barviva, která při vhodné volbě emisní vlnové délky, případně doplnění detektoru optickým filtrem, poskytují velmi dobrý kontrast proti nefluorescenčnímu pozadí. Této skutečnosti využívá také řada mikroskopických fluorescenčních technik,^{8–10} které umožňují detailní náhled do struktur a dějů uvnitř buněk i některých drobných a dostatečně průhledných mnohobuněčných organismů, jako je například *Caenorhabditis elegans*¹¹ či embrya *Drosophila melanogaster*.¹² Rozvoj těchto metod je spojený s vývojem celé palety fluorescenčních barviv na bázi malých organických molekul, komplexů lanthanoidů i různých typů nanočástic.^{13,14} Kromě případů, kdy jsou zobrazovány buněčné struktury a molekuly vykazující vlastní fluorescenci, jako například chlorofyly, NADH,¹⁴ flaviny či rekombinantní proteiny s GFP a jeho deriváty,¹⁵ je použití těchto fluorescenčních barviv nutné.

2.1.2 PET

Pozitronová emisní tomografie využívá nuklidů (Tab. 1), které při svém radioaktivním rozpadu produkují pozitrony (záření β^+).

Tab. 1. Vybrané nuklidy s β^+ rozpadem použitelné pro PET.^{16,17}

Nuklid	⁸² Rb	¹⁵ O	¹³ N	¹¹ C	⁶⁸ Ga	¹⁸ F	⁶⁴ Cu	⁶⁹ Ge	⁸⁹ Zr	¹²⁴ I
Poločas rozpadu	75 s	2 min	10 min	20.4 min	68 min	110 min	12.7 h	39.5 h	78 h	100 h

Pozitron v tkáni velmi rychle ztrácí kinetickou energii a následně anihiluje s elektronem za vzniku dvou fotonů γ záření o energii 511 keV směřujících téměř přesně 180° od sebe. Při PET vyšetření je do pacienta takovýto zářič vpraven, a pokud detektory umístěné v prstenci kolem těla zaregistrují v jeden okamžik oba fotony, je takovýto signál zaznamenán a následně použit k rekonstrukci prostorové distribuce zářiče v těle. Zobrazení PET ze svého principu poskytuje dobrou informaci pouze o cílové struktuře, ve které je zářič koncentrován.¹⁸ Vhodným výběrem molekuly nesoucí β^+ nuklid je tak možné odlišit tkáně nejen na základě přítomnosti struktur na povrchu jejich buněk, ale i jejich aktivity (například u funkčního PET zobrazení mozku pomocí ¹⁸F značeného analogu glukózy – FDG).¹⁹ Na druhou stranu PET snímky postrádají anatomické detaily. Na snímku pak například může být několik dobře patrných nádorů, ale je obtížné zjistit jejich přesnou polohu proti jiným orgánům. Proto se PET s výhodou kombinuje s dalšími metodami schopnými tyto informace dodat, především

s CT, případně MRI.²⁰ Nezanedbatelnou nevýhodou je také radioaktivní zátěž organismu, proto by aktivita aplikované dávky měla být co nejmenší. Komplikaci dále představuje krátký poločas rozpadu některých používaných nuklidů, který na jednu stranu snižuje celkovou dávku záření organismem absorbovanou (aktivita je vysoká hlavně krátce po podání během snímání obrazu), na druhou stranu však omezuje časové možnosti logistiky a chemických úprav včetně čištění preparátů. V současné době je klinicky nejpoužívanějším PET nuklidem ¹⁸F a nejběžnější PET radiodiagnostikem FDG. Produkce tohoto nuklidu je však závislá na cyklotronu, což značně omezuje jeho dostupnost. Proto se stále častěji využívají i další, především kovové, nuklidy které je možné získávat z jednodušejí dostupných generátorů. Pro aplikace ve spojení s protilátkami (IgG), které potřebují i díky vyšší molekulární hmotnosti (150 kDa) delší čas (kolem 3 dnů) na dostatečné označení cílových struktur, je potřeba použít nuklidy s odpovídajícím poločasem rozpadu (např. ⁸⁹Zr).²¹ Další atraktivní možnosti některých kovových PET nuklidů je využití jiného nuklidu stejného prvku pro radioterapeutické účely, například páry ⁸⁶Y/⁹⁰Y, ^{60,61,62,64}Cu/^{66,67}Cu, apod.²²

2.1.3 SPECT

Jednofotonová emisní počítačová tomografie využívá fotonů γ -záření doprovázejících radioaktivní rozpadu některých nuklidů nebo vznikají při deexcitaci metastabilních jader. Na rozdíl od PET se využívají spíše prvky s vyšší atomovou hmotností a γ -fotony každého radionuklidu mají jinou energii a nejsou produkovány v páru. Tab. 2 uvádí některé využívané SPECT nuklidy, přičemž ^{99m}Tc je diagnosticky nejčastěji aplikovaným nuklidem vůbec a to jednak díky vhodným vlastnostem pro samotné měření ($T_{1/2} = 6$ h, z 89 % přeměna emisí γ záření s energií 140 keV), tak také kvůli snadné dostupnosti z ^{99m}Tc/⁹⁹Mo generátoru.²² Z podobných důvodů jako u PET nuklidů se však také u SPECT stále častěji využívají i další zpravidla kovové nuklidy, například ¹¹¹In díky delšímu $T_{1/2}$ ve spojení s protilátkami k detekci ovarialního a kolorektálního karcinomu.^{23,24}

Tab. 2. Vybrané častěji používané nuklidy pro SPECT.^{25,26}

Nuklid	^{99m} Tc	¹²³ I	¹¹¹ In	²⁰¹ Tl	⁶⁷ Ga	¹⁵⁵ Tb	¹³¹ I
Poločas rozpadu	6,01 h	13,27 h	2,805 d	3,038 d	3,261 d	5,3 d	8,0 d
E_{hv} [keV]	140,5	159,0	171,3; 245,4	167,4	93,3; 184,6	87, 105	364,5

Oproti PET jsou SPECT γ -kamery užívané pro snímání obrazu podstatně levnější a dostupnější, ale jejich citlivost je výrazně nižší kvůli nutnosti užití kolimátoru, který propustí jen velmi malou část γ -fotonů.²⁷ Kvůli použití kolimátoru je u SPECT rovněž o něco nižší rozlišení – v řádu několika mm a pro získání srovnatelné kvality obrazu je nutné použít vyšší aktivitu zářiče.²⁸ Také SPECT zobrazení se může s výhodou kombinovat s CT, přičemž první metoda poskytuje informaci funkční a druhá anatomickou.

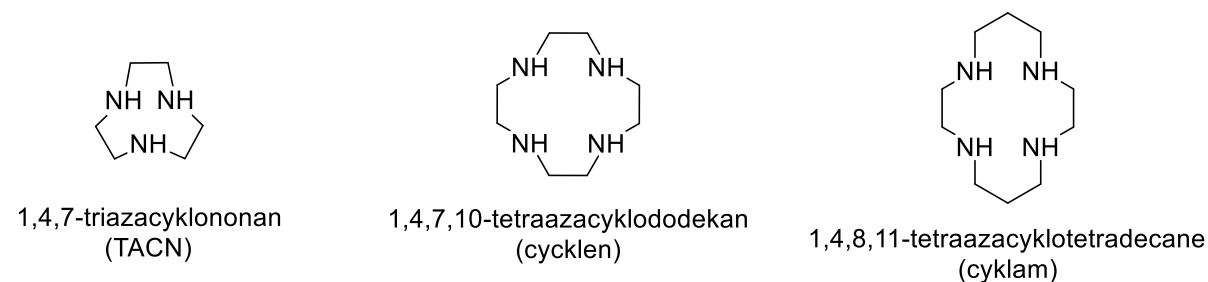
2.1.4 MRI

Zobrazení pomocí nukleární magnetické rezonance je založeno na skutečnosti, že atomy s nenulovým jaderným spinem a tím i nenulovým magnetickým momentem vytvoří po vložení do magnetického pole dvě energetické hladiny, podle souhlasné či opačné orientace magnetického momentu jádra oproti tomuto magnetickému poli. Rozdíl těchto hladin je úměrný síle magnetického pole a pro jednotlivé nuklidy se liší. Působením záření, jehož energie se rovná rozdílu těchto hladin, na populaci takovýchto jader můžeme vychýlit systém z rovnováhy. Jeho návrat zpět (spinová relaxace) je provázen emisí záření, jejíž rychlost vyhasínání, intenzita a frekvence je ovlivněna okolím jádra. Například se bude lišit u jader vodíku v tukové a svalové tkáni. Použitím prostorového gradientu v magnetickém poli a vhodnou volbou ozařování a záznamu signálu je možné získat informace z prostorově různých částí měřeného objektu (například těla), a následně z nich vytvořit obraz. V lékařské diagnostické praxi se využívá měření signálu vodíku, který je v těle dostatečně zastoupen (cca 70 % těla tvoří voda) a zároveň poskytuje druhý nejsilnější signál ze všech prvků při stejném magnetickém poli (o několik procent silnější poskytuje jen radioaktivní tritium). I přes to je nutné pro dostatečný odstup signálu od šumu použít poměrně silná magnetická pole²⁹ – běžné nemocniční přístroje mají 1,5 T či 3 T, ale používají se i 7 T a ve výzkumu dokonce i přes 10 T.³⁰ MRI zobrazení nepředstavuje pro pacienta žádnou radioaktivní zátěž při dobrém vykreslení anatomických struktur. Problém může představovat malý rozdíl v intenzitě signálů, které poskytují podobné typy tkáně, například nervová tkáň mozku a nádor z ní pocházející. Proto se při asi třetině MRI vyšetření aplikují MRI kontrastní látky, které jsou schopné, ovlivněním magnetického pole ve své velmi těsné blízkosti, změnit odezvu tkáně v okolí. K tomuto účelu jsou využívány kvůli sedmi nespárovaným elektronům a svému vysokému magnetickému momentu především komplexy Gd^{3+} , i když dříve byly používány také koloidní roztoky paramagnetických částic oxidů železa.

2.2 Design ligandů

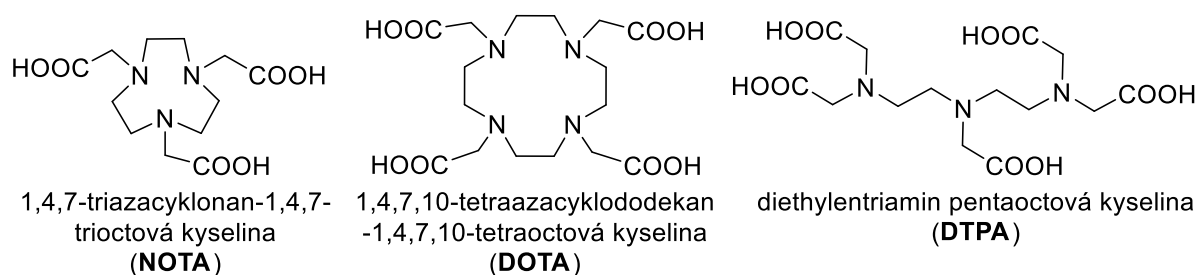
2.2.1 Obecné nároky

Při aplikaci MRI kontrastních látek nebo radiodiagnostik na bázi kovových iontů se zpravidla nepodávají ionty ve formě disociovatelných solí, ale jako komplexy. Na ligandy využitelné jako kontrastní látky nebo nosiče radionuklidů je kladena řada nároků. Především musí tvořit dostatečně stabilní komplexy i v *in vivo* podmínkách, tedy v prostředí dalších potenciálně konkurenčních iontů a ligandů. A to jednak proto, aby došlo k zviditelnění těch struktur, na které je látka cílena, ale také proto, aby nedocházelo k toxickému působení uvolnění kovových iontů. Takovouto pevnou vazbu zajišťují například chelátory na bázi makrocyclů (Obr. 7) nebo diethylenetriaminu s koordinujícími se pendantními rameny, např. acetátovými (Obr. 8).



Obr. 7. Makrocyclické sloučeniny, které jsou základem některých dále zmiňovaných ligandů.

Pro komplexaci radionuklidů s krátkým poločasem rozpadu je také důležité, aby komplexace probíhala dostatečně rychle a vzniklý komplex bylo snadné rychle vyčistit a připravit pro aplikaci. Tím se sníží ztráty nuklidu způsobené nezadržitelným radioaktivním rozpadem.



Obr. 8. Ligandy zmíněné v textu používané mj. pro komplexaci nuklidů pro radioaplikace a Gd^{3+} pro MRI kontrastní látky.

Pro ligand je také klíčové, aby umožňoval zviditelnění cílových struktur, a to buď přímo svojí strukturou (například přítomností lipofilní části, která se váže v albuminu pro angiografii), nebo možností připojit jinou cílicí molekulu (například některý ze široké palety selektivně se vázajících peptidů nebo protilátek). Připojením molekuly detekovatelné jinou zobrazovací metodou je možné také připravit tzv. multimodální zobrazovací látky, například pro PET/MRI či MRI/fluorescence.

2.2.2 Ligandy pro radiodiagnostiku a radioterapii

Kromě několika málo nekovových prvků využívaných jako PET a SPECT zářiče (^{11}C , ^{15}O , ^{18}F , $^{123,124}I$) má většina nuklidů používaných nebo potenciálně použitelných kovový charakter. Až na několik výjimek (^{82}Rb , ^{201}Tl)^{31,32} je potřeba takové kovové nuklidy před aplikací do pacienta vázat do vhodné cílicí molekuly nejčastěji právě komplexací, která je při vhodně zvoleném ligandu rychlá a poměrně obecná. Stejný ligand proto může být použit pro vázání iontů několika různých prvků (například různých lanthanoidů) podle zamýšlené aplikace (Obr. 9).

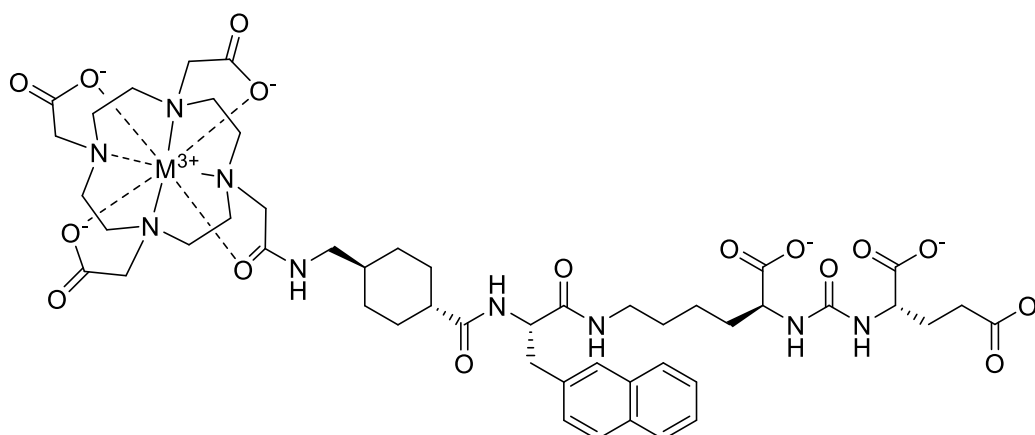
Značnou výhodou řady kovových radionuklidů (^{68}Ga , ^{99m}Tc , ^{44}Sc) je možnost získávat je z generátorů, ve kterých vznikají radioaktivním rozpadem prvku s delším poločasem rozpadu. Tyto generátory jsou malé, dostupné a mohou být snadno umístěny a obsluhovány přímo na klinickém pracovišti, což značně zvyšuje dostupnost příslušného nuklidu oproti těm získávaným pomocí cyklotronu.³³

Některé prvky, jako například terbium, mají nuklidy využitelné jak pro SPECT – ^{155}Tb ($T_{1/2} = 5.32$ d), tak i pro PET – ^{152}Tb ($T_{1/2} = 17.5$ h) zobrazování. Další nuklid ^{161}Tb ($T_{1/2} = 6.89$ d) je navíc použitelný pro vnitřní radioterapii β^- /Augerovými elektrony.³⁴ Chemicky se však jedná o stále stejné Tb^{3+} ionty, které je možné stejně komplexovat a chování výsledného komplexu v organizmu bude stejné, ať bude použit pro diagnostiku nebo terapii, případně obojí současně.

Možnost měnit nuklid komplexovaný v radioterapeutiku, aniž by se tím měnila jeho farmakokinetika, otevírá prostor pro tzv. teranostika, tedy látky použitelné zároveň jako TERApeutika a diagNOSTIKA. Zpravidla se jedná o látky, sloužící pro endoradioterapii a zobrazení pomocí PET či SPECT.³⁵

Jedním z příkladů slibného uplatnění teranostického přístupu je látka PSMA-617 (Obr. 9) vyvinutá pro terapii rakoviny prostaty. Jedna část její molekuly je tvořena sekvencí Glu-urea-Lys, vykazující vysokou afinitu k proteinu PSMA, který je nadměrně (o několik řádů čteněji než na jiných typech tkáně) exprimován na povrchu buněk rakoviny prostaty u přibližně 95 % ze všech nádorů tohoto původu. Druhá část molekuly je tvořena makrocyclickým chelátorem – derivátem DOTA. V březnu

tohoto roku (2022) schválila FDA tuto látku se zakomplexovaným ^{177}Lu pod názvem Pluvicto (Novartis) pro terapii rakoviny prostaty, v případech kdy selhala předchozí chemoterapie inhibitory signální dráhy androgenového receptoru i terapie na bázi taxanu.³⁶

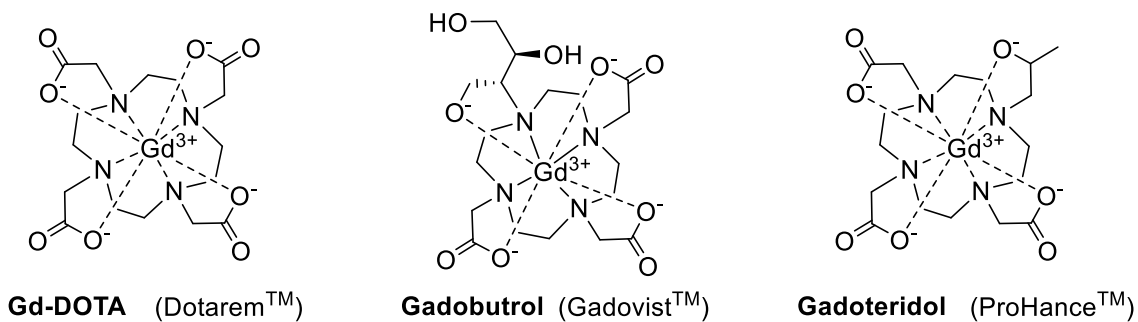


Obr. 9. PSMA-617 s $M = ^{177}\text{Lu}$ používaná pod názvem Pluvicto (Novartis) k léčbě rakoviny prostaty, s $M = ^{68}\text{Ga}$ je pak použitelná jako PET radiodiagnostikum pro tento nádor.

^{177}Lu produkované β^- záření, které je schopné likvidovat buňky nádoru, má ve tkáni dosah do 2 mm a nezpůsobuje tak škody mimo cílovou oblast.³⁷ Zároveň je také možné do PSMA-617 zakomplexovat ^{68}Ga pro použití k PET diagnostice.^{38,39} Nuklid ^{177}Lu je zároveň i zdrojem γ záření, které je možné použít pro diagnostiku pomocí SPECT zvláště v případech, že není k dispozici ^{68}Ga -PSMA PET nebo je potřeba sledovat postup léčby bez další radiologické zátěže.⁴⁰

2.2.3 MRI kontrastní látky

MRI kontrastní látky pracují na principu zvýšení nehomogenity v magnetickém poli na atomární úrovni a tím především snižují relaxační časy T_1 a T_2 protonů molekul vody ve svém okolí (schopnost ovlivnit relaxační čas vztažená na látkové množství kontrastní látky se označuje jako relaxivita). K tomuto účelu se používaly buď koloidní roztoky paramagnetických částic na bázi oxidů železa, nebo z nízkomolekulárních látek nejčastěji komplexy iontů Gd^{3+} (Obr. 10), které budou popsány detailněji. Experimentálně se však využívá i dalších paramagnetických iontů (Mn^{2+} , Ni^{2+}).^{41,42} Magnetické působení iontu Gd^{3+} na protony vody rychle klesá se zvětšující se vzdáleností. Nejvíce jsou ovlivněny molekuly vody přímo koordinované na centrální atom Gd^{3+} , avšak pokud se zvýší počet koordinovaných molekul vody nad jednu, významně se sníží stabilita komplexu. Vhodnou volbou dalších funkčních skupin ligandu je však možné dosáhnout urychlení výměny molekuly vody koordinované na centrální ion s molekulami z okolí. Pro tento účel se u ligandů na bázi cyklenu například osvědčila fosfinátová a fosfonátová pendantní ramena.⁴³ Další cestou jak zvýšit relaxivitu je optimalizace rychlosti, se kterou se ion Gd^{3+} pohybuje ve vztahu k okolní vodě (rotační korelační čas). Tato rychlost je u většiny nízkomolekulárních komplexů pro klinicky používaná magnetická pole příliš vysoká a je možné ji snížit například vazbou komplexu k makromolekule, nejlépe přes dostatečně rigidní spojku.^{44,45}



Obr. 10. Klinicky využívané MRI kontrastní látky na bázi makrocyclických komplexů Gd^{3+} .

Dalším aspektem, který je nutné brát v úvahu, je značná toxicita volných Gd^{3+} iontů (LD_{50} $GdCl_3$ je pro krysu přibližně 0,5 mmol/kg).⁴⁶ Protože jsou MRI kontrastní látky při vyšetřeních podávány v gramových množstvích, je důležité, aby se z komplexu v organismu nevolňoval centrální ion Gd^{3+} a molekuly kontrastní látky byly dostatečně rychle z těla eliminovány. V praxi tyto podmínky splňují komplexy Gd^{3+} s makrocyclickými ligandy odvozenými od DOTA nebo lineární deriváty DTPA. Po užití lineárních ligandů však byly prokázány dlouhodobě zvýšené koncentrace Gd^{3+} nervovém systému a kontrastní látky na jejich bázi byly například v roce 2018 staženy EMA z klinického intravenózního používání v Evropě.^{47,48}

2.3 Možnosti vazby ligandů k biologicky aktivním molekulám

Jak bylo zmíněno výše, pro některé z medicínálních aplikací koordinačních sloučenin je důležité, aby bylo možné připojit daný komplex k biologicky aktivní molekule (například k peptidu či protilátce), která zajistí specifickou distribuci v organismu (například vazbu na nádorovou tkáň). Pro připojení dvou částí především v kontextu biomolekul (DNA, peptidy) se dále také používá termín (chemická) ligace.⁴⁹ V další části teoretického úvodu jsou popsány některé reakce, které je možné pro takovéto připojení kontrastních látek a ligandů pro kovové radionuklidy použít. Cílem bylo zmínit ty, které se používají nejčastěji, mají v této aplikaci větší potenciál nebo jsou relevantní ve vztahu k projektům popsaným v Diskuzi, nikoliv vytvořit kompletní přehled.^{50,51}

V roce 2001 definoval B. Sharpless ve svém průkopnickém článku⁵² vlastnosti několika málo robustních reakcí, jejichž použití by mělo sloužit k rychlému vývoji nových molekul s požadovanými vlastnostmi:

„Reakce musí být modulární, široce uplatnitelná, s velmi vysokými výtěžky, musí poskytovat neškodné vedlejší produkty, které je možné odstranit bez chromatografických metod a musí být stereospecifická (ale nikoliv nutně enantioselektivní). Požadované vlastnosti procesu zahrnují jednoduché reakční podmínky (ideálně necitlivé na vodu a kyslík), snadno dostupné výchozí látky a činidla, použití žádných, neškodných (jako je voda) nebo snadno odstranitelných rozpouštědel a snadná izolace produktů.“

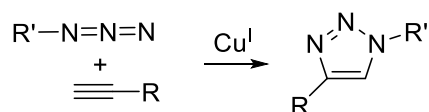
Dalšími požadovanými vlastnostmi v rámci tohoto konceptu nazývaného jako „click chemistry“ jsou stabilita produktu za fyziologických podmínek a vysoká (> 84 kJ/mol) termodynamická hnací energie reakce (spring-loaded), která zaručí vysokou selektivitu pro jeden produkt.⁵²

Jednou z oblastí, která může z potenciálu click chemistry mimořádně těžit, je radiochemie a příprava radiofarmak. Krátké poločasy rozpadu používaných nuklidů nutí k co největšímu zkrácení procesu přípravy radiofarmaka. Velkou výhodou jsou tedy vysoké reakční rychlosti a minimum vedlejších produktů, které pak vede k jednoduchému čištění a tím další úspoře času. Vysoká reakční rychlost zároveň umožňuje provádět reakce i ve velmi velkém zředění, které je pro radiochemii také typické. Zároveň se rozšiřuje využití složitějších molekul a biomolekul, jako jsou peptidy a celé protilátky s navázanými radioaktivními nuklidy v roli radiofarmak. V případě kovových nuklidů je potřeba použít vhodných ligandů, které dokáží dostatečně rychle, pevně a nejlépe i selektivně zvolené kovové ionty navázat – komplexovat. Zároveň musí tyto ligandy umožnit efektivní spojení s peptidem či protilátkou, která zajistí zacílení v organismu. Pokud bude toto spojení realizováno dostatečně selektivní reakcí probíhající za mírných podmínek, není potřeba chránit funkční skupiny peptidu zvláštními chránícími skupinami a následně tyto chránící skupiny zase odstraňovat, což je výhodné jak z pohledu ušetřeného času, tak i celkového výtěžku. S ohledem na sekundární a terciální strukturu a možnou denaturaci použité biomolekuly je kromě podmínek spojovací reakce (rozpouštědlo, teplota, pH) také potřeba volit ligand a samotnou spojku, zejména její sterickou náročnost a hydrofobicitu.

2.3.1 [3+2] dipolární cykloadice azid-alkyn

Měďnými ionty katalyzovaná 1,3-dipolární cyklizační reakce organického azidu s terminálním alkynem (označovaná často jako CuAAC a někdy prostě jako „click reakce“), jejímž produktem je 1,4-

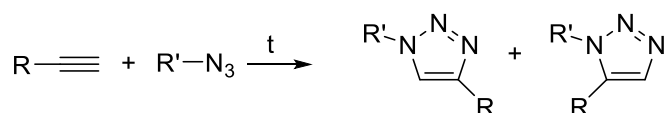
substituovaný 1,2,3-triazol (Obr. 11), byla publikována nezávisle na sobě dvěma výzkumnými skupinami B. Sharplesse⁵³ a M. Meldala⁵⁴ v roce 2002.



Obr. 11. Měďnými ionty katalyzovaná cykloadice alkynu s azidem (CuAAC).

Zatímco druhá jmenovaná skupina publikovala novou variantu Huisgenovy reakce v kontextu syntézy peptidů jako analogii tvorby peptidické vazby, první jmenovaní autoři jí pojali jako široce využitelný způsob pro spojování různých funkčních prvků, výborně zapadající do koncepce „click chemistry“, tak jak ji definoval o rok dříve právě B. Sharpless a kol.⁵² Tato skupina si také využití CuAAC reakce nechala patentovat.⁵⁵

Přestože silně exotermická, má do té doby známá (nekatalyzovaná) Huisgenova reakce mezi alkynem a terminálním azidem poměrně vysokou aktivační energii (cca 105 kJ/mol)⁵⁶ a vyžaduje několikahodinové zahřívání na teploty kolem 100 °C (například reflux v toluenu) a není regioselektivní – vznikají při ní jak 1,4-, tak i 1,5- regioizomery (Obr. 12).



Obr. 12. Původní nekatalyzovaná varianta Huisgenovy reakce poskytuje směs obou možných regioizomerů.

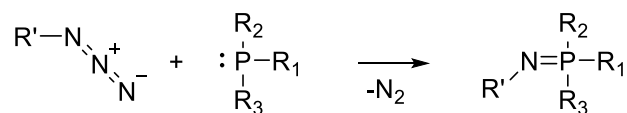
Pro své mírné podmínky, snadnost zavedení především azidové skupiny a možnost provádět reakci i ve vodných roztocích je CuAAC velmi vhodnou volbou pro navázání makrocyclických derivátů například na peptidy. Jistou komplikací je nutnost katalýzy měďnými ionty, které mohou být v případě volného makrocyclického ligandu účinně vázány (případně po oxidaci na měďnaté kationty) do komplexu. To má za následek jednak nutnost použít nadstechiometrické množství měďných iontů pro katalýzu proti množství použitého ligandu a také nutnost následně vzniklý komplex rozložit, aby byl makrocyclický ligand volný pro komplexaci finálního iontu, například radioaktivního izotopu.

CuAAC zažila od své první publikace před dvěma dekádami obrovský rozmach a bylo publikováno množství prací s různými obměnami reakčních podmínek včetně využití katalýzy elementární mědí, nejruznějšími měďnými komplexy,⁵⁷ stříbrnými ionty či ruthenatými komplexy, přičemž posledně jmenované poskytují převážně 1,5-substituované 1,2,3-triazoly.⁵⁸

Náhrada některých peptidických vazeb v cílících proteinech kontrastních látek za triazolovou spojku vytvořenou přes CuAAC zvyšuje odolnost těchto peptidů proti štěpení proteázami, přičemž afinita k cílovým receptorům se nemusí významně snížit.^{59,60}

2.3.2 Staudingerova ligace

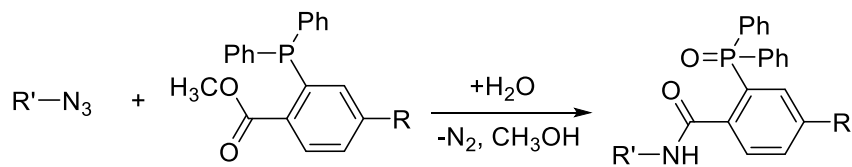
Staudingerova reakce, tedy reakce fosfinů s organickými azidy poskytující iminofosforan (Obr. 13), má za sebou již více než stoletou historii.⁶¹



Obr. 13. Staudingerova reakce (reakce azidu s trifenyfosfinem na iminofosforan za eliminace molekuly dusíku).

Její využití pro tvorbu amidické vazby z azidové a karboxylové funkční skupiny bylo ale popsáno až v roce 1955.⁶² Nejednalo se však ještě o ligaci ani o bioortogonální reakci a také 30% výtěžky u popsané varianty nebyly uspokojivé. Až v 80. letech minulého století tři skupiny v krátké době nezávisle na sobě⁶³ popsaly praktické použití pro syntézu peptidů a laktamů.^{64–66} Podmínky těchto reakcí, tedy zahřívání v nepolárních aprotických rozpouštědlech, jsou vynuceny skutečností, že iminofosforan reaguje díky své nukleofilní povaze s řadou funkčních skupin a například také s vodou, čehož se využívá při syntéze aminů z azidů jako tzv. Staudingerovy redukce.

Pro řadu aplikací ve spojení s biomolekulami jsou však takové podmínky nepoužitelné. Vhodným umístěním fosfinu „na dosah“ karboxylové funkční skupině v jedné molekule je však možné zajistit, že vzniklý iminofosforan bude reagovat přednostně na amid a to i ve vodném prostředí (Obr. 14). V roce 2000 byl takovýto typ fosfinu připraven skupinou C. Bertozzi a poprvé použit k fluorescenčnímu značení povrchu nádorových buněk, které měly ve své cytoplasmatické membráně zabudovány modifikované sacharidy s azidovou funkční skupinou.⁶⁷

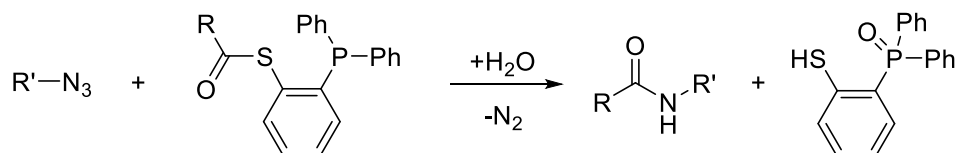


Obr. 14. Klasická varianta Staudingerovy ligace, při které fosforová komponenta zůstává zabudovaná v produktu.

Důvodem pro toto uspořádání, tedy azidová komponenta je nejprve metabolicky zabudována do buněčné struktury během kultivace a fosfinová následně přidána do kultury buněk až při ligaci, je dán stabilitou a menší velikostí azidové funkční skupiny. Díky tomu není významně pozměněno chování molekuly, na kterou byla azidová skupina připojena. Další výhodou azidové skupiny je její odolnost v organismu vůči vodě, oxidaci a obecně biochemickým přeměnám v živých organizmech. Na rozdíl od arylazidů či olefinických azidů, které jsou známé svou fotodegradací, jsou alkylazidy na světle obecně stabilní.^{68,69} Naopak u fosfinu byla pozorována pomalá oxidace a pravděpodobně i metabolizace cytochromem P450 v buněčné kultuře.⁷⁰

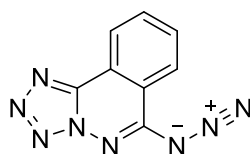
I když je tato reakce bioortogonální, nemusí být dostatečně rychlá pro použití ve větších organizmech spojeném s nižší koncentrací reakčních komponent. Neúspěšně tak například dopadly pokusy navázat radioaktivně značené fosfiny na azidovou skupinou opatřené protilátky zachycené *in vivo* v myších.⁷¹

Jiná varianta Staudingerovy ligace publikovaná v roce 2000 také Kalifornskou skupinou C. Bertozzi⁷² se označuje jako bezstopá (traceless), protože finální produkt ligace, amid, neobsahuje fosforovou komponentu.



Obr. 15. Bezestopá (traceless) Staudingerova ligace.

Pro značení *in vivo* je azidová funkční skupina vhodnou volbou z několika důvodů. Především se přirozeně v živých organizmech téměř nevyskytuje.⁶⁸ Jedinou dosud popsanou výjimkou je 6-azidotetrazolo[5,1-a]ftalazin (Obr. 16) izolovaný z kultur obrněnky *Gymnodinium breve*⁷³ (způsobující toxický tzv. rudý příliv v na Floridě⁷⁴).



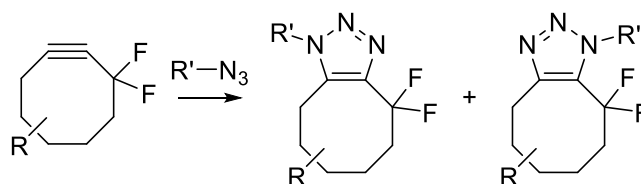
Obr. 16. Jediná dosud popsaná sloučenina přírodního původu nesoucí azidovou funkční skupinu.

Dobrá tolerance azidové skupiny v živých organizmech umožňuje také kultivaci buněk v prostředí s některou z nepřirozených aminokyselin s touto funkční skupinou, která vede k jejímu zabudování přímo do exprimovaných proteinů, což otevírá další možnosti aplikací.⁷⁵⁻⁷⁷

Ze syntetického pohledu je výhodou, že azidovou funkční skupinu je také možné poměrně snadno zavést do molekuly například výměnou za halogenid, aryl-, methyl- či trifluoromethyl-sulfonovou skupinu nebo za aromatický amin.

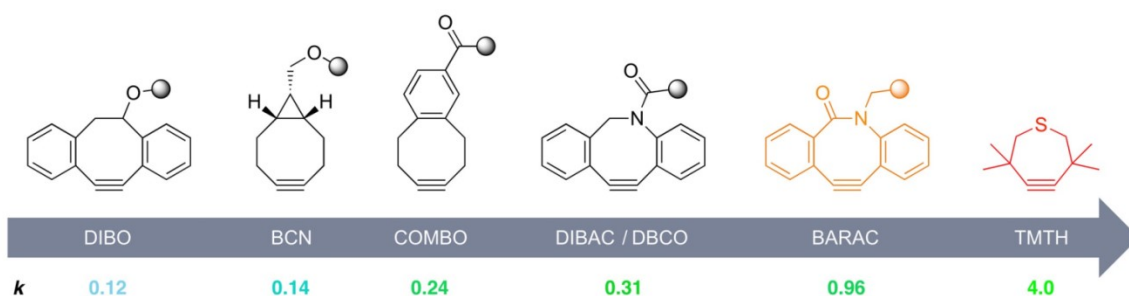
2.3.3 Pnutím poháněná [2,3] cykloadice mezi alkyne a azidem

Nižší reakční rychlost Staudingerovy ligace a toxicita iontů mědi nutných pro CuAAC, které byly omezující pro *in vivo* aplikace, vedla k hledání dalších možností bioortogonálního značení. Jako vhodná alternativa se ukázala reakce pnutých osmičlenných a v některých případech i sedmičlenných cykloalkynů s již dříve osvědčenými azidy (Strain-Promoted Azide-Alkyne Cycloaddition, SPAAC, viz Obr. 17).⁷⁸



Obr. 17. Cykloadiční reakce azidu s pnutým cykloalkynem.

Následně bylo zjištěno, že rychlost reakce těchto původně jednoduchých cykloalkynů, srovnatelnou se Staudingerovou ligací, lze zvýšit substitucí elektron-odtahujícími skupinami, nebo zvyšováním pnutí v cyklu (Obr. 18).⁷⁹ Zvyšující se reaktivita má však za následek sníženou stabilitu a pro aplikace *in vivo* se například ze zobrazených cykloalkynů používá BCN či DBCO, přičemž reaktivnější TMTH a BARAC jsou pro takové aplikace příliš nestabilní.⁵⁰



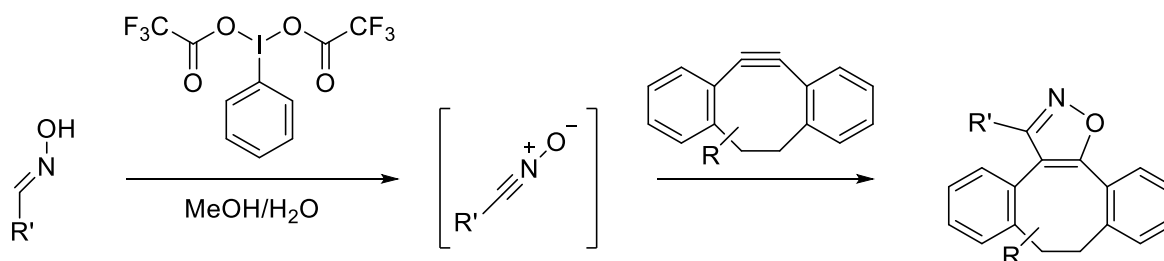
Obr. 18. Srovnání rychlostních konstant pro různě substituované pnuté cykloalkyny (reakce druhého řádu s benzylazidem $k[\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}]$). Převzato z lit.⁵⁰

Určitou nevýhodu může u reaktivnějších pnutých cykloalkynů typu DBCO představovat vyšší hydrofobicita aromatických jader, byly však připraveny i deriváty s methoxylovými a sulfonovými funkčními skupinami.⁵⁰ Další nevýhodou při využití SPAAC reakce pro syntézu může být také nedostatečná regioselektivita (Obr. 17) neboť při ní vznikají oba možné izomery. Pro značení *in vivo* to však zpravidla nevádí.

2.3.4 Pnutím poháněná [2,3] cykloadice mezi alkyne a nitronem

Nitrony představují méně běžnou alternativu azidům pro dipolarofilní adici pnutých alkyne (pro SPAAC). I tato reakce je poháněná uvolněním energie z pnutého cyklu (Strain-Promoted Alkyne-Nitron Cycloaddition, SPANC). Oproti SPAAC bylo u této reakce dosaženo vyšších reakčních rychlostí (k_2 až $60 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$).⁸⁰

Lineární nitrony vykazují oproti endocyklickým výrazně nižší stabilitu a zpravidla se připravují *in situ*.⁸⁰



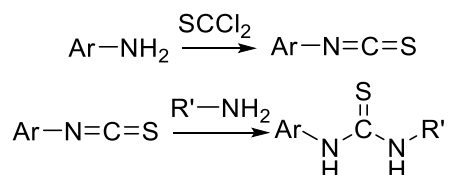
Obr. 19. Syntéza nitronu z oximu a jeho následná reakce s pnutým cykloalkynem.⁸¹

2.3.5 Reakce isothiokyanátů

Isothiokyanáty připravené reakcí thiofosgeny s primárním aromatickým aminem se využívají pro připojení na peptidy v mírně bazickém prostředí, nebo na jiné molekuly obsahující primární aminy, přes thiomocovinovou spojku (Obr. 20). Isothiokyanáty se obvykle vyznačují dostatečnou stabilitou, aby mohly být uchovávány v mírných bezvodých podmínkách a fluorescenční barviva s touto funkční skupinou (např. fluoresceinisothiokyanát, FITC, či rhodaminisothiokyanát, RITC) se běžně používají při nespecifickém značení proteinů přes lysinové a *N*-terminální aminy.^{82,83}

Pomocí této reakce bylo například připojeno několik různých ligandů na bázi makrocyclů a DTPA s isothiokyanátovou funkční skupinou na monoklonální protilátky přes lysinové primární aminy. Tyto

konjugáty byly následně použity pro komplexaci ^{64}Cu a PET zobrazení. Pro některé aplikace je nevýhodou, že takové značení není specifické a ligandů na jednu protilátku bylo vždy navázáno několik.⁸⁴ Nicméně tato metoda konjugace byla ve spojení s protilátkami použita i u jiných zářičů (např. ^{18}F či $^{99\text{m}}\text{Tc}$) s odlišným způsobem jejich vazby.^{85,86}

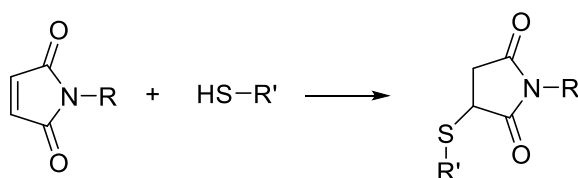


Obr. 20. Příprava isothiokyanátu reakcí aromatického aminu s thiofosgenem a jeho následná reakce s primárním aminem za vzniku thiomočoviny.

Velice podobným způsobem se chovají i isokyanáty, které však mají podstatně vyšší reaktivitu a s ní spojenou malou selektivitu. Kromě aminů reagují isokyanáty s vodou, hydroxyly, thioly i karboxylovými kyselinami. Vyznačují se také nízkou stabilitou, takže jsou zpravidla připravovány *in situ*.⁸⁷

2.3.6 Adice thiolu na maleimid

Michaelova adice thiolu na dvojnou vazbu maleimidu (Obr. 21) je reakcí často využívanou pro značení peptidů a bílkovin nesoucích thiolovou skupinu na postranním řetězci cysteinu. Zvláště zajímavé je využití této reakce ke spojení monoklonálních protilátek s malými cytotoxickými molekulami. Na této bázi bylo vyvinuto a schváleno již několika léčiv.^{88,89} Reakce probíhá specificky s thiolem při pH v rozmezí 6,5–7,5. Při vyšších hodnotách pH může docházet k reakci s aminovou skupinou v postranním řetězci lysinu a imidazolem histidinu.⁹⁰ Výhodou je poměrně vzácné zastoupení cysteinu v proteinech oproti jiným aminokyselinám (1-2 %),⁹¹ které, alespoň v kontextu nemodifikovaných peptidů, poskytuje určitou selektivitu. Podobně je možné využít i analogické reakce maleinimidu se selenocysteinem.⁹²



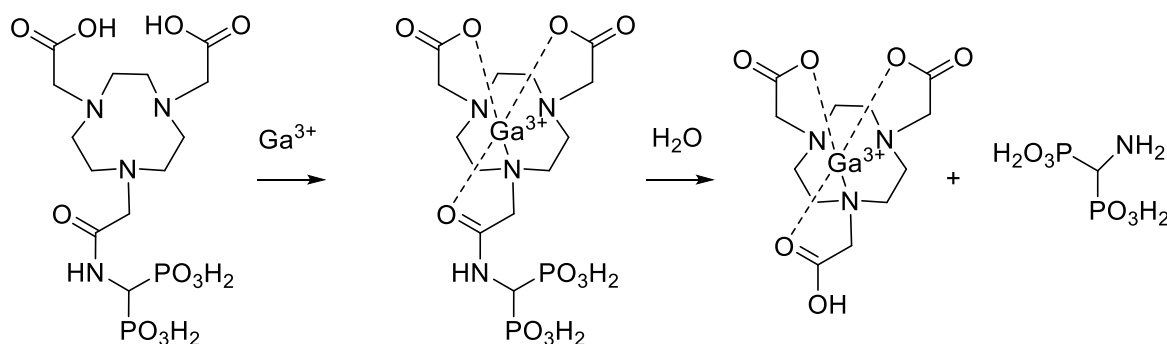
Obr. 21. Michaelova adice thiolu na maleimid.

Jistým omezením této reakce je, že v komplexním prostředí organismu může docházet i k retro-Michaelovské reakci zpět na maleimid, který může dále reagovat s přítomnými thioly, například se sérovým albuminem či glutathionem běžně přítomným v plazmě jako fyziologické redukční činidlo.⁹³ Důsledkem je pak migrace efektivní části molekuly (např. radioaktivního nuklidu) na jinou biomolekulu a tím změna zacílení (payload migration).

2.3.7 Vznik amidové vazby

Tvorba amidické vazby přímo z aminových a karboxylových skupin nemůže být, kvůli jejich všudypřítomnosti v organizmech, bioortogonální a přímo nezapadá ani do koncepce click chemistry. Je však velmi běžně používaným způsobem spojení ligandu kontrastní látky nebo radiofarmaka s dalšími molekulami, především se syntetickými peptidy. U těch je často možné využít chránění potenciálně reagujících funkčních skupin z předchozích kroků syntézy peptidu a finální odchránění realizovat až s výsledným konjugátem. Obvykle se zde využívá navázání na *N*-konec peptidového řetězce, na postranní řetězec lysinu nebo další pomocné skupiny nesoucí amin. U nativních peptidů a bílkovin je selektivní připojení komplikovanější, podobně jako u isothiokyanátů.⁹⁴

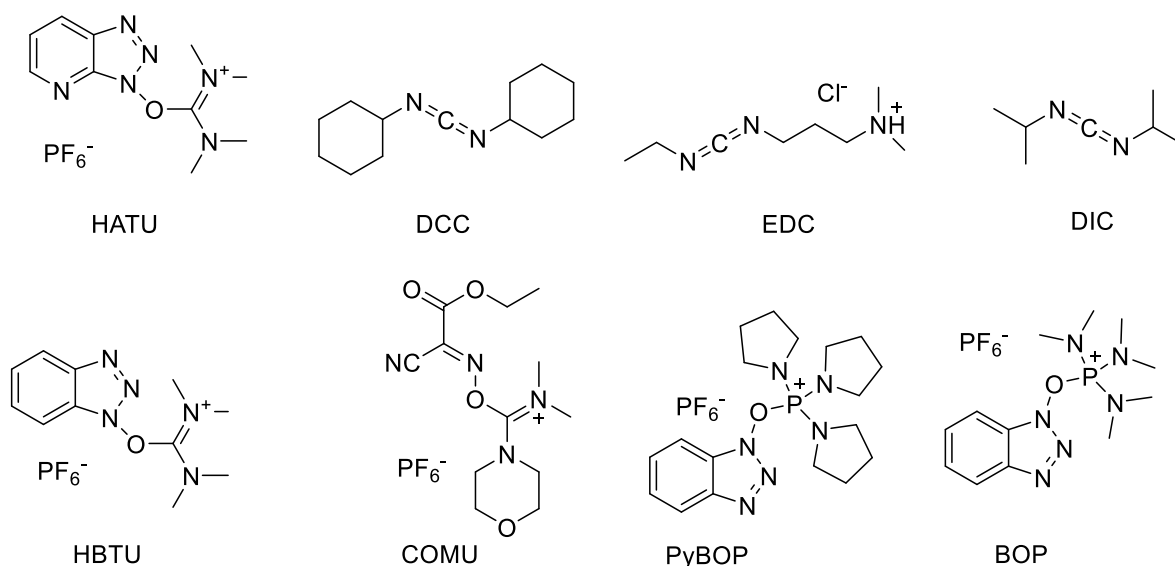
Amidová vazba je v organismu poměrně stabilní, enzymatické štěpení peptidázami musí být pro zachování funkce vlastních proteinů organismu dostatečně specifické. Ale například blízká přítomnost iontu kovu může vést k hydrolyze amidové vazby. Pokud je ke konjugaci použito acetátové pendantní rameno vázané na makrocyclickém kruhu, může být hydrolyza urychlena koordinací kyslíku či dusíku amidové vazby na centrální atom použitého komplexu. Takováto koordinace způsobí pokles elektronové hustoty na amidovém uhlíku karbonylu a usnadní nukleofilní atak hydroxylových iontů vody, viz příklad na Obr. 22,⁹⁵ podobně jako je katalyzována hydrolyza peptidické vazby metaloenzymy.



Obr. 22. Hydrolyza amidické spojky derivátu NOTA usnadněná komplexací Ga^{3+} . Podle lit.⁹⁵

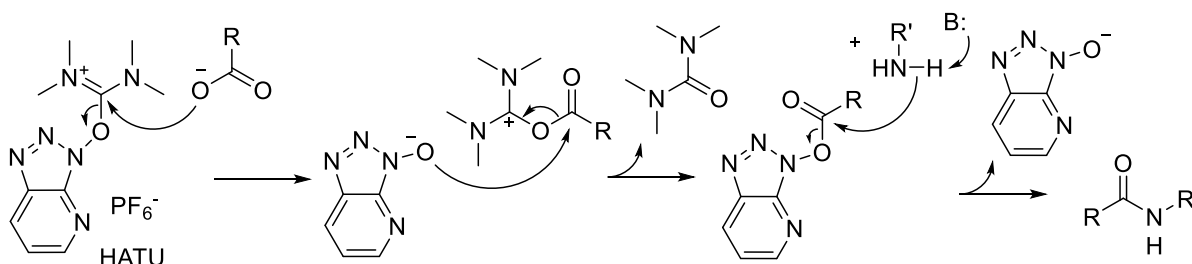
2.3.7.1 Aktivační činidla

Pro tvorbu amidické vazby za poměrně mírných podmínek je k dispozici celá řada aktivačních činidel na bázi karbodiimidů, fosfoniových, aminiových, iminiových/uroniových a fluoroformamidiniových solí, triazinů nebo organofosfonových kyselin,^{96–99} které byly vyvinuty z velké části pro účely syntézy peptidů (Obr. 23).



Obr. 23. Některé běžnější z mnoha používaných činidel pro syntézu amidické vazby; uroniové/iminiové sole: HATU, HBTU a COMU; karbodiimidy: DCC, EDC a DIC; fosfoniové sole: PyBOP a BOP.⁹⁹

Vývoj směřoval například k potlačení racemizace připojovaných aminokyselin a stabilitě činidla v roztoku (HBTU, HATU) nebo toleranci vodního prostředí a tvorbě vedlejších produktů rozpustných ve vodě (EDC).¹⁰⁰ Příklad mechanismu s využitím činidla HATU je ukázán na Obr. 24.

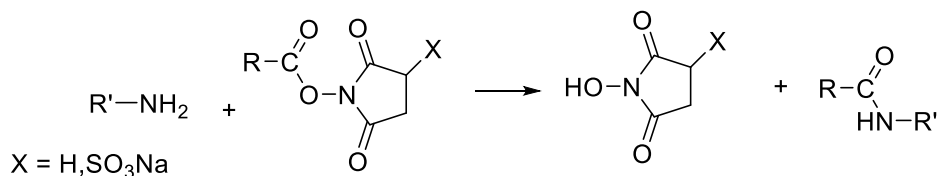


Obr. 24. Příklad aktivace karboxylové funkční skupiny pomocí HATU, kdy vzniká aktivovaný ester s 1-hydroxy-7-azabenzotriazolem, který následně reaguje s aminem za vzniku amidu.¹⁰¹

2.3.7.2 Aktivované estery

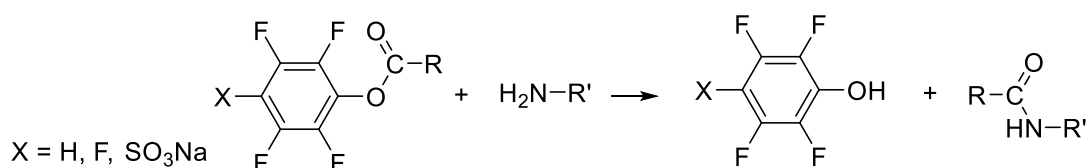
Pro vytvoření amidické vazby je možné použít také reaktivní estery karboxylových kyselin s dobrými odcházejícími skupinami. Jednou z takových nejčastěji využívaných odstupujících skupin je *N*-hydroxysukcinimid (NHS), jehož estery jsou dostatečně stabilní, aby mohly být skladovány, a některé konjugáty s nimi jsou dostupné i komerčně. Za fyziologických podmínek mají NHS estery poločas hydrolýzy několik hodin, a je možné je, nebo jejich rozpustnější sulfonované deriváty (sulfo-NHS), použít i ke konjugaci ve vodním prostředí.¹⁰²

Poměrně často se NHS esterů používá pro konstrukci ortogonálních bifunkčních spojek, kde aktivovaný ester slouží pro připojení spojky na amin (například lysinu na protilátce či peptidu), a druhá část spojky může nést pnutý cykloalkyn nebo *trans*-cyklookten pro následné označení *in vivo*.¹⁰³



Obr. 25. Reakce NHS esteru s aminem za vzniku amidu.

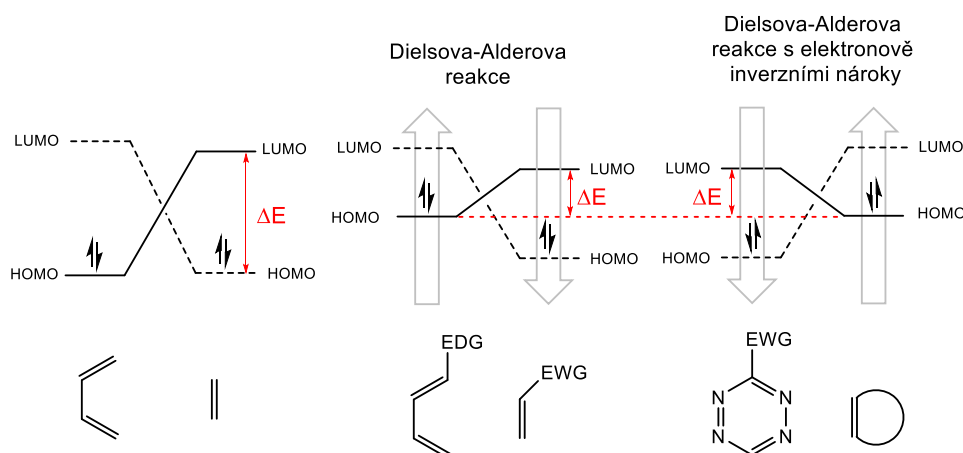
Fluorofenyl estery karboxylových skupin představují alternativu pro tvorbu amidické vazby (Obr. 26) k NHS esterům, která se vyznačuje vyšší stabilitou proti hydrolyze i v mírně bazickém prostředí.¹⁰⁴ Pro snížení hydrofobicity je možné také využít sulfonovaný derivát.¹⁰² Tyto estery se často používají v molekulární biologii pro aktivaci fluoroforů.



Obr. 26. Reakce aktivovaného fluorofenyl esteru s aminem.

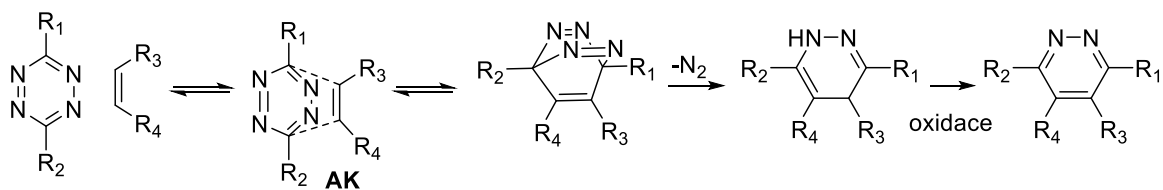
2.3.8 Dielsova-Alderova reakce s inverzními elektronovými nároky (IEDDA)

Snaha nalézt dostatečně rychlou ligační reakci, která by nevyžadovala katalýzu kovovými ionty a umožňovala skutečně bioortogonální značení, vedla k vývoji reakcí označovaných jako Dielsova-Alderova reakce s inverzními elektronovými nároky (IEDDA). Zatímco klasická Dielsova-Alderova reakce (DA) je usnadněna posunutím HOMO dienu elektron-donujícími skupinami blíže k LUMO dienofilu, u IEDDA interaguje naopak LUMO dienu (obvykle tetrazinu) s HOMO dienofilu (Obr. 27).¹⁰⁵



Obr. 27. Rozdíl v energetických a elektronových stavech neutrálního dienu a dienofilu (vlevo), reaktantů Dielsovy-Alderovy reakce (uprostřed) a reaktantů Dielsovy-Alderovy reakce s inverzními elektronovými nároky (vpravo). Podle lit.¹⁰⁵

Klasická Dielsova-Alderova reakce může často probíhat i zpětně (*retro*-DA). V průběhu IEDDA reakce s tetrazinou však dochází k nevratné eliminaci molekuly dusíku (Obr. 28), čímž je zajištěna její jednosměrnost.¹⁰⁶

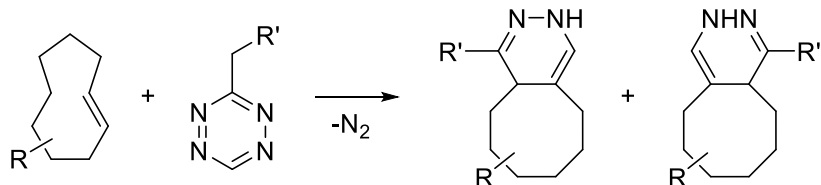


Obr. 28. Reakční mechanismus IEDDA. Podle lit.¹⁰⁷

U tohoto typu reakcí bylo také pozorováno výrazné zvýšení (i o několik řádů) reakční rychlosti ve vodném prostředí, což se vysvětluje stabilizací aktivovaného komplexu (Obr. 28 AK).¹⁰⁵

2.3.8.1 *trans*-cyklookteny

Reakce tetrazinů s pnutými *trans*-cyklookteny (sTCO) představuje jednu z nejrychlejších bioortogonálně využitelných reakcí (reakce druhého řádu až $k_2 = 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$).¹⁰⁸ Určitou překážkou v jejich využití je větší náročnost jejich přípravy a menší stabilita, v organismu u nich také může docházet k Michaelovské adici cysteinových thiolů nebo jimi katalyzované izomerizaci z *trans* na *cis*.⁵⁰

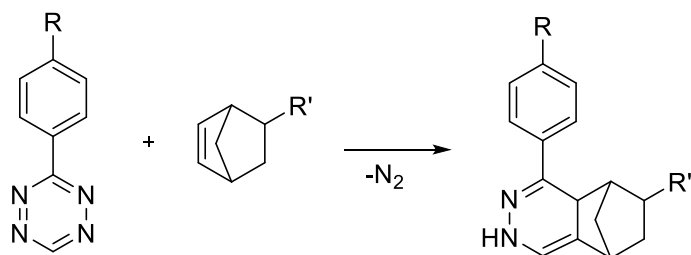


Obr. 29. Reakce tetrazinu s *trans*-cyklooktenem.

2.3.8.2 Norborneny a cyklopropeny

Norborneny se vyznačují dobrou stabilitou a dostatečnou reaktivitou, zároveň jsou poměrně dobře synteticky dostupné. Při jejich reakci s tetraziny nebyla pozorována téměř žádná regiosektivita (Obr. 30).¹⁰⁶

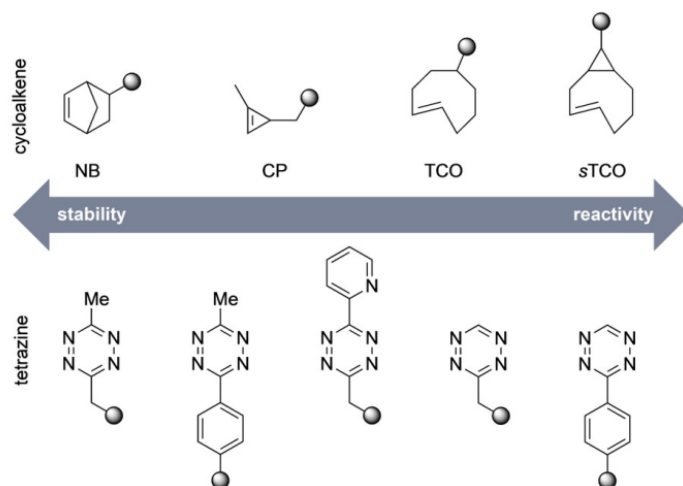
Výhodou cyklopropenů (Obr. 31 CP) je jejich malá velikost, díky které méně, oproti větším a lipofilnějším TCO a norbornenům, ovlivňují metabolismus molekuly, do které jsou zavedeny.⁵⁰



Obr. 30. Reakce norbornenu s tetrazinem.

2.3.8.3 Tetraziny

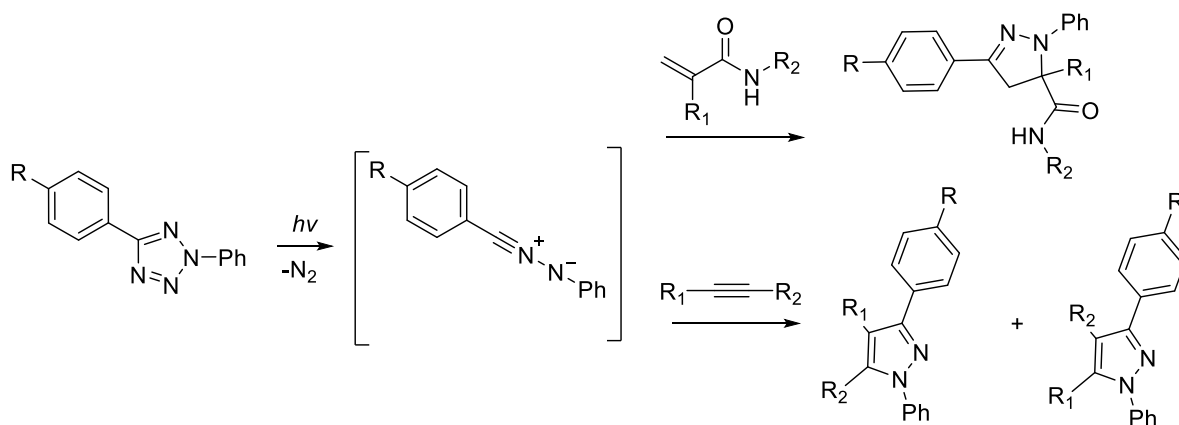
Reaktivitu a stabilitu tetrazinů je možné poměrně dobře ladit charakterem substituentů, především jejich elektron-donorovou charakteristikou. Zvýšená reaktivita vůči dienofilu jde ruku v ruce se sníženou celkovou stabilitou (Obr. 31).¹⁰⁵



Obr. 31. Srovnání reaktivity a stability reaktantů IEDDA – pnutých alkenů (nahore) a tetrazinů (dole). Převzato z lit.⁵⁰

2.3.9 Iminonitrily

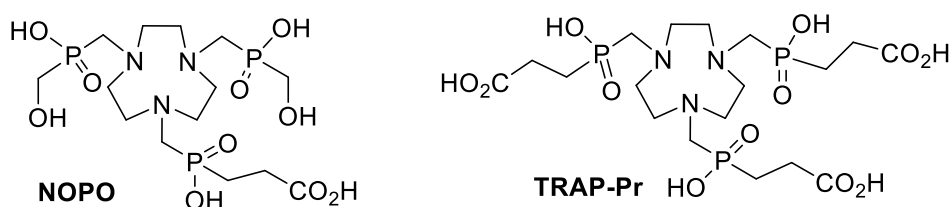
Aromaticky substituované tetrazoly podléhají působením UV záření o vlnové délce kolem 300 nm fotolýze za uvolnění molekuly dusíku a vzniku dipolárního iminonitrilu. Tento intermediát může reagovat 1,3-dipolární cykloadicí s dipolarofilním akrylonitrilem na příslušný pyrazolin¹⁰⁹ nebo s alkyne s elektron-odtahujícími skupinami na pyrazoly (Obr. 32). V druhém případě však vzniká směs obou regioizomerů. Výchozí tetrazoly jsou poměrně snadno synteticky dostupné přes reakci aryldiazoniové sole s tosylhydrazony či reakcí arylnitrilů s azidem sodným.¹¹⁰ Rychlost reakce iminonitrilu s dipolarofilem je vysoká ($k_2 = 11,0 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ pro reakci druhého řádu s akrylamidem).¹⁰⁹ Přestože mají tyto formy ligace řadu omezení (nižší výtěžky, neúplná ortogonalita, omezení v substituentech substrátů) a nedosáhly širšího uplatnění, nabízí se u nich zajímavá možnost selektivní aktivace zářením jen v určitém omezeném prostoru.



Obr. 32. Fotolýzou aromatických tetrazolů vzniká reaktivní iminonitril, který může reagovat s akrylamidem na pyrazolin¹⁰⁹ (nahore) nebo s alkyne na pyrazol¹¹⁰ (dole).

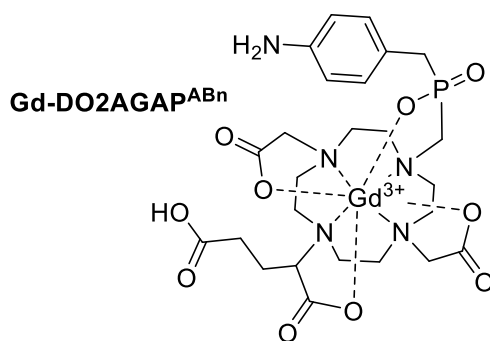
3 Cíle práce

V prvním projektu této práce byla cílem příprava a studium vlastností bifunkčního ligandu pro ^{68}Ga , se strukturou odvozenou od již dříve osvědčeného motivu TRAP-Pr (Obr. 33 vpravo).¹¹¹ Ligand je založený na devítičlenném makrocyklu TACN opatřeném třemi fosfinátovými rameny. Nově navrhovaný ligand NOPO by měl nést pouze jednu karboxylovou skupinu pro připojení cílicího peptidu přes amidovou vazbu. Pro zbylá dvě pendantní ramena byla zvolena hydrofilní hydroxymethylová funkční skupina (Obr. 33 vlevo). V rámci syntézy bylo cílem vyvinout optimální metodu přípravy a separace zejména s ohledem na potlačení reduktivní methylace v procesu připojování fosfinátového pendantního ramene a odstranění jejího vedlejšího produktu. V rámci další spolupráce měly být ověřeny vlastnosti důležité pro potenciální použití ligandu jako nosiče nuklidu ^{68}Ga pro PET zobrazení, tedy určení konstanty stability komplexu s Ga^{3+} , rychlosti komplexace za různých teplot a při různém pH a selektivity komplexace Ga^{3+} iontů v přítomnosti dalších interferujících kovových iontů. Pro tuto spolupráci bylo cílem připravit konjugáty ligandu s cílicími peptidy a tyto konjugáty následně otestovat po komplexaci ^{68}Ga jako radiodiagnostika.



Obr. 33. Vlevo: nově navržený ligand; vpravo: dříve připravený ligand s třemi karboxylovými skupinami.

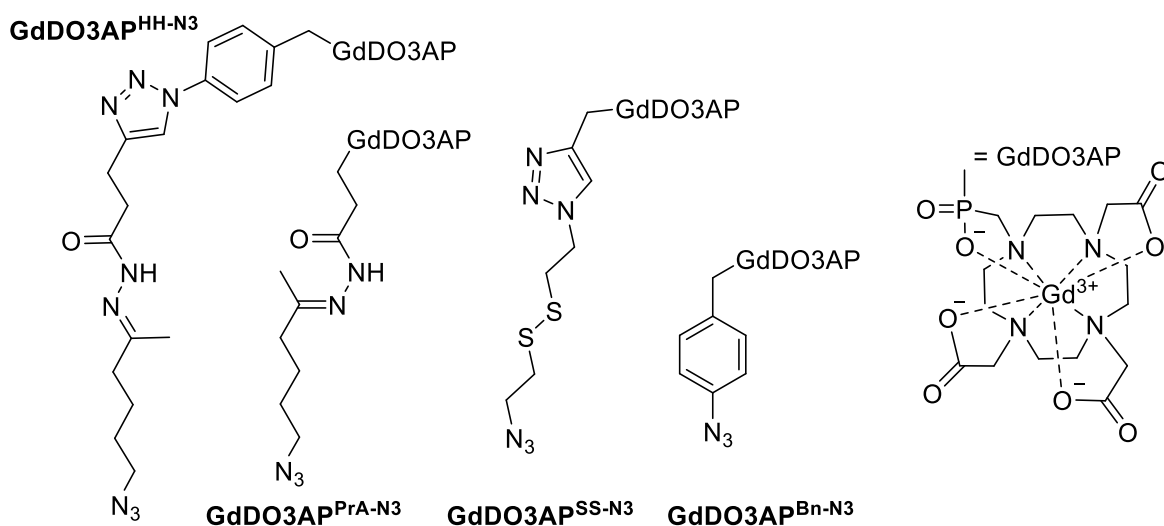
V dalším projektu bylo cílem připravit ligand a jeho komplex s Gd^{3+} (Obr. 34) s potenciálním použitím jako bifunkční či multimodální MRI kontrastní látka a ověřit tyto možnosti využití. Pro ligand byl vybrán základní skelet z cyklu se třemi karboxylovými a jedním fosfinátovým pendantním ramenem. To bylo zvoleno proto, že podle předchozích studií zvyšuje rychlost výměny vody na centrálním iontu Gd^{3+} a tím i relaxivitu.⁴³ Dále bylo cílem připravit konjugát tohoto Gd^{3+} komplexu s cílicím peptidem a fluorescenčním barvivem. V navazující spolupráci měly být změřeny hodnoty relaxivity komplexů pro různé intenzity magnetického pole a ověření možnosti použití konjugátu komplexu s peptidem jako cílené MRI kontrastní látky na živém modelu.



Obr. 34. Gd^{3+} komplex navrženého ligandu jako potenciální bifunkční MRI kontrastní látka.

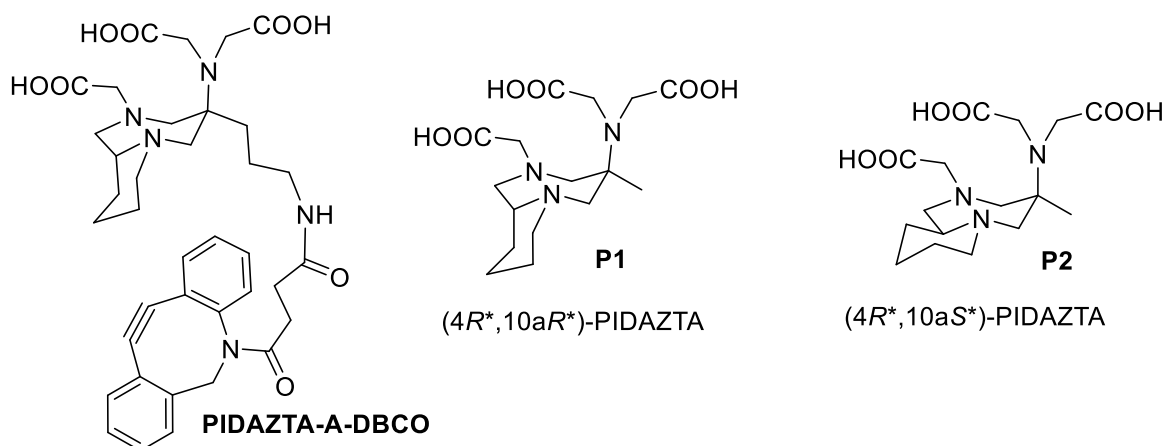
Ve třetím projektu bylo cílem ověřit koncept konstrukce nanosond na bázi fluorescenčních nanodiamantů pro snímání chemických kvalit okolního prostředí se submikrometrovým rozlišením. Protože je fluorescence nanodiamantů ovlivněna magnetickým polem, byly navrženy komplexy paramagnetických iontů se štěpitelnými spojkami (Obr. 35), které by v závislosti na sledovaných

kvalitách okolí (pH a redoxní potenciál) uvolňovaly původně vázané Gd^{3+} komplexy z povrchu nanodiamantů, což by se následně dalo odečíst jako změna fluorescence. Konec všech navržených spojek by měl nést azidovou funkční skupinu a umožňovat připojení na povrch nanodiamantu pomocí CuAAC reakce s terminálním alkyne. Pro sledování pH byla navržena hydrazid-hydrazonová spojka labilní v kyselém prostředí a pro sledování redoxního potenciálu byla vybrána disulfidická spojka, která se štěpí glutathionem (GSH). Na dalších spolupracujících pracovištích pak měly být připravené bifunkční komplexy konjugovány k polymeru pokrývajícím povrch nanodiamantů a celý koncept nanosond měl být experimentálně ověřen.



Obr. 35. Komplexy $GdDO3AP^{HH-N3}$ a $GdDO3AP^{PrA-N3}$ (první a druhý zleva) s hydrazid–hydrazonovou spojkou štěpitelnou v kyselém prostředí; komplex $GdDO3AP^{SS-N3}$ (třetí zleva) se disulfidickou spojkou štěpitelnou v redukčním prostředí a komplex $GdDO3AP^{Bn-N3}$ (čtvrtý zleva) s neštěpitelnou spojkou sloužící jako kontrola.

V posledním projektu byla cílem příprava bifunkčního ligandu pro komplexaci PET radionuklidu $^{68}Ga^{3+}$. Základní stavba navrženého ligandu byla odvozena od ligandu PIDAZTA a měla nést motiv pnutého cykloalkynu pro bioortogonální konjugaci přes SPAAC (Obr. 36). Navržený ligand obsahuje dvě chirální centra, která tvoří dva diastereoizomery. Podle studie vzorového ligandu PIDAZTA se dalo předpokládat, že jeden z diastereoizomerů bude mít výrazně vyšší konstantu stability¹¹² a tak bylo cílem tento diastereoizomer oddělit a cílový bifunkční ligand připravit pouze z něj.



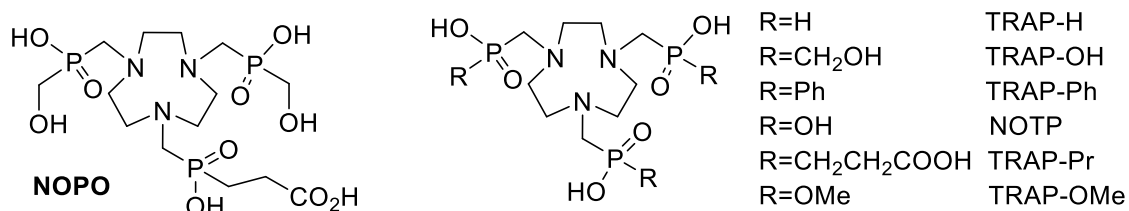
Obr. 36. Vlevo: navržený ligand s pnutým cykloalkyem; uprostřed: P1 diastereoizomer ligandu PIDAZTA s vyšší konstantou stability pro Ga^{3+} komplex, vpravo: P2 diastereoizomer s cca tisíckrát nižší konstantou stability.¹¹²

4 Diskuze získaných výsledků

4.1 Deriváty triazacyklononanu pro komplexaci ^{68}Ga

První projekt této práce, jehož výsledky jsou součástí publikací uvedených v Apendixech A–C, se zabýval přípravou a studiem ligandu (NOPO) určeného primárně pro vázání PET nuklidu ^{68}Ga .

Navazoval na předchozí studie zabývající se deriváty TACN se třemi stejnými pendantními rameny (TRAP, Obr. 37) tvořenými fosfinovými/fosfonovými kyselinami.¹¹³



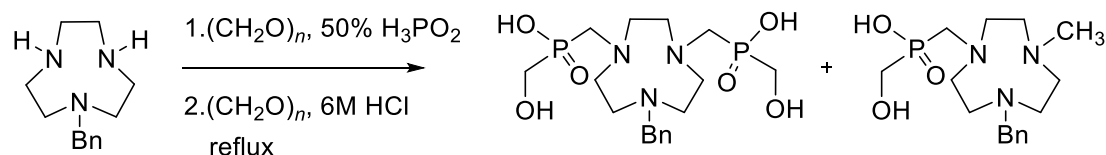
Obr. 37. Vlevo: nově připravený ligand s jednou karboxylovou skupinou; vpravo: série TRAP ligandů se třemi stejnými fosfinátovými/fosfonátovými pendantními rameny.¹¹³

Ty prokázaly rychlou a stabilní komplexaci Ga^{3+} s vysokými konstantami stability, např. $[\text{Ga}(\text{TRAP-Pr})]^{3-}$ ($\log K = 26,24$).¹¹⁴ Tato hodnota je sice poněkud nižší než pro ligand NOTA (Obr. 8), což je běžně používaný derivát TACN se třemi karboxylátovými pendantními rameny ($\log K = 29,6$),¹¹³ ale stále výborně použitelné pro *in vivo* aplikace.

Bifunkční TRAP-Pr s karboxylovými skupinami posloužil dále pro přípravu konjugátů vždy se třemi stejnými peptidy vázanými na jednu molekulu ligandu. Vzniklé konjugáty byly použity jako cílená PET sonda.^{111,115}

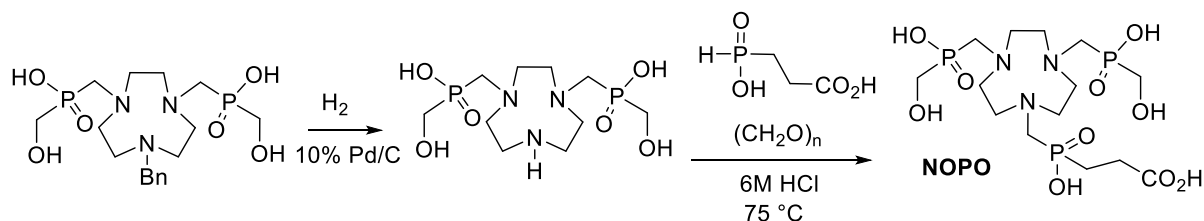
Tato trimerizace může výrazně zvyšovat vázání na některé typy buněčných receptorů, jako jsou některé integriny, ale u jiných nemusí být žádoucí.^{116,117} Proto byl navržen ligand rovněž se třemi pendantními fosfinátovými rameny, ale jen s jednou karboxylovou funkční skupinou určenou k navázání peptidu.

Syntéza tohoto ligandu vychází z TACN s jedním atomem dusíku chráněným benzylovou funkční skupinou. Ten je nejprve variantou Moedritzerovy-Iraniho reakce alkylován methylenfosfinovou kyselinou, která je následně nadbytkem formaldehydu převedena na skupinu methylen(hydroxomethyl)fosfinovou (Obr. 38). V průběhu této reakce dochází také ke konkurenční reduktivní aminaci formaldehydu, kde fosfinová sloučenina s P–H vazbou funguje jako redukční činidlo. Reakci je proto potřeba optimalizovat s ohledem na to, že vysoké teploty favorizují reduktivní aminaci, ale při nízkých teplotách neprobíhá vznik žádoucích N–C–P vazeb dostatečně rychle.



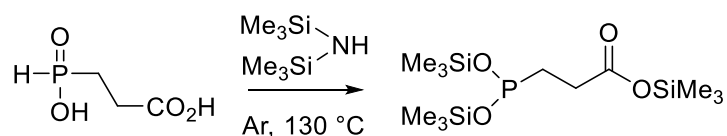
Obr. 38. Zavedení hydroxymethylfosfinátových pendantních ramen za konkurenčního vzniku *N*-methylovaného vedlejšího produktu.

Následně byl produkt se dvěma fosfinátovými rameny chromatograficky separován a debenzylován. Na uvolněný sekundární amin byla připojena methylen(2-karboxyethyl)fosfinová kyselina opět pomocí Moedritzerovy-Iraniho reakce (Obr. 39). Methylovaný vedlejší produkt byl tentokrát oddělen na sloupci s kationtovým iontoměničím, kde se finální produkt NOPO díky třem silně kyselým fosfinátovým funkčním skupinám nezachycuje.



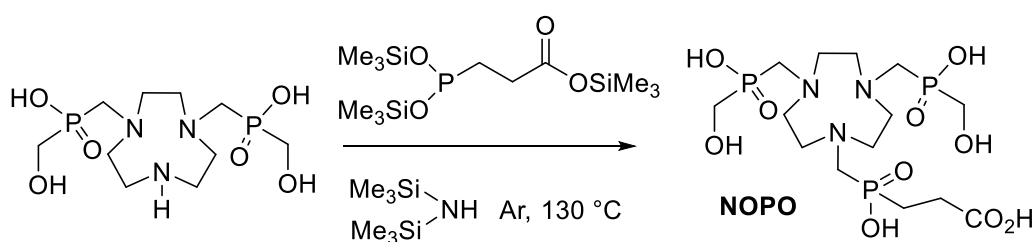
Obr. 39. Odchránění a připojení 2-karboxyethylfosfinátového pendantního ramene.

Všechny reakční kroky, kromě posledního, vykazují vysoké výtěžky (přes 90 %). V posledním kroku však kyselina 2-karboxyethylfosfinová reaguje s aminem obtížněji než kyselina fosforová v prvním kroku a vzniká značné množství na cyklu methylovaného vedlejšího produktu. Proto byla zkoušena alternativní varianta posledního kroku syntézy, kdy byla 2-karboxyethylfosfinová kyselina nejprve silylována (Obr. 40).



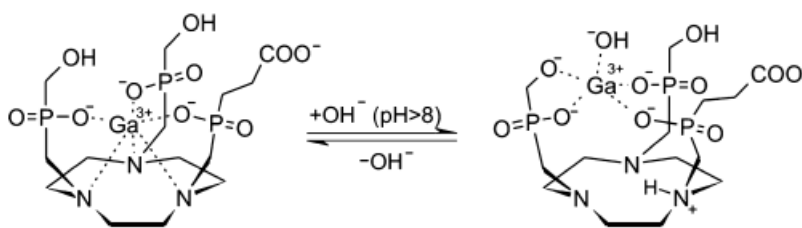
Obr. 40. Trimethylsilylace 2-karboxyethylfosfinové kyseliny.

S takto vzniklým trimethylsilyl-esterem pak byl uskutečněn poslední krok syntézy NOPO (Obr. 41). Po hydrolyze a separaci na kationtovém iontoměničím byl však ligand NOPO získán v téměř stejném výtěžku jako původní cestou – přibližně 50%, přičemž cesta přes silyl-ester fosfinové kyseliny vyžaduje práci v inertní atmosféře a vyšší teploty a proto nebyla dále využívána. Mohla by však představovat vhodnou volbu pro sloučeniny citlivé na kyselé prostředí.



Obr. 41. Připojení 2-karboxyethylfosfinátového pendantního ramene alternativní cestou.

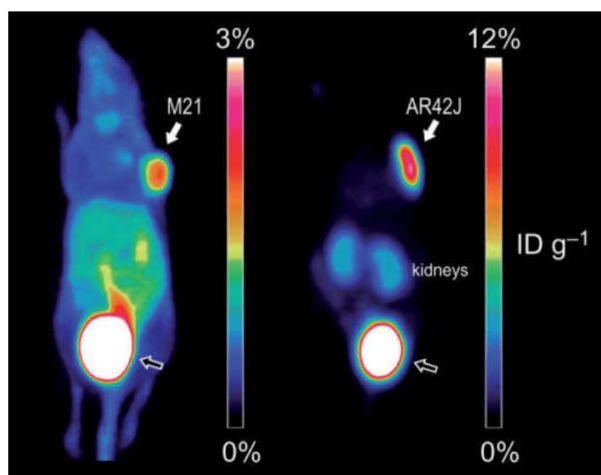
U nově připraveného ligandu NOPO a jeho komplexu s Ga^{3+} byly provedeny potenciometrické a ^{31}P NMR titrace a byla stanovena konstanta stability $[\text{Ga}(\text{NOPO})]^{3-}$ ($\log K = 25,01$) a protonizační konstanty jednotlivých stupňů. Na základě výsledků těchto titrací a DFT výpočtů byly navrženy dvě formy komplexu (Obr. 42) Ga-NOPO pro různá pH. Při nízkých a neutrálních pH jsou na ion Ga^{3+} koordinovány atomy dusíku makrocycly a atomy kyslíku fosfinátových skupin. Při pH nad 8 dochází ke koordinaci hydroxylového aniontu z prostředí a dusíkové atomy koordinovány nejsou.



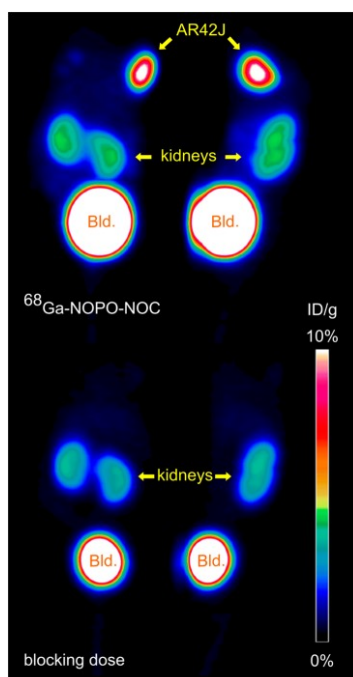
Obr. 42. Předpokládané formy komplexu Ga-NOPO, navržené na základě ^{31}P NMR a potenciometrický dat a DFT kalkulací; vlevo: „in cage“ komplex stabilní při nižším pH; vpravo: „out of cage“ komplex převažující v bazickém prostředí. Převzato z lit.³

Byly provedeny experimenty se značením NOPO ligandu pomocí ^{68}Ga obsaženém v eluátu z $^{68}\text{Ga}/^{68}\text{Ge}$ generátoru a to i za přítomnosti ionů Fe^{3+} a Zn^{2+} . Iony Fe^{3+} se v eluátu mohou vyskytnout z matrice generátoru nebo z příslušenství použitým k jeho obsluze, $^{68}\text{Zn}^{2+}$ se v eluátu nevyhnutelně vyskytuje jako rozpadový produkt ^{68}Ga . Bylo zjištěno, že i při 10 násobném stechiometrickém nadbytku Zn^{2+} nebo 3,3 násobném nadbytku Fe^{3+} oproti ligandu NOPO dochází k téměř kvantitativní komplexaci ^{68}Ga .

Použitelnost ligandu NOPO v praxi byla demonstrována konjugací s cílicími peptidy, komplexací s ^{68}Ga a PET zobrazením po aplikaci do pokusného zvířete (Obr. 43) s nádory exprimujícími receptory pro cílicí proteiny. Specifičnost značení vazbou cílicího peptidu byla ověřena vysycením vazebných míst na nádoru stejnou kontrastní látkou, jen s přírodním (neradioaktivním) Ga^{3+} před podáním radioaktivní varianty, což vedlo ke kompletnímu vymizení signálu z oblasti s nádorem (Obr. 44).

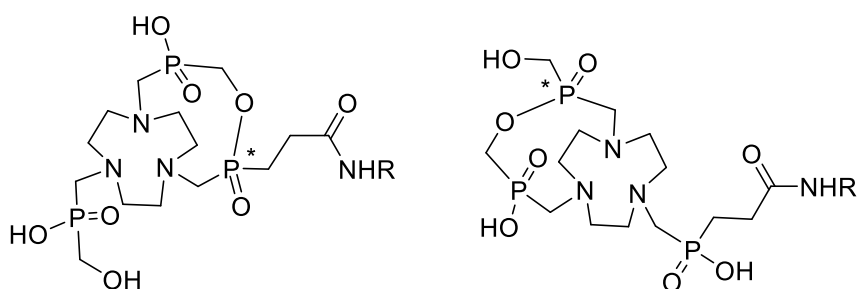


Obr. 43. PET snímky (MIP, 75 min p.i) nahých myší s implantovanými nádory; levá část: ^{68}Ga -NOPO-RGDfK (M21 lidský melanom); pravá část: ^{68}Ga -NOPO-NOC (AR42J krysí pankreatický karcinom). Akumulace aktivity v močovém měchýři díky renální exkreci je označena černou šipkou. Převzato z lit.¹



Obr. 44. PET snímky (MIP, 75 min p.i) nahých myší s implantovanými nádory AR42J (kryší pankreatický karcinom) (vlevo – dorzálně, vpravo – sagitálně); nahoře: ^{68}Ga -NOPO-NOC; Dole: ^{68}Ga -NOPO-NOC + blokující dávka ^{nat}Ga -NOPO-NOC 5 mg/kg živé váhy (Bld. označuje močový měchýř). Převzato z lit.³

V procesu konjugace NOPO s aminy pomocí běžně používaných aktivačních činidel jako je HATU, TBTU či EDC byl pozorován vznik intramolekulárního esteru fosfinové kyseliny (Obr. 45 vlevo). Ten byl provázen tvorbou nového chirálního centra na atomu fosforu pendantního ramene karboxyethylfosfinové kyseliny. V případě použití jednoho enantiomeru chirálního aminu (L-aminokyseliny) vznikaly dva diastereoizomery ve stejném zastoupení. Teoreticky je možný vznik dvou regioizomerů interního esteru (Obr. 45). Na základě ^{31}P NMR měření však byl vznik esteru mezi hydroxomethylfosfinovými rameny (Obr. 45 vpravo) pozorován jen v přítomnosti méně než stechiometricky ekvivalentního množství aminu.



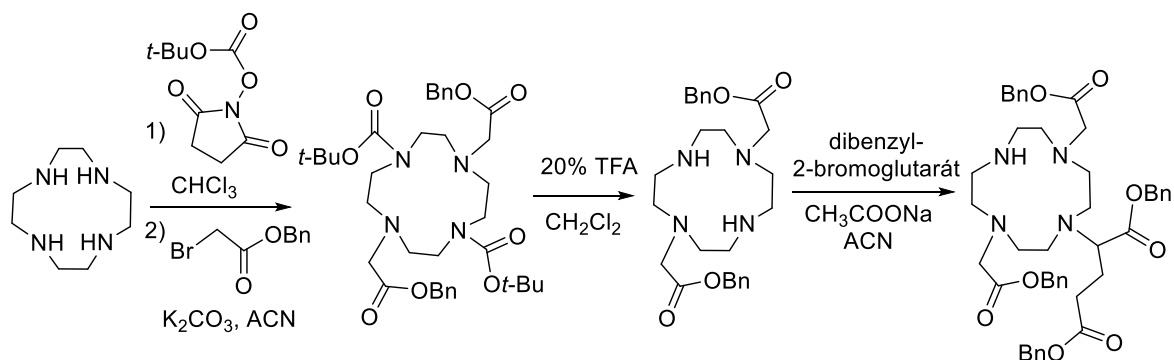
Obr. 45. Vlevo: fosfilakton vznikající při standardních podmínkách značení; vpravo: druhý možný izomer fosfilaktonu, který vzniká pouze při použití substechiometrického množství aminu.

Nicméně konjugát peptidu s laktonem NOPO je možné ke značení ^{68}Ga použít, protože v průběhu komplexace Ga^{3+} dochází zároveň ke štěpení laktonu. Pokud by však přítomnost laktonu byla na překážku, například kvůli přesné definici složení farmaceutického preparátu, je možné jej snadno hydrolyzovat například vodným roztokem TFA při 25 °C, tedy způsobem často používaným i pro finální odchránění syntetizovaných peptidů. Případně se lze jeho vzniku vyhnout použitím komplexu Zn -NOPO místo volného ligandu. V tomto případě při konjugaci lakton nevzniká a ion Zn^{2+} je možné při následném značení snadno nahradit $^{68}\text{Ga}^{3+}$.

4.2 Bifunkční ligandy pro bimodální MRI a optické zobrazování

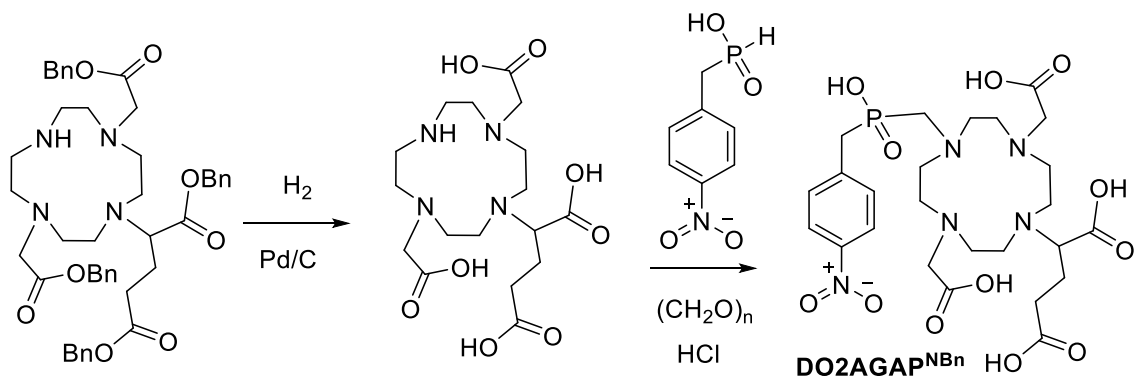
V dalším projektu této práce byly navrženy a připraveny makrocyclické bifunkční ligandy pro komplexaci Gd^{3+} s potenciálním využitím jako MRI kontrastní látky a možností vázat cílicí peptidy a další funkční molekuly. Výsledky tohoto projektu byly součástí publikace uvedené v Appendixu D.

Syntéza ligandu vycházela z cyklenu, který byl nejprve regioselektivně ochráněn a následně alkylován v *trans* polohách podle popsaných postupů.^{118,119} Zavedení třetího pendantního ramene (Obr. 46) neprobíhalo i přes pečlivou kontrolu podmínek zcela selektivně a vznikalo menšího množství tetraalkylovaného cyklenu, který musel být odstraněn.



Obr. 46. Regioselektivní zavedení chránících skupin a karboxylových pendantních ramen.

Následně byly karboxylové skupiny ligandu ochráněny reductivní debenzylací a na produkt bylo zavedeno fosfinátové pendantní rameno za podmínek Moedritzerovy-Iraniho (Obr. 47) reakce. Po separaci na iontoměničích byl získán první ze dvou cílových ligandů, $DO2AGAP^{NBn}$.

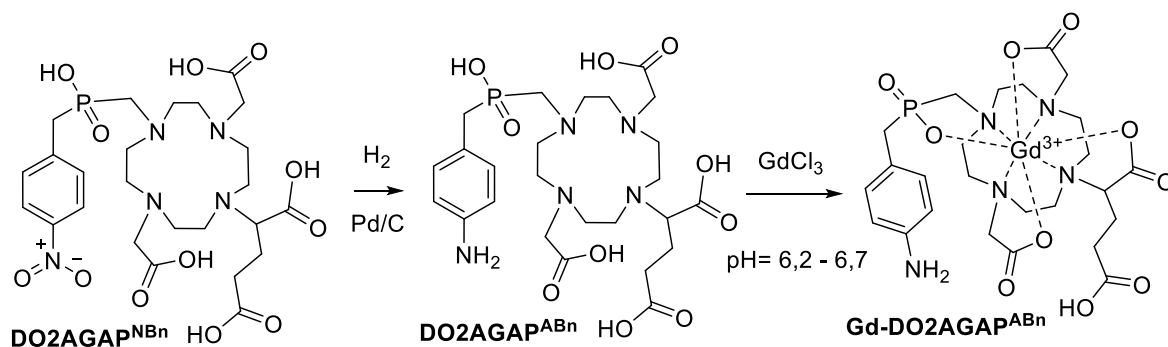


Obr. 47. Odchránění a připojení fosfinátového pendantního ramene.

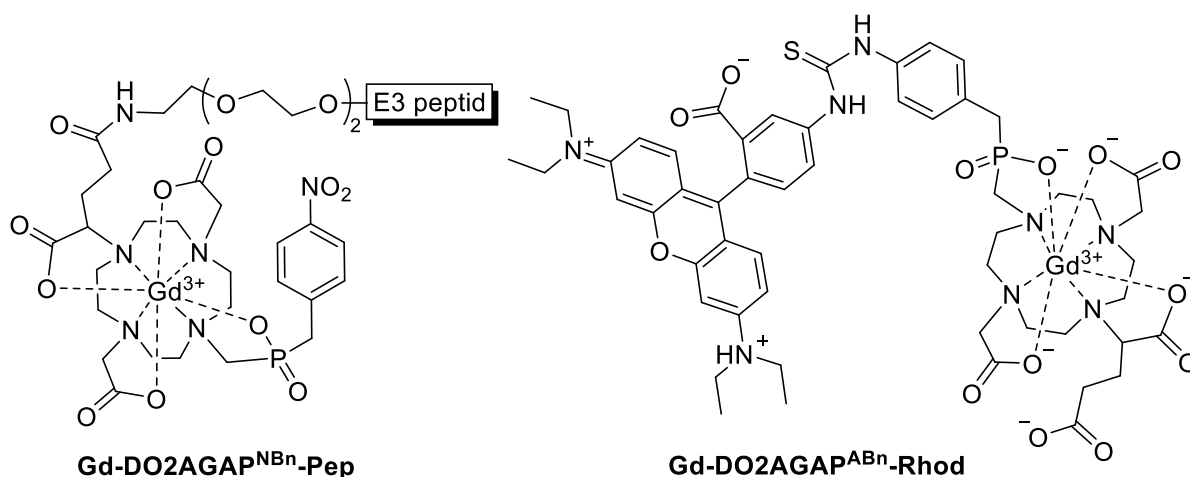
Ten byl z části přímo použit ke komplexaci Gd^{3+} iontů a následné konjugaci s hexapeptidem E3 (Obr. 49), který se selektivně váže na fosfatidylserin, vyskytující se na vnější straně buněčné membrány při apoptóze.

Z části byl připraven komplex s ionty Tb^{3+} , od kterého bylo změřeno ^{31}P NMR spektrum. To poskytl dva signály v poměru intenzit 4:6, které odpovídají zastoupení konformace čtvercového antiprizmatu (SAP) ku zkříženému čtvercovému antiprizmatu (TSAP). Větší zastoupení TSAP izomeru je v dobré shodě s naměřenou vyšší relaxivitou.⁴³

Část ligandu DO2AGAP^{NBn} byla nejprve redukována na arylamin DO2AGAP^{ABn} a po komplexaci Gd³⁺ byl komplex Gd-DO2AGAP^{ABn} (Obr. 48) reagován s rhodamin isothiokyanátem za vzniku bimodální fluorescenční/MRI kontrastní látky (Obr. 49).

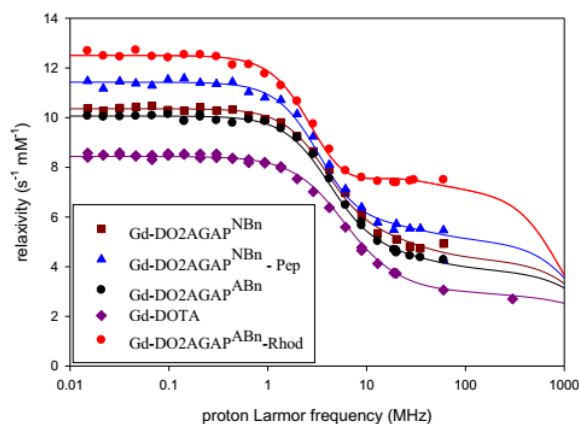


Obr. 48. Redukce nitro-skupiny na amino-skupinu a komplexace Gd³⁺, komplex Gd-DO2AGAP^{ABn} bylo možné dále konjugovat reakcí s rhodaminisothiokyanátem.



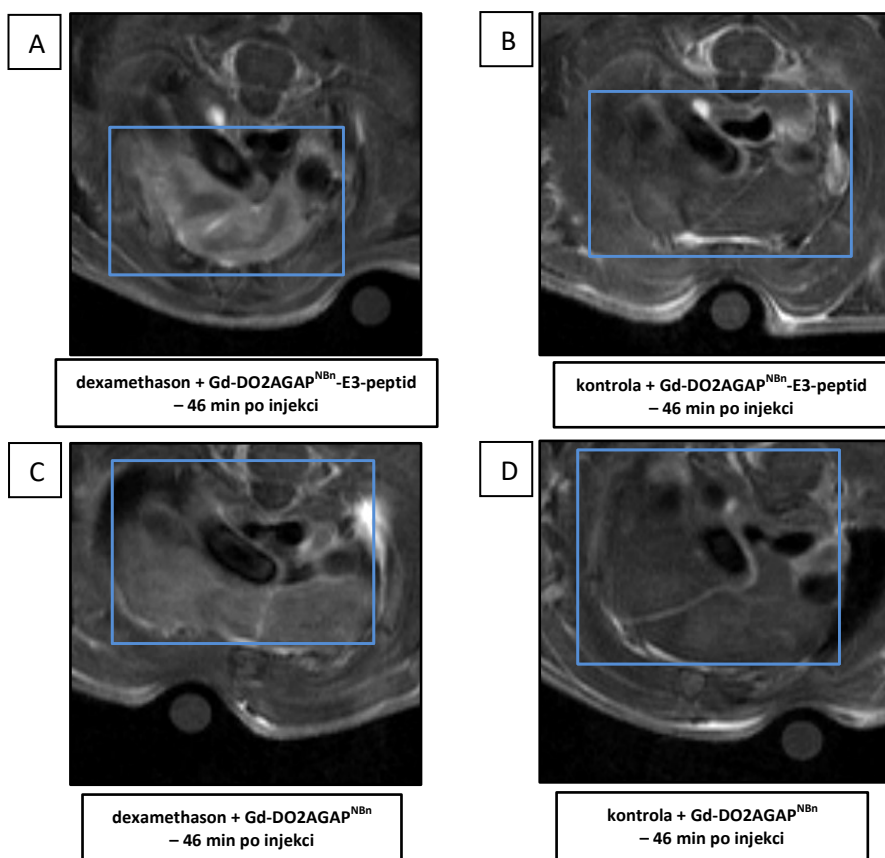
Obr. 49. Finální komplexy konjugované s peptidem E3 (vlevo) a rhodaminem (vpravo).

U Gd³⁺ komplexů byly změřeny hodnoty relaxivity v závislosti na intenzitě magnetického pole (vyjádřené jako Larmorova rezonanční frekvence protonu), které jsou ve všech případech vyšší než standard Gd-DOTA (Obr. 50).



Obr. 50. Srovnání relaxivity Gd³⁺ komplexů derivátů a konjugátů připraveného ligandu a DOTA v závislosti na rezonanční frekvenci protonů (přímo úměrné intenzitě magnetického pole); klinické MRI přístroje využívají frekvence desítek až stovek MHz. Převzato z lit.⁴

Komplex Gd-DO2AGAP^{NBn} byl konjugován s hexapeptidem E3 a tento konjugát pak byl použit jako MRI kontrastní látka, která selektivně zvýraznila na MRI snímku kůru brzlíku pokusné myši, ve které byla indukována apoptóza podáním dexamethasonu (DEX). Zvýraznění nebylo pozorováno u nekonjugovaného Gd-DO2AGAP^{NBn} ani u kontrol bez indukované apoptózy (Obr. 51).

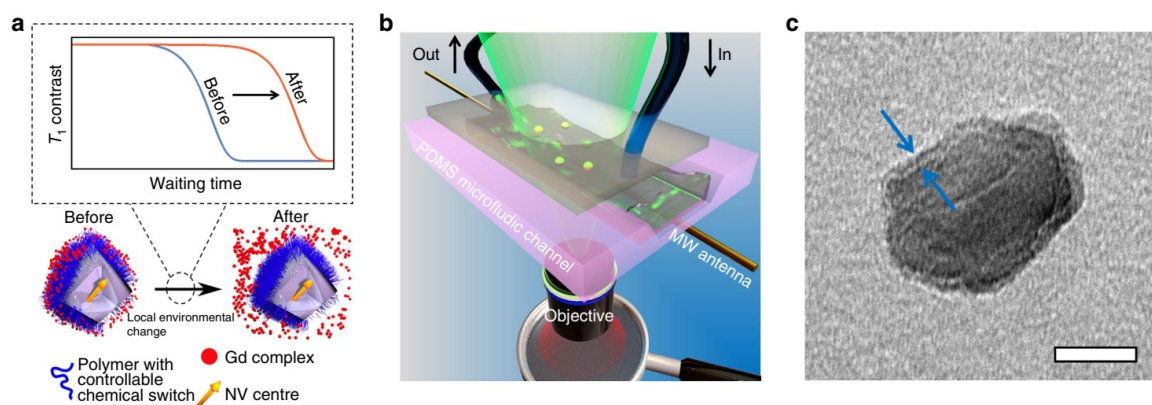


Obr. 51. MRI zobrazení s označením brzlíku (modrý obdélník) 46 minut po injekci (200 μ mol Gd/kg): A) Gd-DO2AGAP^{NBn}-E3pep v myši, u které byl podán DEX; B) Gd-DO2AGAP^{NBn}-E3pep v kontrolní myši; C) Gd-DO2AGAP^{NBn} v myši u které byl podán DEX; D) Gd-DO2AGAP^{NBn} v kontrolní myši; pouze u A) je patrné zvýraznění kůry brzlíku. Upraveno z lit.⁴

4.3 Kontrastní látky reagující na změnu vnějších podmínek („smart“)

Dalším využitím Gd^{3+} makrocyclických komplexů byla konstrukce nanosond na bázi povrchově modifikovaných fluorescenčních nanodiamantů (ND). Výsledky tohoto projektu byly součástí publikace uvedené v Apendixu E.

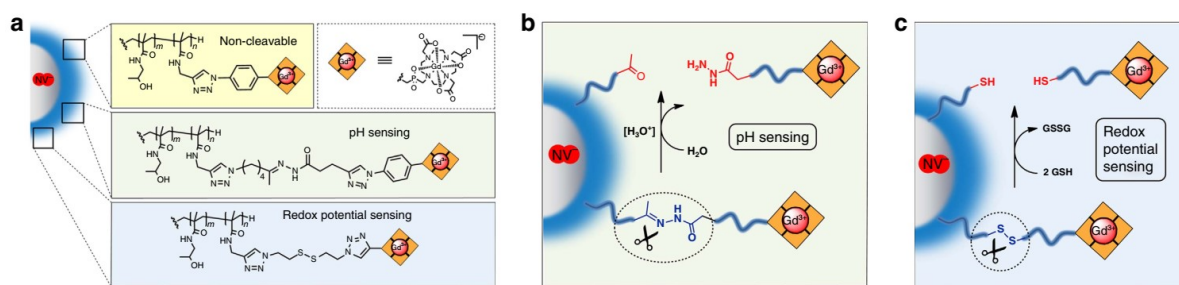
Fluorescence nanodiamantů je daná přítomností párů atom dusíku–vakance (NV) jako poruch v krystalové mřížce s jedním nespárovaným elektronem a je ovlivnitelná magnetickým polem,¹²⁰ například i přítomností paramagnetických iontů v blízkém okolí. Právě toho bylo využito pro konstrukci nanosond schopných reagovat na pH a redukční potenciál. Na povrch ND byly přes specificky štěpitelné spojky navázány komplexy Gd^{3+} , které díky sedmi nespárovaným $4f$ elektronům vykazují silný magnetický moment. Ten způsobuje zkrácení T_1 relaxačního stavu NV center ND (Obr. 52a), který je možné jako snížení intenzity fluorescence odečíst při použití vhodné sekvence excitace laserem a působení radiofrekvenčního pulsu. Pokud dojde k rozštěpení spojky ke Gd^{3+} komplexu a jeho difuzi od ND, projeví se to zvýšením intenzity naměřené fluorescence. Měření bylo prováděno v mikrofluidním kanálu (Obr. 52b), ve kterém byly ND fixovány a omývány proudícím médiem, což usnadňovalo odplavení odštěpených Gd^{3+} komplexů.



Obr. 52. a) Mechanismus snímání změny v prostředí pomocí ND-polymer- Gd^{3+} hybridních nanosenzorů: Gd^{3+} komplexy jsou uvolněny změnou prostředí díky štěpení spojek k ND, úbytek Gd^{3+} je detekován změnou relaxačního času T_1 NV center; b) Schéma experimentální sestavy: polydimethylsiloxanový (PDMS) mikrofluidní kanál (růžově), přívodní a odvodní trubičky pro měření v reálném čase (modře), mikrovlnná anténa (zlatě), optická excitace ND (zeleně) a detekce fluorescence (červeně); c) TEM snímek ND částice s polymerním obalem vyznačeným šipkami, měřítko: 20 nm.⁵

Kvůli vyšší stabilitě v koloidním roztoku a omezení nescifických vazeb s buněčnými proteiny byly ND pokryty (Obr. 52c) polymerní vrstvou poly[(2-hydroxypropyl)methakrylamid]u dekorovanou terminálními alkyňmi¹²¹ kvůli možnosti kovalentního připojení molekul komplexu Gd^{3+} přes triazolovou spojku pomocí CuAAC. Toto spojení je stabilní, neinterferuje se štěpitelnou částí spojky a rychlost a robustnost reakce umožňuje obsazení povrchu ND dostatečným množstvím komplexů.

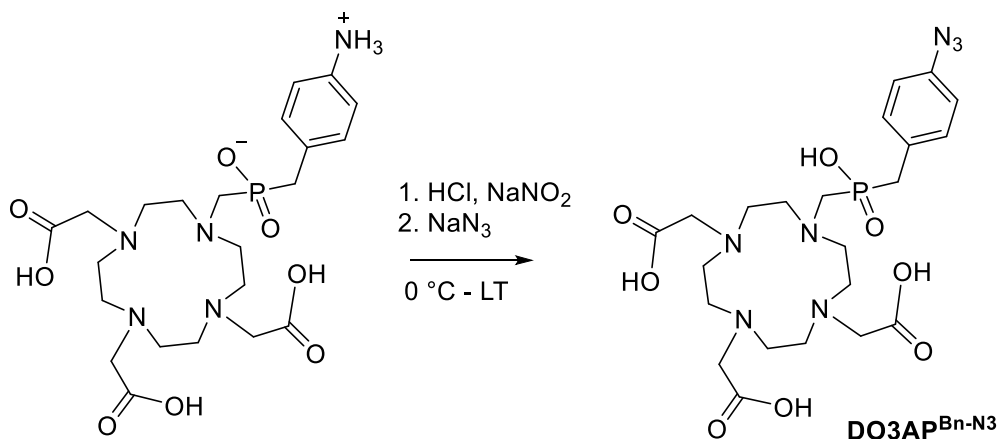
Celkem byly připraveny a na ND navázány Gd^{3+} komplexy na bázi DO3A se třemi typy spojek (Obr. 53a). Neštěpitelná spojka sloužila jako kontrola, zda ke změnám fluorescence nedochází i jiným mechanismem než díky štěpení funkčních spojek. Hydrolýza hydrazid–hydrazonové spojky je urychlována nízkým pH a disulfidická spojka je štěpena redukcí na thioley. V experimentu toho bylo dosaženo přítomností glutathionu (GSH), který je v buňkách přirozeně zastoupen a slouží v nich jako redukční činidlo a ochrana před oxidativním stresem.



Obr. 53. a) komplex Gd^{3+} se štěpitelnou spojkou použitý pro snímání redoxního potenciálu (dole), pH (uprostřed) a referenční s pevnou spojkou (nahore) a jejich vazba na ND; b) štěpení hydrazonové spojky při nižším pH; c) štěpení disulfidické spojky v redukčním prostředí. Převzato z lit.⁵

Syntéza komplexů vychází z postupů poprvé popsanych v autorově diplomové práci,¹²² které bylo nutné optimalizovat. Jejich původním určením byly stavební prvky pro syntézu MRI kontrastních látek, proto obsahují pendantní rameno s fosfinovou kyselinou, která urychluje výměnu koordinované vody a tím zvyšuje relaxivitu.⁴³ Stejný účel, zvýšení relaxivity, sledovala i volba krátkých a rigidních pendantních ramen, které umožňují spojení triazolovou spojkou, která je sama krátká a rigidní a po připojení na cílovou molekulu se zvyšuje rotační korelační čas molekuly kontrastní látky.⁴⁵ Zatímco krátká vzdálenost zvyšuje magnetické působení mezi Gd^{3+} ionem v komplexu a NV centrem, rychlost výměny vody se v této aplikaci nijak neuplatňuje.

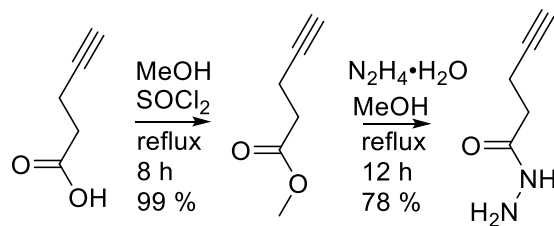
Ligand s neštěpitelnou spojkou byl připraven z dříve syntetizovaného¹²³ derivátu DO3A s 4-aminobenzoyl fosfinovou kyselinou v pendantním rameni. Tento aromatický amin byl v předchozích pracích použit například pro připojení na cyclodextrin přes thiomocovinovou spojkou.¹²⁴ V tomto projektu byl převeden přes diazoniovou sůl na arylazid (Obr. 54, $DO3AP^{Bn-N3}$). U tohoto ligandu a jeho komplexů byl kvůli přítomnému arylazidu pozorován rozklad při dlouhodobějším působením světla.



Obr. 54. Syntéza ligandu s neštěpitelnou spojkou přes diazoniovou sůl.

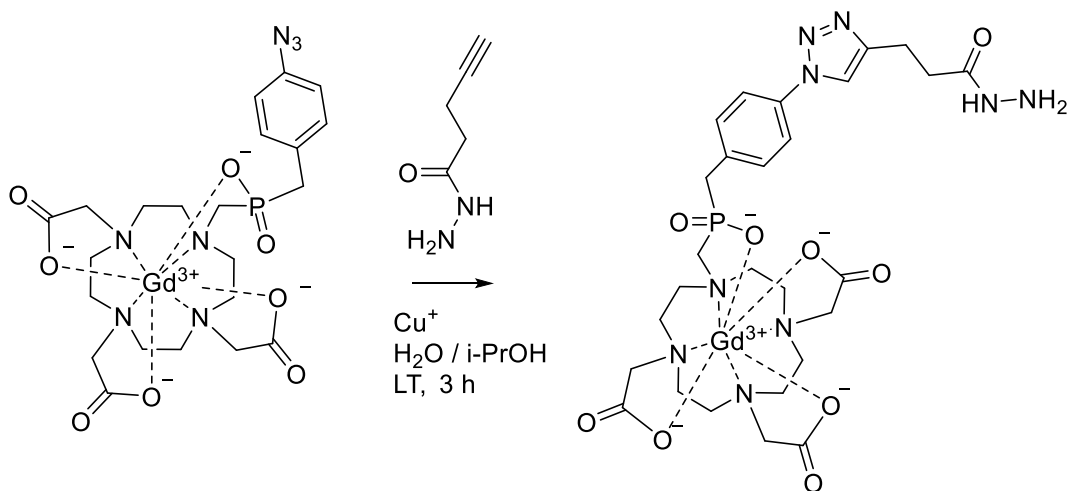
Z tohoto ligandu ($DO3AP^{Bn-N3}$) byl vytvořen Gd^{3+} komplex následně použitý pro neštěpitelné připojení k nanodiamantům pomocí CuAAC. Díky kinetické stabilitě Gd^{3+} komplexu nebyla pozorována žádná transmetalace ionty mědi.

Stejný komplex byl výchozím materiálem pro variantu se spojkou štěpitelnou při nízkém pH. Nejprve byl pro její syntézu připraven pent-4-ynhydrazid (Obr. 55) podle popsaného postupu.¹²⁵



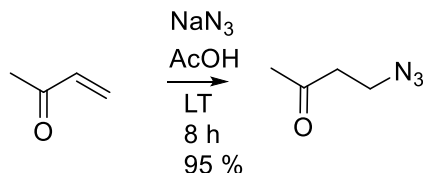
Obr. 55. Syntéza pent-4-ynhydrazidu přes methylester pent-4-ynové kyseliny.

Ten byl následně navázán na Gd^{3+} komplex pomocí CuAAC (Obr. 56).



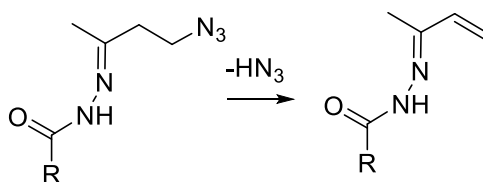
Obr. 56. Připojení hydrazidové funkční skupiny na komplex.

Samotná hydrazin–hydrazonová spojka byla nejprve syntetizována ze snadno připravitelného 4-azido-butan-2-onu (Obr. 57).¹²⁶



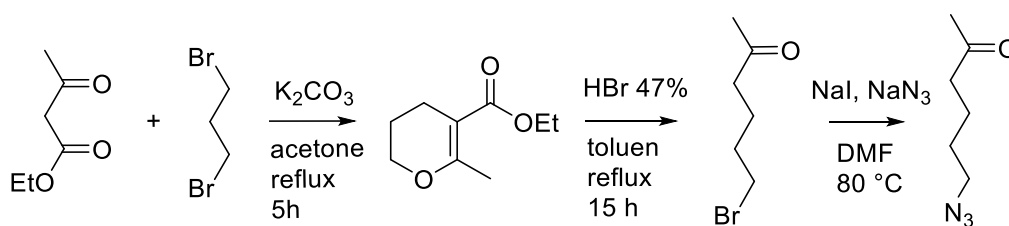
Obr. 57. Syntéza 4-azido-butan-2-onu adicí azidovodíku.

V průběhu separace však vždy docházelo k rozkladu. Rozkladný produkt pak svojí molekulovou hmotností odpovídal zpětné eliminaci azidovodíku, což je pravděpodobně usnadněno vznikem konjugované dvojné vazby.



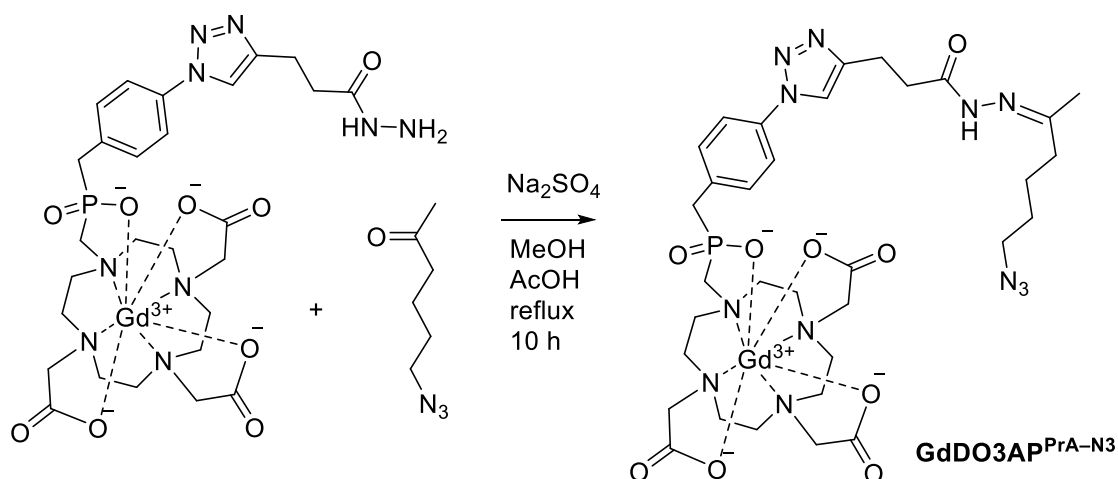
Obr. 58. Pozorovaný rozklad azido hydrazid-hydrazonu.

Proto byla syntetizována výsledná spojka z 6-azido-hexan-2-onu, který byl připraven (Obr. 59) analogicky k postupu z lit.¹²⁷ z 6-bromo-hexan-2-onu, připraveného podle lit.¹²⁸



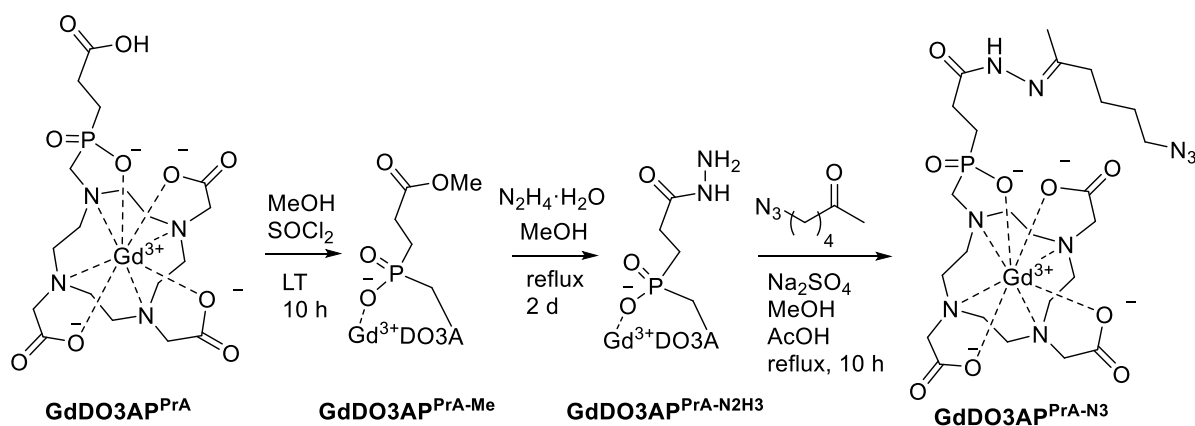
Obr. 59. Syntéza 6-azido-hexan-2-onu, který byl použit pro finální hydrazid–hydrizonovou spojku.

Finální kondenzací (Obr. 60) 6-azido-hexan-2-onu s Gd^{3+} komplexem s hydrazidovou funkční skupinou byl připraven komplex, který byl opět pomocí CuAAC navázán na ND určené k indikaci nízkého pH.



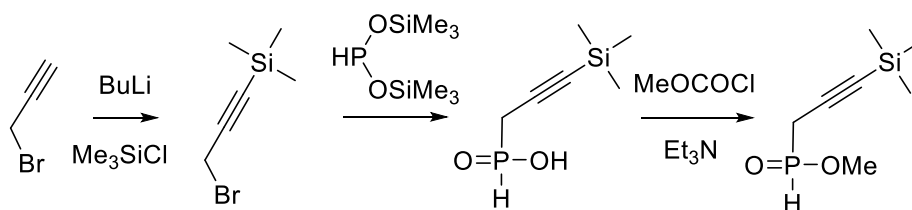
Obr. 60. Kondenzace hydrazidové funkční skupiny Gd^{3+} komplexu s ketoazidem za vzniku finální pH senzitivní spojky.

Kromě komplexu s pH senzitivní hydrazid–hydrizonovou spojkou popsaném v článku byl v rámci tohoto projektu připraven ještě jeden. Jeho syntéza (Obr. 61) vycházela z ligandu $\text{DO3AP}^{\text{PrA}}$ popsaném v lit.¹²⁹ Komplexací Gd^{3+} byl připraven $\text{GdDO3AP}^{\text{PrA}}$. Ion Gd^{3+} je jednak nutný pro finální aplikaci, zároveň však během syntézy brání esterifikaci tří karboxylových skupin, které jsou na něj koordinovány. V další reakci tak byla na metylester ($\text{GdDO3AP}^{\text{PrA-Me}}$) převedena jen karboxylová skupina methylen(2-karboxyethyl)fosfinátového pendantního ramene. Ester byl následně působením hydrazinu převeden na hydrazid a ten pak na hydrazid–hydrizon s azidovou funkční skupinou ($\text{GdDO3AP}^{\text{PrA-N3}}$). Oproti nakonec publikovanému komplexu je celková syntéza $\text{GdDO3AP}^{\text{PrA-N3}}$ jednodušší a délka spojky od atomu gadolinia k azidové funkční skupině, použité pro připojení k povrchu nanodiamantu, je kratší. To by se mělo projevit větším ovlivněním délky T_1 času N–V centra, což se předběžným experimentem i potvrdilo. Vzhledem k úspěšnosti a pokročilosti práce na nanodiamantech s prvním komplexem s hydrazid–hydrizonovou spojkou byl však další postup na částicích s $\text{GdDO3AP}^{\text{PrA-N3}}$ zastaven a syntéza nebyla publikována.



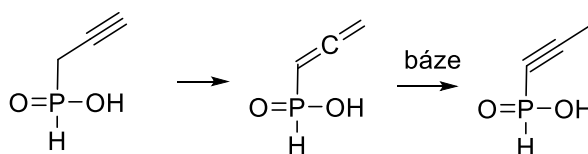
Obr. 61. Nepublikovaná syntéza Gd³⁺ komplexu s hydrazid-hydrazonovou spojkou.

Pro syntézu komplexu se spojkou citlivou na redukční prostředí byl nejprve připraven ligand s chráněným terminálním alkyem.¹²² Pro jeho syntézu bylo nejprve připraveno fosfinátové pendantní rameno (Obr. 62).



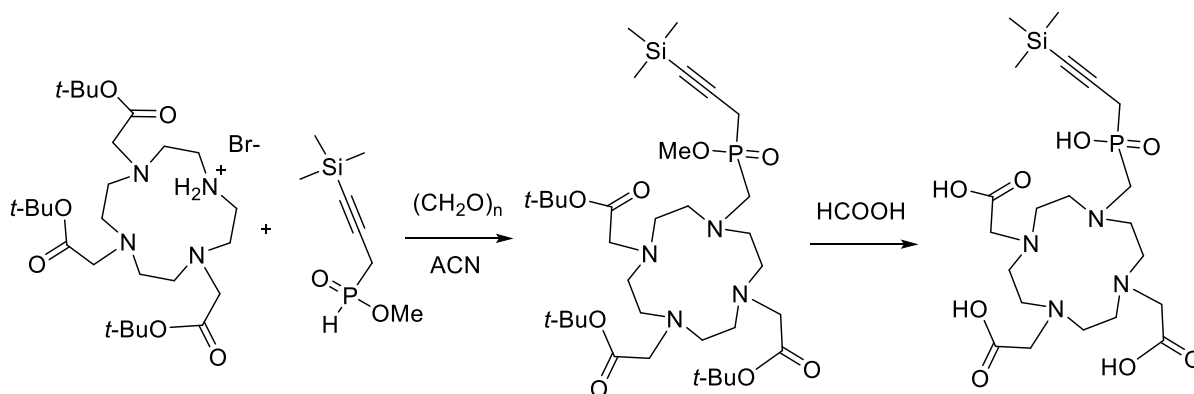
Obr. 62. Syntéza pendantního ramene fosfinové kyseliny s chráněným terminálním alkyem.

Chránění trimethylsilylovou skupinou bylo nutné, neboť prop-2-ynfosfinová kyselina s nechráněným terminálním alkyem má tendenci izomerovat na propadienfosfinovou kyselinu a v silnějším bazickém prostředí až na prop-1-ynfosfinovou kyselinu, z nichž ani jedna již nereaguje při CuAAC.¹²² Zároveň je trimethylsilylová skupina z terminálního alkynu snadno odstranitelná působením fluoridových iontů a to jak anorganickými fluoridy ve vodném médiu, tak i například kvarterními amoniovými fluoridy v organických rozpouštědlech.



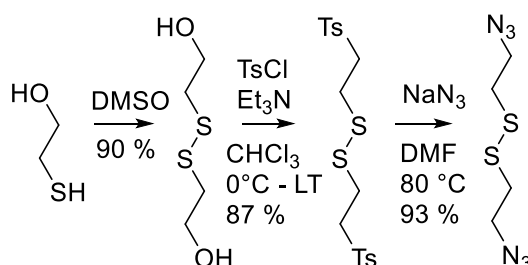
Obr. 63. Přesmyk nechráněné prop-2-ynfosfinové kyseliny.

Připojení tohoto alkyfosfinového pendantního ramene na cyklenový skelet není možné za podmínek Moedritzerovy-Iraniho reakce, které se běžně používají, tedy zahřívání příslušné H-fosfinové kyseliny se sekundárním aminem a paraformaldehydem v několikamolární HCl. U 3-(trimethylsilyl)prop-2-ynfosfinové kyseliny při těchto podmínkách totiž dochází k rychlému odstoupení trimethylsilylové skupiny a adici HCl na trojnou vazbu. Místo toho byla použita mírnější varianta reakce *t*-Bu₃DO3A s methylesterem fosfinové kyseliny v bezvodém acetonitrilu s následným ochráněním esterů (Obr. 64).¹²² Z tohoto ligandu pak byl vytvořen Gd³⁺ komplex.



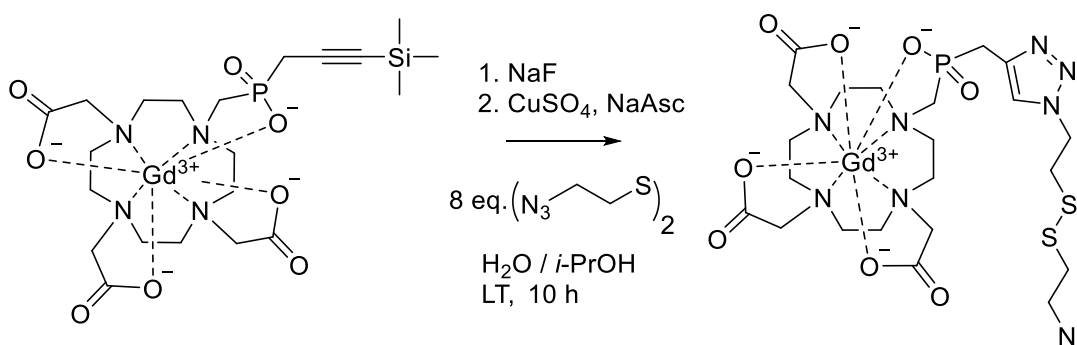
Obr. 64. Připojení fosfinátového pendantního ramene na $t\text{-Bu}_3\text{DO3A}$ a následné odchránění ligandu.

Pro jednoduchost přípravy byla vybrána symetrická disulfidická spojka, která byla syntetizována podle publikovaného postupu s vysokými výtěžky.¹³⁰



Obr. 65. Syntéza symetrické disulfidické spojky.

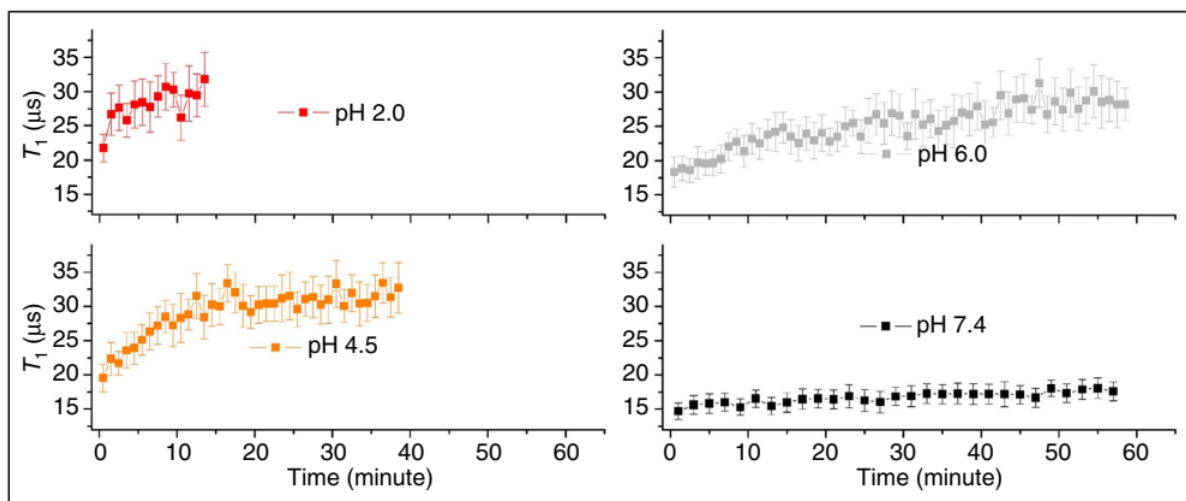
V závěrečném kroku syntézy (Obr. 66) byla odstraněna trimethylsilylová chránící skupina fluoridovými ionty a uvolněný alkyň byl ihned reagován CuAAC s velkým nadbytkem (8 mol. ekv.) 1,6-bis(azido)-3,4-dithiahexanu. Nadbytek disulfidu potlačil vznik dimerní molekuly se dvěma komplexy. Ani v tomto případě nebyla pozorována transmetalace ionty mědi.



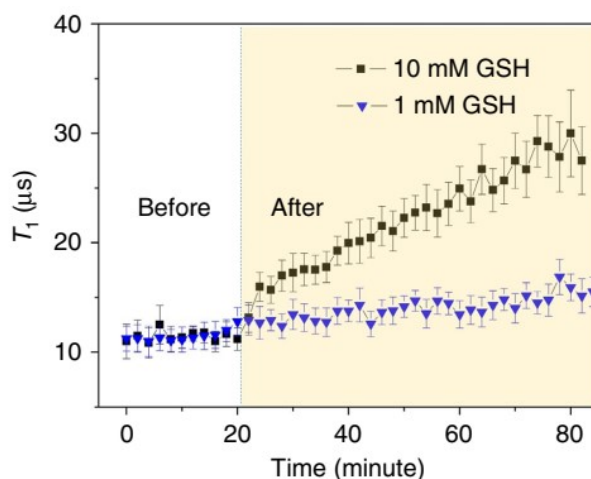
Obr. 66. Odchránění terminálního alkynu a připojení disulfidické spojky ke komplexu Gd^{3+} v jednom kroku.

Všechny tři typy komplexů pak byly navázány pomocí CuAAC na alkyň na povrchu polymeru obalujícím ND. Měření následně prokázalo funkčnost obou typů připravených nanosond a v řádu minut až desítek minut bylo možné odečíst jak reakci na pH (Obr. 67) tak i na přítomnost redukujícího GSH (Obr. 68). Na molekulární úrovni je metoda natolik citlivá, že je možné rozlišit již odštěpení několika desítek molekul komplexu Gd^{3+} z jednoho ND. Značnou limitací pro reálné využití v buňkách je ireverzibilní princip fungování. Jakmile se Gd^{3+} komplex vlivem změny prostředí jednou odštěpí a oddifunduje, nemůže již NV centrum ovlivňovat, ani pokud se podmínky změni zpět. Tato

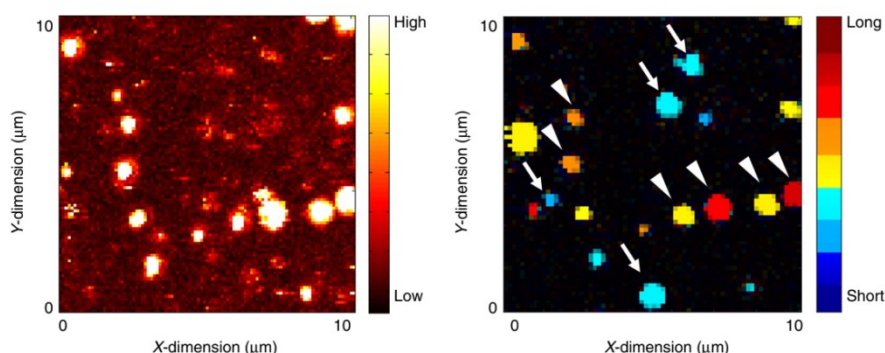
studie tak sloužila především jako potvrzení konceptu, který byl jako velmi atraktivní téma rozpracován v mnoha dalších studiích.¹³¹



Obr. 67. Rychlost změny relaxačního času T_1 částic ND s hydrazid-hydrazonovou spojkou při různých pH. Převzato z lit.⁵



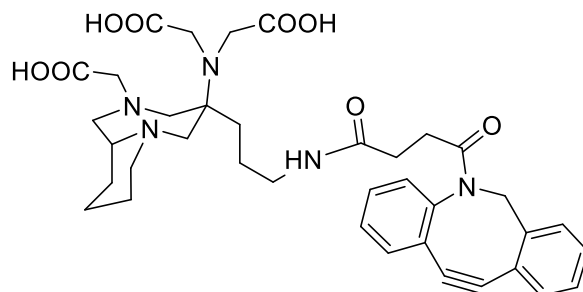
Obr. 68. Rychlost změny relaxačního času T_1 částic ND s disulfidickou spojkou před (prvních 20 minut, bíle) a po (od 20 minut dále, žlutě) přidání GSH do media. Převzato z lit.⁵



Obr. 69. Vlevo: obraz pH senzitivních ND (inkubovaných při pH 2,0) z konfokálního mikroskopu se zobrazenou stupnicí intenzity fluorescence na pravé straně; vpravo: rekonstrukce T_1 váženého obrazu stejných ND jako vlevo, částice (označené trojúhelníčky) byly po inkubaci promyty puřem o pH 7,4 a následně byly přidány čerstvé ND s dosud neodštěpenými Gd^{3+} komplexy (označené šipkami). Převzato z lit.⁵

4.4 Rigidizovaný bioortogonálně bifunkční ligand pro PET

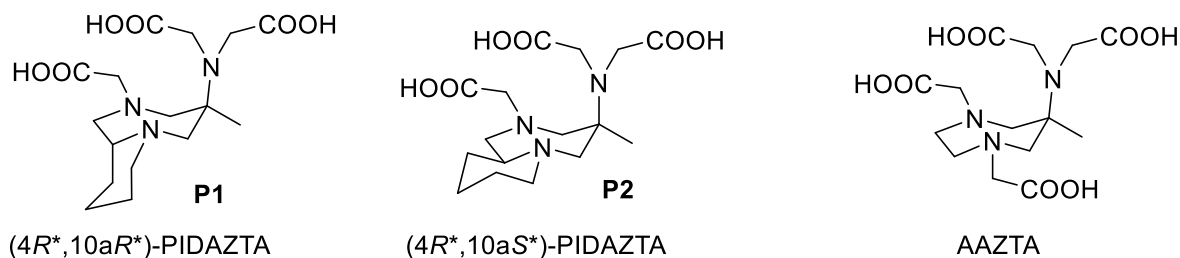
V posledním projektu této práce byl syntetizován nový bifunkční ligand (Obr. 70), určený primárně pro komplexaci PET nuklidu ^{68}Ga . Výsledky tohoto projektu nebyly dosud publikovány a jeho syntetická část je shrnuta v Apendixu F.



Obr. 70. Struktura nově syntetizovaného ligandu nesoucí DBCO funkční skupinu.

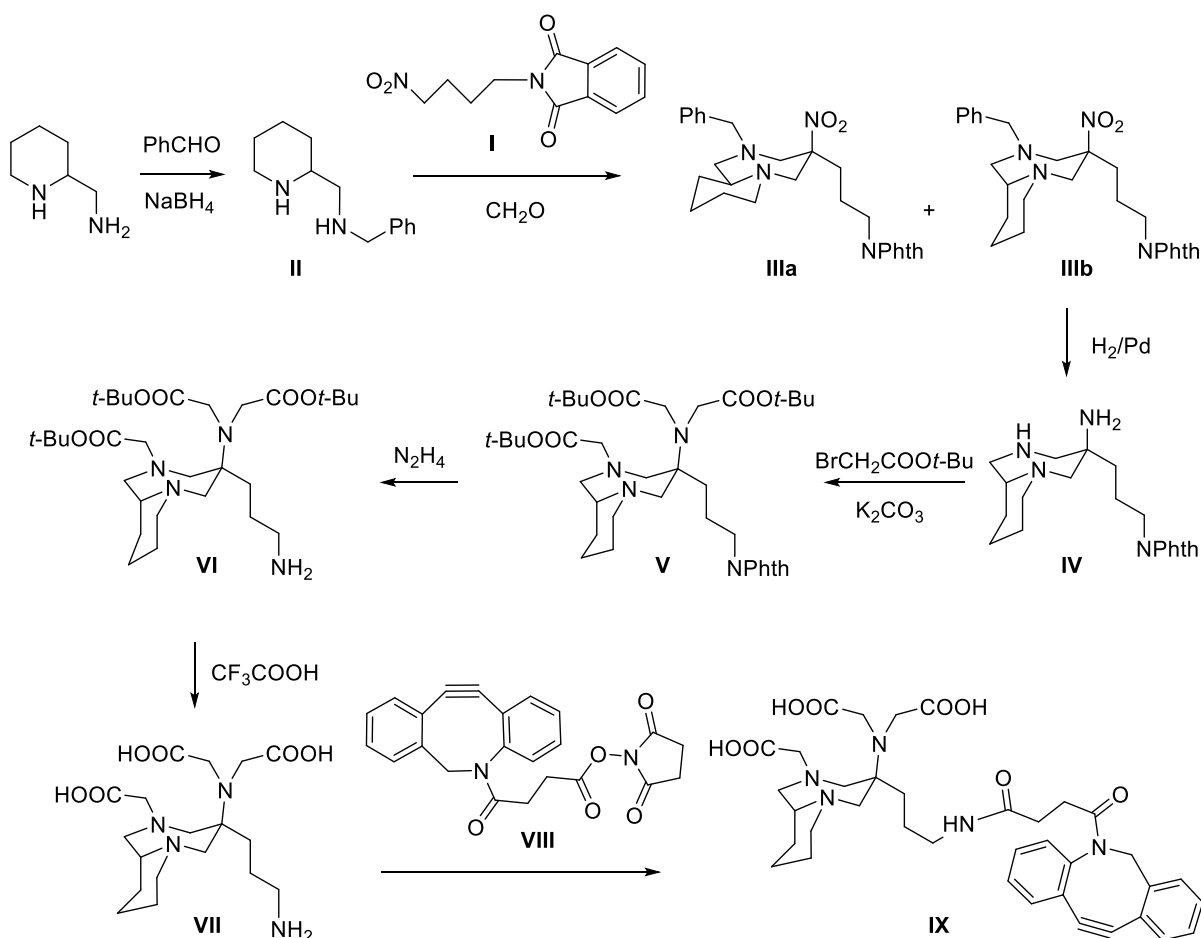
Jeho design vychází z ligandu PIDAZTA¹¹² (Obr. 71), oproti kterému je vybaven funkční skupinou s pnutým cyklooktynem. Ta umožňuje připojení například na modifikovaný peptid pomocí bioortogonální SPAAC či SPANC reakce. Ligand by tak mohl být například použit pro radionuklidové ^{68}Ga značení předem aplikovaných protilátek nesoucích azidovou funkční skupinu *in vivo*.

Původní ligand PIDAZTA nese strukturní podobnost s používaným ligandem AAZTA, oproti kterému je však jeho struktura rigidizovaná fúzí se šestičlenným cyklem. Jeho přidání vede ke vzniku dvou diastereoizomerů, **P1** a **P2**, přičemž komplexy **P1** vykazují asi o tři řády vyšší konstantu stability než **P2** (Obr. 71).¹¹²



Obr. 71. Vlevo: PIDAZTA diastereoizomer s vyšší stabilitou komplexu s Ga^{3+} ; Uprostřed: PIDAZTA diastereoizomer s přibližně o tři řády méně stabilním komplexem s Ga^{3+} ; Vpravo: Ligand AAZTA.¹¹²

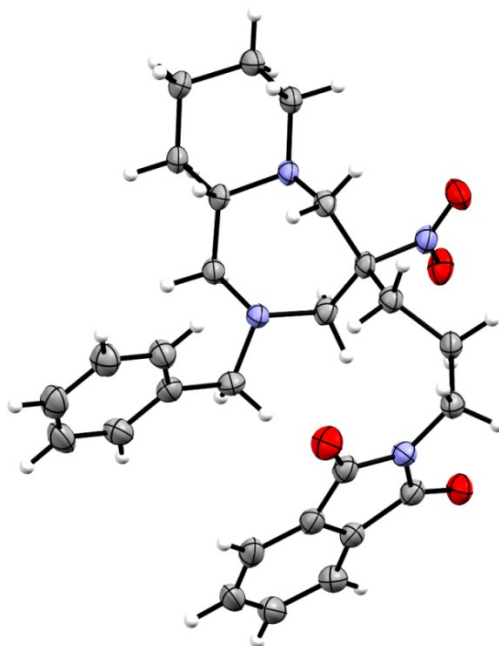
Ligand PIDAZTA **P1** umožňuje rychlou komplexaci Ga^{3+} i za laboratorní teploty při pH mezi 7 a 8, tedy za fyziologických podmínek.¹¹² To může být velkou výhodou při značení pomocí konjugátů s citlivými biomolekulami. U nového ligandu syntetizovaného v této práci (Obr. 72) se dají předpokládat podobně výhodné vlastnosti.



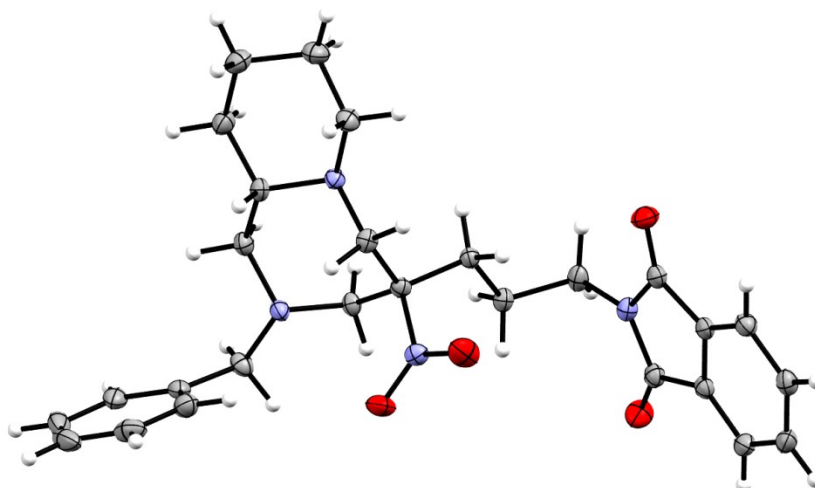
Obr. 72. Reakční schéma syntézy ligandu nesoucí DBCO skupinu.

Na začátku syntézy byl nejprve připraven nitroftalimid (**I**); *N*-(4-brombutyl)ftalimid byl připraven z ftalimidu alkyací nadbytkem 1,4-dibromobutanu, aby byl potlačen vznik bis(ftalimidového) vedlejšího produktu.¹³² *N*-(4-brombutyl)ftalimid byl kvůli zvýšení reaktivity převeden na *N*-(4-jodbutyl)ftalimid Finkelsteinovou reakcí, analogicky k přípravě *N*-(4-jodpropyl)ftalimidu v lit.¹³³, a byl použit přímo bez dalšího čištění. Pro substituci jodu za nitro skupinu byla použita reakce s NaNO_2 v DMSO. Přestože poskytuje nižší výtěžky (**I**) než popsané reakce s AgNO_2 ,^{134,135} má výhodu v použití mnohem levnějšího a snadno dostupného činidla.

N-(fenylmethyl)-2-piperidinmethanamin (**II**) byl připraven reaktivní aminací z racemického 2-aminomethylpiperidinu podle lit.¹¹² Reakce (**II**) s *N*-(4-nitrobutyl)ftalimidem (**I**) a paraformaldehydem poskytla směs dvou enantiomerních párů (**IIIa**) a (**IIIb**). Tyto diastereoizomery byly nejprve rozděleny sloupcovou chromatografií (soustava hexan/ethyl acetát). Stereochemie obou izomerů byla určena rentgenovou difrakcí na monokrystalu u obou izomerů (Obr. 73. a Obr. 74). Později bylo zjištěno, že žádoucí enantiomerní pár (4*R*,10*aR*)/(4*S*,10*aS*) (**IIIb**) (Obr. 74) částečně krystalizuje z roztoku obou produktů a byl tak získán touto snazší cestou.



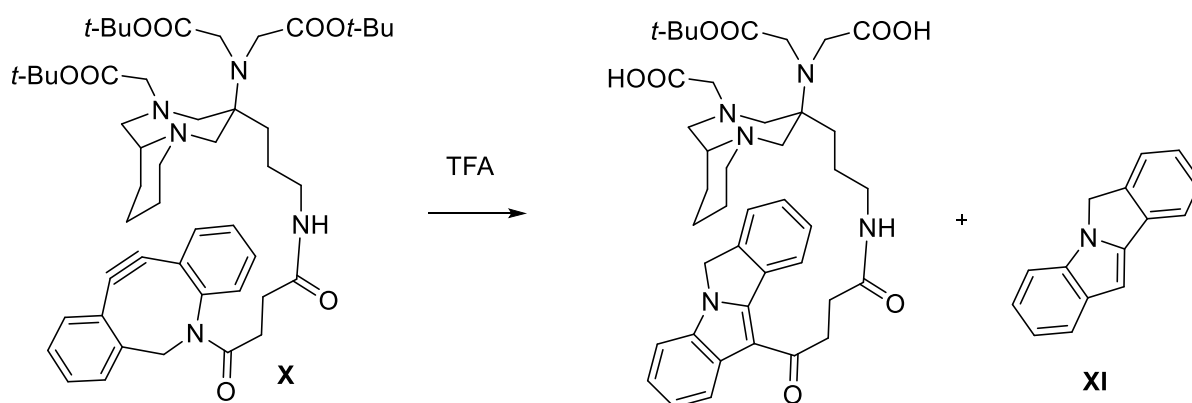
Obr. 73. Molekulová struktura izomeru (4*R*,10*aS*)-IIIa z krystalové struktury (4*R*,10*aS*)/(4*S*,10*aR*)-IIIa (látka IIIa krystaluje v centrosymetrické prostorové grupě). Tento diastereoizomer nebyl použit v dalších krocích syntézy.



Obr. 74. Molekulová struktura izomeru (4*S*,10*aS*)-IIIb z krystalové struktury (4*S*,10*aS*)/(4*R*,10*aR*)-IIIb (látka IIIb krystaluje v centrosymetrické prostorové grupě). Tento diastereoizomer byl použit v dalších krocích syntézy.

V dalších krocích byl použit jen diastereoizomerní pár (4*R*,10*aR*)/(4*S*,10*aS*) (**IIIb**), přičemž se dá předpokládat, že žádná z následujících reakcí, které probíhají jen na substituentech již zformovaného skeletu, nevede ke změně konfigurace. Heterokatalytickou hydrogenací bylo dosaženo redukce nitroskupiny na aminoskupinu a debenzylace v jednom kroku. Bylo zjištěno, že přidavek zředěné HCl urychloval hydrogenaci a umožňoval její doběhnutí do konce. Výsledný amin (**IV**) byl přímo alkylován nadbytkem *t*-butyl bromoacetátu a produkt (**V**) separován chromatografií. V dalším kroku byla reakcí s hydrazinem odstraněna ftalimidová chránící skupina a výsledný amin (**VI**) byl separován pomocí preparativní HPLC. Tento aminoderivát může být přímo nebo po odstranění *t*-butylových chránících skupin připojen na cílicí nebo jinou funkční molekulu.

Finálním produktem však měl být ligand nesoucí pnutý cykloalkyn. Nejprve byl proto amin (**VI**) konjugován s DBCO aktivním NHS-esterem (**VIII**). Výsledný chráněný ligand (**X**) se však nedařilo zbavit *t*-butylesterových chránících skupin za současného zachování DBCO substituentu. Byly vyzkoušeny různé podmínky odchránění (TFA čistá či zředěná, TFA s přísávkem vychytávačů radikálů, mravenčí kyselina o různých koncentracích), ale spolehlivého odchránění nebylo dosaženo. Místo toho byl vždy pozorován přesmyk a odštěpení DBCO motivu (Obr. 75).



Obr. 75. Předpokládaný přesmyk při pokusu o odstranění *t*-butyl esterových skupin odpovídající lit.¹³⁶ Dle HPLC-MS bylo v reakční směsi vždy pozorováno částečné odstranění *t*-butylesterů a přítomnost látky s molekulovou hmotností odpovídající (**XI**) vykazující, na rozdíl od DBCO, silnou fluorescenci.

Zatímco někteří autoři^{137,138} uvádí úspěšné odchránění *t*-butylesterové chránící skupiny za zkoušených a výše popsaných podmínek při zachování skeletu DBCO, v případě této syntézy se pozorování shodovalo s lit.^{136,139}, kde bylo popsáno odštěpení a přesmyk pnutého cykloalkynu za vzniku fluorescentního vedlejšího produktu o stejné molekulové hmotnosti jako má DBCO a strukturou (**XI**). Pro překonání této komplikace byl produkt (**VI**) nejprve deesterifikován na volný ligand (**VII**), který následně reakcí s aktivovaným NHS esterem DBCO kyseliny (**VIII**) poskytl finální produkt (**IX**), který byl přečištěn na preparativním HPLC a lyofilizován. U produktu byl pozorován pomalý rozklad za laboratorní teploty. Je potřeba jej tedy, stejně jako výchozí DBCO, skladovat při dostatečně nízké teplotě.

5 Závěr

V prvním projektu této práce byl připraven bifunkční ligand se základním skeletem TACN a třemi fosfinátovými pendantními rameny, přičemž jedno z nich neslo dále konjugovatelnou karboxylovou skupinu. U ligandu byla potvrzena dobrá selektivita pro komplexaci iontů Ga^{3+} i v přítomnosti dalších iontů kovů. Byla ověřena možnost konjugace tohoto ligandu s cílicími peptidy přes amidickou vazbu. Při této konjugaci byl pozorován vznik vnitřního esteru fosfinové kyseliny, který se však hydrolyzoval v průběhu komplexace Ga^{3+} . Tyto konjugáty peptidů s ligandem byly použity ke komplexaci PET izotopu ^{68}Ga a poté byla ověřena jejich funkčnost jako radiodiagnostik na zvířecích modelech s tumory.

V dalším projektu práce byly připraveny ligandy se základním skeletem cyklenu a třemi karboxylovými a jedním fosfinátovým pendantním ramenem. Komplex tohoto ligandu s Gd^{3+} byl konjugován s cílicím peptidem pro využití jako cílená MRI kontrastní látka. V dalším experimentu byl připraven konjugát Gd^{3+} komplexu s fluorescenčním barvivem rhodaminem jako duálního diagnostika pro MRI/fluorescenční mikroskopii. Od připraveného Gd^{3+} komplexu a jeho konjugátů byly naměřeny hodnoty relaxivity, které byly ve všech případech větší než u standardu $[Gd(DOTA)]$. Potenciál konjugátu Gd^{3+} komplexu s peptidem jako cílené MRI kontrastní látky byl demonstrován na zvířecím modelu.

Ve třetím projektu byly připraveny komplexy Gd^{3+} na bázi derivátů cyklenu se třemi acetátovými a jedním fosfinátovým pendantním ramenem, které bylo modifikováno další reaktivní skupinou. Tyto komplexy umožnily konstrukci nanosond pro snímání redukčního potenciálu a pH v submikrometrovém rozlišení. Tyto sondy byly tvořeny fluorescenčními nanodiamanty, modifikovanými na povrchu polymerem, na který byly připojeny zmíněné komplexy Gd^{3+} . Fluorescence těchto nanodiamantů byla dána přítomností N-V center a ovlivněna okolním magnetickým polem mj. právě Gd^{3+} iontů na jejich povrchu. Připojení komplexů k nanodiamantům bylo realizováno přes spojky, jejichž rychlost štěpení se zvyšovala s klesajícím pH v případě hydrazid-hydrazonové spojky nebo se zvyšující se koncentrací redukčního činidla (GSH) u disulfidické spojky. Odštěpování komplexů závislé na prostředí pak bylo možné odečíst jako změnu fluorescence. Schopnost nanosond reagovat na pH či redukční prostředí v časovém měřítku minut až desítek minut byla ověřena v mikrofluidním kanále mimikujícím buněčné prostředí.

V posledním, dosud nepublikovaném, projektu byl připraven bifunkční ligand pro vazbu iontů Ga^{3+} . Tento ligand se třemi pendantními karboxylovými skupinami byl odvozen od struktury PIDAZTA se skeletem rigidizovaným šestičlenným kruhem. Ze dvou vzniklých diastereoizomerů byl separován ten s předpokládanou pevnější vazbou iontů Ga^{3+} a ten byl dále opatřen pnutým cykloalkynem pro bioortogonální konjugaci pomocí SPAAC.

6 Seznam použité 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>.
- (6) Algorri, J. F.; Ochoa, M.; Roldán-Varona, P.; Rodríguez-Cobo, L.; López-Higuera, J. M. Light Technology for Efficient and Effective Photodynamic Therapy: A Critical Review. *Cancers* **2021**, *13* (14), 3484. <https://doi.org/10.3390/cancers13143484>.
- (7) Yaseen, M. A.; Yu, J.; Wong, M. S.; Anvari, B. In-Vivo Fluorescence Imaging of Mammalian Organs Using Charge-Assembled Mesocapsule Constructs Containing Indocyanine Green. *Opt. Express, OE* **2008**, *16* (25), 20577–20587. <https://doi.org/10.1364/OE.16.020577>.
- (8) Herman, B. *Fluorescence Microscopy*; Garland Science: London, 2020. <https://doi.org/10.1201/9781003077060>.
- (9) Hašek, J.; Streiblová, E. Fluorescence Microscopy Methods. In *Yeast Protocols: Methods in Cell and Molecular Biology*; Evans, I. H., Ed.; Methods in Molecular BiologyTM; Humana Press: Totowa, NJ, 1996; pp 391–405. <https://doi.org/10.1385/0-89603-319-8:391>.
- (10) Lichtman, J. W.; Conchello, J.-A. Fluorescence Microscopy. *Nat Methods* **2005**, *2* (12), 910–919. <https://doi.org/10.1038/nmeth817>.
- (11) Chalfie, M.; Tu, Y.; Euskirchen, G.; Ward, W. W.; Prasher, D. C. Green Fluorescent Protein as a Marker for Gene Expression. *Science* **1994**, *263* (5148), 802–805. <https://doi.org/10.1126/science.8303295>.
- (12) Huisken, J.; Swoger, J.; Del Bene, F.; Wittbrodt, J.; Stelzer, E. H. K. Optical Sectioning Deep Inside Live Embryos by Selective Plane Illumination Microscopy. *Science* **2004**, *305* (5686), 1007–1009. <https://doi.org/10.1126/science.1100035>.
- (13) Pratiwi, F. W.; Kuo, C. W.; Chen, B.-C.; Chen, P. Recent Advances in the Use of Fluorescent Nanoparticles for Bioimaging. *Nanomedicine* **2019**, *14* (13), 1759–1769. <https://doi.org/10.2217/nnm-2019-0105>.
- (14) S. Wolfbeis, O. An Overview of Nanoparticles Commonly Used in Fluorescent Bioimaging. *Chemical Society Reviews* **2015**, *44* (14), 4743–4768. <https://doi.org/10.1039/C4CS00392F>.
- (15) Jensen, E. C. Use of Fluorescent Probes: Their Effect on Cell Biology and Limitations. *The Anatomical Record* **2012**, *295* (12), 2031–2036. <https://doi.org/10.1002/ar.22602>.
- (16) Blower, P. J. A Nuclear Chocolate Box: The Periodic Table of Nuclear Medicine. *Dalton Trans* **2015**, *44* (11), 4819–4844. <https://doi.org/10.1039/c4dt02846e>.
- (17) Kastelik-Hryniewiecka, A.; Jewula, P.; Bakalorz, K.; Kramer-Marek, G.; Kuźnik, N. Targeted PET/MRI Imaging Super Probes: A Critical Review of Opportunities and Challenges. *Int J Nanomedicine* **2022**, *16*, 8465–8483. <https://doi.org/10.2147/IJN.S336299>.

- (18) Basu, S.; Kwee, T. C.; Surti, S.; Akin, E. A.; Yoo, D.; Alavi, A. Fundamentals of PET and PET/CT Imaging. *Annals of the New York Academy of Sciences* **2011**, *1228* (1), 1–18. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2011.06077.x>.
- (19) Verger, A.; Guedj, E. The Renaissance of Functional 18F-FDG PET Brain Activation Imaging. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* **2018**, *45* (13), 2338–2341. <https://doi.org/10.1007/s00259-018-4165-2>.
- (20) Ehman, E. C.; Johnson, G. B.; Villanueva-Meyer, J. E.; Cha, S.; Leynes, A. P.; Larson, P. E. Z.; Hope, T. A. PET/MRI: Where Might It Replace PET/CT? *Journal of Magnetic Resonance Imaging* **2017**, *46* (5), 1247–1262. <https://doi.org/10.1002/jmri.25711>.
- (21) Veen, E. L. van der; Giesen, D.; Jong, L. P.; Jorritsma-Smit, A.; Vries, E. G. E. D.; Hooge, M. N. L. 89Zr-Pembrolizumab Biodistribution Is Influenced by PD-1-Mediated Uptake in Lymphoid Organs. *J Immunother Cancer* **2020**, *8* (2), e000938. <https://doi.org/10.1136/jitc-2020-000938>.
- (22) Holland, J. P.; Williamson, M. J.; Lewis, J. S. Unconventional Nuclides for Radiopharmaceuticals. *Mol Imaging* **2010**, *9* (1), 7290.2010.00008. <https://doi.org/10.2310/7290.2010.00008>.
- (23) Corman, M. L.; Galandiuk, S.; Block, G. E.; Prager, E. D.; Weiner, G. J.; Kahn, D.; Abdel-Nabi, H.; Mitchell, E. P.; Pascucci, V. L.; Maroli, A. N.; Maguire, R. T. Immunoscintigraphy With¹¹¹In-Satumomab Pendetide in Patients with Colorectal Adenocarcinoma: Performance and Impact on Clinical Management. *Dis Colon Rectum* **1994**, *37* (2), 129–137. <https://doi.org/10.1007/BF02047534>.
- (24) Morais, M.; Ma, M. T. Site-Specific Chelator-Antibody Conjugation for PET and SPECT Imaging with Radiometals. *Drug Discovery Today: Technologies* **2018**, *30*, 91–104. <https://doi.org/10.1016/j.ddtec.2018.10.002>.
- (25) Zhou, Y.; Chakraborty, S.; Liu, S. Radiolabeled Cyclic RGD Peptides as Radiotracers for Imaging Tumors and Thrombosis by SPECT. *Theranostics* **2011**, *1*, 58–82. <https://doi.org/10.7150/thno/v01p0058>.
- (26) Rahman, A. K. M. R.; Awal, A. Production of ¹⁴⁹Tb, ¹⁵²Tb, ¹⁵⁵Tb and ¹⁶¹Tb from Gadolinium Using Different Light-Particle Beams. *J Radioanal Nucl Chem* **2020**, *323* (2), 731–740. <https://doi.org/10.1007/s10967-019-06973-0>.
- (27) Rahmim, A.; Zaidi, H. PET versus SPECT: Strengths, Limitations and Challenges. *Nuclear Medicine Communications* **2008**, *29* (3), 193–207. <https://doi.org/10.1097/MNM.0b013e3282f3a515>.
- (28) Werner, R. A.; Chen, X.; Lapa, C.; Koshino, K.; Rowe, S. P.; Pomper, M. G.; Javadi, M. S.; Higuchi, T. The next Era of Renal Radionuclide Imaging: Novel PET Radiotracers. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* **2019**, *46* (9), 1773–1786. <https://doi.org/10.1007/s00259-019-04359-8>.
- (29) Choi, J.-Y.; Kim, M.-J.; Chung, Y. E.; Kim, J. Y.; Jones, A. C.; de Becker, J.; van Cauteren, M. Abdominal Applications of 3.0-T MR Imaging: Comparative Review versus a 1.5-T System. *RadioGraphics* **2008**, *28* (4), e30–e30. <https://doi.org/10.1148/rg.e30>.
- (30) Nowogrodzki, A. The World's Strongest MRI Machines Are Pushing Human Imaging to New Limits. *Nature* **2018**, *563* (7729), 24–26. <https://doi.org/10.1038/d41586-018-07182-7>.
- (31) Pagnanelli, R. A.; Basso, D. A. Myocardial Perfusion Imaging with ²⁰¹Tl. *Journal of Nuclear Medicine Technology* **2010**, *38* (1), 1–3. <https://doi.org/10.2967/jnmt.109.068593>.
- (32) Chatal, J.-F.; Rouzet, F.; Haddad, F.; Bourdeau, C.; Mathieu, C.; Le Guludec, D. Story of Rubidium-82 and Advantages for Myocardial Perfusion PET Imaging. *Front Med (Lausanne)* **2015**, *2*, 65. <https://doi.org/10.3389/fmed.2015.00065>.
- (33) Rösch, F.; P. Baum, R. Generator-Based PET Radiopharmaceuticals for Molecular Imaging of Tumours: On the Way to THERANOSTICS. *Dalton Transactions* **2011**, *40* (23), 6104–6111. <https://doi.org/10.1039/C0DT01504K>.
- (34) Müller, C.; Domnanich, K. A.; Umbricht, C. A.; van der Meulen, N. P. Scandium and Terbium Radionuclides for Radiotheranostics: Current State of Development towards Clinical Application. *Br J Radiol* **2018**, *91* (1091), 20180074. <https://doi.org/10.1259/bjr.20180074>.
- (35) Gomes Marin, J. F.; Nunes, R. F.; Coutinho, A. M.; Zaniboni, E. C.; Costa, L. B.; Barbosa, F. G.; Queiroz, M. A.; Cerri, G. G.; Buchpiguel, C. A. Theranostics in Nuclear Medicine:

- Emerging and Re-Emerging Integrated Imaging and Therapies in the Era of Precision Oncology. *RadioGraphics* **2020**, *40* (6), 1715–1740. <https://doi.org/10.1148/rg.2020200021>.
- (36) Research, C. for D. E. and. FDA Approves Pluvicto for Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer. *FDA* **2022**.
- (37) Kim, K.; Kim, S.-J. Lu-177-Based Peptide Receptor Radionuclide Therapy for Advanced Neuroendocrine Tumors. *Nucl Med Mol Imaging* **2018**, *52* (3), 208–215. <https://doi.org/10.1007/s13139-017-0505-6>.
- (38) Afshar-Oromieh, A.; Hetzheim, H.; Kratochwil, C.; Benesova, M.; Eder, M.; Neels, O. C.; Eisenhut, M.; Kübler, W.; Holland-Letz, T.; Giesel, F. L.; Mier, W.; Kopka, K.; Haberkorn, U. The Theranostic PSMA Ligand PSMA-617 in the Diagnosis of Prostate Cancer by PET/CT: Biodistribution in Humans, Radiation Dosimetry, and First Evaluation of Tumor Lesions. *Journal of Nuclear Medicine* **2015**, *56* (11), 1697–1705. <https://doi.org/10.2967/jnumed.115.161299>.
- (39) Benešová, M.; Schäfer, M.; Bauder-Wüst, U.; Afshar-Oromieh, A.; Kratochwil, C.; Mier, W.; Haberkorn, U.; Kopka, K.; Eder, M. Preclinical Evaluation of a Tailor-Made DOTA-Conjugated PSMA Inhibitor with Optimized Linker Moiety for Imaging and Endoradiotherapy of Prostate Cancer. *Journal of Nuclear Medicine* **2015**, *56* (6), 914–920. <https://doi.org/10.2967/jnumed.114.147413>.
- (40) Ghodsirad, M. A.; Pirayesh, E.; Akbarian, R.; Javanmard, B.; Kaghazchi, F.; Tavakoli, M.; Fattahi, K. Diagnostic Utility of Lutetium-177 (Lu 177) Prostate-Specific Membrane Antigen (PSMA) Scintigraphy In Prostate Cancer Patients With PSA Rise And Negative Conventional Imaging. *Urol J* **2020**, *17* (4), 374–378. <https://doi.org/10.22037/uj.v0i0.5451>.
- (41) Olatunde, A. O.; Dorazio, S. J.; Sperryak, J. A.; Morrow, J. R. The NiCEST Approach: Nickel(II) ParaCEST MRI Contrast Agents. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134* (45), 18503–18505. <https://doi.org/10.1021/ja307909x>.
- (42) Wang, J.; Wang, H.; Ramsay, I. A.; Erstad, D. J.; Fuchs, B. C.; Tanabe, K. K.; Caravan, P.; Gale, E. M. Manganese-Based Contrast Agents for Magnetic Resonance Imaging of Liver Tumors: Structure–Activity Relationships and Lead Candidate Evaluation. *J. Med. Chem.* **2018**, *61* (19), 8811–8824. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.8b00964>.
- (43) Rudovský, J.; Cígler, P.; Kotek, J.; Hermann, P.; Vojtíšek, P.; Lukeš, I.; Peters, J. A.; Vander Elst, L.; Muller, R. N. Lanthanide(III) Complexes of a Mono(Methylphosphonate) Analogue of H4dota: The Influence of Protonation of the Phosphonate Moiety on the TSAP/SAP Isomer Ratio and the Water Exchange Rate. *Chemistry – A European Journal* **2005**, *11* (8), 2373–2384. <https://doi.org/10.1002/chem.200400367>.
- (44) Caravan, P.; Ellison, J. J.; McMurry, T. J.; Lauffer, R. B. Gadolinium(III) Chelates as MRI Contrast Agents: Structure, Dynamics, and Applications. *Chem. Rev.* **1999**, *99* (9), 2293–2352. <https://doi.org/10.1021/cr980440x>.
- (45) Caravan, P. Strategies for Increasing the Sensitivity of Gadolinium Based MRI Contrast Agents. *Chem. Soc. Rev.* **2006**, *35* (6), 512–523. <https://doi.org/10.1039/B510982P>.
- (46) Weinmann, H.; Brasch, R.; Press, W.; Wesbey, G. Characteristics of Gadolinium-DTPA Complex: A Potential NMR Contrast Agent. *American Journal of Roentgenology* **1984**, *142* (3), 619–624. <https://doi.org/10.2214/ajr.142.3.619>.
- (47) Radbruch, A.; Weberling, L. D.; Kieslich, P. J.; Eidel, O.; Burth, S.; Kickingereeder, P.; Heiland, S.; Wick, W.; Schlemmer, H.-P.; Bendszus, M. Gadolinium Retention in the Dentate Nucleus and Globus Pallidus Is Dependent on the Class of Contrast Agent. *Radiology* **2015**, *275* (3), 783–791. <https://doi.org/10.1148/radiol.2015150337>.
- (48) PRAC Concludes Assessment of Gadolinium Agents Used in Body Scans and Recommends Regulatory Actions, Including Suspension for Some Marketing Authorisations. https://www.ema.europa.eu/en/documents/press-release/prac-concludes-assessment-gadolinium-agents-used-body-scans-recommends-regulatory-actions-including_en.pdf No. https://www.ema.europa.eu/en/documents/press-release/prac-concludes-assessment-gadolinium-agents-used-body-scans-recommends-regulatory-actions-including_en.pdf, 2.

- (49) Romanelli, A.; D'Andrea, L. D. *Chemical Ligation: Tools for Biomolecule Synthesis and Modification*; John Wiley & Sons, 2017.
- (50) Rigolot, V.; Biot, C.; Lion, C. To View Your Biomolecule, Click inside the Cell. *Angewandte Chemie International Edition* **2021**, *60* (43), 23084–23105. <https://doi.org/10.1002/anie.202101502>.
- (51) Choi, J. Y.; Lee, B. C. Click Reaction: An Applicable Radiolabeling Method for Molecular Imaging. *Nucl Med Mol Imaging* **2015**, *49* (4), 258–267. <https://doi.org/10.1007/s13139-015-0377-6>.
- (52) Kolb, H. C.; Finn, M. G.; Sharpless, K. B. Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions. *Angewandte Chemie International Edition* **2001**, *40* (11), 2004–2021. [https://doi.org/10.1002/1521-3773\(20010601\)40:11<2004::AID-ANIE2004>3.0.CO;2-5](https://doi.org/10.1002/1521-3773(20010601)40:11<2004::AID-ANIE2004>3.0.CO;2-5).
- (53) Tornøe, C. W.; Christensen, C.; Meldal, M. Peptidotriazoles on Solid Phase: [1,2,3]-Triazoles by Regiospecific Copper(I)-Catalyzed 1,3-Dipolar Cycloadditions of Terminal Alkynes to Azides. *J. Org. Chem.* **2002**, *67* (9), 3057–3064. <https://doi.org/10.1021/jo011148j>.
- (54) Rostovtsev, V. V.; Green, L. G.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B. A Stepwise Huisgen Cycloaddition Process: Copper(I)-Catalyzed Regioselective “Ligation” of Azides and Terminal Alkynes. *Angewandte Chemie International Edition* **2002**, *41* (14), 2596–2599. [https://doi.org/10.1002/1521-3773\(20020715\)41:14<2596::AID-ANIE2596>3.0.CO;2-4](https://doi.org/10.1002/1521-3773(20020715)41:14<2596::AID-ANIE2596>3.0.CO;2-4).
- (55) Sharpless, B. K.; Fokin, V.; Rostovsev, V.; Green, L.; Himo, F. Copper-Catalysed Ligation of Azides and Acetylenes. ES2566761 (T3), April 15, 2016.
- (56) Himo, F.; Lovell, T.; Hilgraf, R.; Rostovtsev, V. V.; Noodleman, L.; Sharpless, K. B.; Fokin, V. V. Copper(I)-Catalyzed Synthesis of Azoles. DFT Study Predicts Unprecedented Reactivity and Intermediates. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127* (1), 210–216. <https://doi.org/10.1021/ja0471525>.
- (57) Wu, P.; Fokin, V. V. Catalytic Azide-Alkyne Cycloaddition: Reactivity and Applications. *Aldrichimica Acta* **2007**, *40* (1), 7–17.
- (58) Zhang, L.; Chen, X.; Xue, P.; Sun, H. H. Y.; Williams, I. D.; Sharpless, K. B.; Fokin, V. V.; Jia, G. Ruthenium-Catalyzed Cycloaddition of Alkynes and Organic Azides. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127* (46), 15998–15999. <https://doi.org/10.1021/ja054114s>.
- (59) Mascarin, A.; Valverde, I. E.; Vomstein, S.; Mindt, T. L. 1,2,3-Triazole Stabilized Neurotensin-Based Radiopeptidomimetics for Improved Tumor Targeting. *Bioconjugate Chem.* **2015**, *26* (10), 2143–2152. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.5b00444>.
- (60) Valverde, I. E.; Vomstein, S.; Fischer, C. A.; Mascarin, A.; Mindt, T. L. Probing the Backbone Function of Tumor Targeting Peptides by an Amide-to-Triazole Substitution Strategy. *J. Med. Chem.* **2015**, *58* (18), 7475–7484. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b00994>.
- (61) Staudinger, H.; Meyer, J. Über Neue Organische Phosphorverbindungen III. Phosphinmethylenderivate Und Phosphinimine. *Helvetica Chimica Acta* **1919**, *2* (1), 635–646. <https://doi.org/10.1002/hlca.19190020164>.
- (62) Horner, L.; Gross, A. Die Verwendung Der Phosphin-Imine Zur Einführung Primärer Aminogruppen Tertiäre Phosphine IV. *Justus Liebigs Annalen der Chemie* **1955**, *591* (1), 117–134. <https://doi.org/10.1002/jlac.19555910108>.
- (63) Burés, J.; Martín, M.; Urpí, F.; Vilarrasa, J. Catalytic Staudinger—Vilarrasa Reaction for the Direct Ligation of Carboxylic Acids and Azides. *J. Org. Chem.* **2009**, *74* (5), 2203–2206. <https://doi.org/10.1021/jo802825e>.
- (64) Garcia, J.; Urpí, F.; Vilarrasa, J. New Synthetic “Tricks”. Triphenylphosphine-Mediated Amide Formation from Carboxylic Acids and Azides. *Tetrahedron Letters* **1984**, *25* (42), 4841–4844. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(01\)81534-3](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(01)81534-3).
- (65) Zaloom, J.; Calandra, M.; Roberts, D. C. A New Synthesis of Peptides from Azides and Unactivated Carboxylic Acids. *J. Org. Chem.* **1985**, *50* (14), 2601–2603. <https://doi.org/10.1021/jo00214a048>.
- (66) Hickey, D. M. B.; Mackenzie, A. R.; Moody, C. J.; Rees, C. W. ChemInform Abstract: SYNTHESIS OF ISOQUINOLINES BY INTRAMOLECULAR AZA-WITTIG REACTION. *Chemischer Informationsdienst* **1984**, *15* (45). <https://doi.org/10.1002/chin.198445225>.

- (67) Saxon, E.; Bertozzi, C. R. Cell Surface Engineering by a Modified Staudinger Reaction. *Science* **2000**, *287* (5460), 2007–2010. <https://doi.org/10.1126/science.287.5460.2007>.
- (68) Griffin, R. J. 3 The Medicinal Chemistry of the Azido Group. In *Progress in Medicinal Chemistry*; Ellis, G. P., Luscombe, D. K., Eds.; Elsevier, 1994; Vol. 31, pp 121–232. [https://doi.org/10.1016/S0079-6468\(08\)70020-1](https://doi.org/10.1016/S0079-6468(08)70020-1).
- (69) Prescher, J. A.; Bertozzi, C. R. Chemistry in Living Systems. *Nat Chem Biol* **2005**, *1* (1), 13–21. <https://doi.org/10.1038/nchembio0605-13>.
- (70) Sletten, E. M.; Bertozzi, C. R. From Mechanism to Mouse: A Tale of Two Bioorthogonal Reactions. *Acc Chem Res* **2011**, *44* (9), 666–676. <https://doi.org/10.1021/ar200148z>.
- (71) Vugts, D. J.; Vervoort, A.; Stigter-van Walsum, M.; Visser, G. W. M.; Robillard, M. S.; Versteegen, R. M.; Vulders, R. C. M.; Herscheid, J. K. D. M.; van Dongen, G. A. M. S. Synthesis of Phosphine and Antibody-Azide Probes for in Vivo Staudinger Ligation in a Pretargeted Imaging and Therapy Approach. *Bioconjug Chem* **2011**, *22* (10), 2072–2081. <https://doi.org/10.1021/bc200298v>.
- (72) Saxon, E.; Armstrong, J. I.; Bertozzi, C. R. A “Traceless” Staudinger Ligation for the Chemoselective Synthesis of Amide Bonds. *Org. Lett.* **2000**, *2* (14), 2141–2143. <https://doi.org/10.1021/ol006054v>.
- (73) Hossain, M. B.; Van Der Helm, D.; Sanduja, R.; Alam, M. Structure of 6-Azidotetrazolo[5,1-a]Phthalazine, C₈H₄N₈, Isolated from the Toxic Dinoflagellate *Gymnodinium Breve*. *Acta Crystallographica Section C* **1985**, *41* (8), 1199–1202. <https://doi.org/10.1107/S0108270185007132>.
- (74) Tester, P. A.; Steidinger, K. A. *Gymnodinium Breve* Red Tide Blooms: Initiation, Transport, and Consequences of Surface Circulation. *Limnology and Oceanography* **1997**, *42* (5part2), 1039–1051. https://doi.org/10.4319/lo.1997.42.5_part_2.1039.
- (75) Saleh, A. M.; Wilding, K. M.; Calve, S.; Bundy, B. C.; Kinzer-Ursem, T. L. Non-Canonical Amino Acid Labeling in Proteomics and Biotechnology. *J Biol Eng* **2019**, *13* (1), 43. <https://doi.org/10.1186/s13036-019-0166-3>.
- (76) VanBrunt, M. P.; Shanebeck, K.; Caldwell, Z.; Johnson, J.; Thompson, P.; Martin, T.; Dong, H.; Li, G.; Xu, H.; D’Hooge, F.; Masterson, L.; Bariola, P.; Tiberghien, A.; Ezeadi, E.; Williams, D. G.; Hartley, J. A.; Howard, P. W.; Grabstein, K. H.; Bowen, M. A.; Marelli, M. Genetically Encoded Azide Containing Amino Acid in Mammalian Cells Enables Site-Specific Antibody–Drug Conjugates Using Click Cycloaddition Chemistry. *Bioconjugate Chem.* **2015**, *26* (11), 2249–2260. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.5b00359>.
- (77) Johansson, H.; Pedersen, D. S. Azide- and Alkyne-Derivatised α -Amino Acids. *European Journal of Organic Chemistry* **2012**, *2012* (23), 4267–4281. <https://doi.org/10.1002/ejoc.201200496>.
- (78) Agard, N. J.; Prescher, J. A.; Bertozzi, C. R. A Strain-Promoted [3 + 2] Azide–Alkyne Cycloaddition for Covalent Modification of Biomolecules in Living Systems. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126* (46), 15046–15047. <https://doi.org/10.1021/ja044996f>.
- (79) Baskin, J. M.; Prescher, J. A.; Laughlin, S. T.; Agard, N. J.; Chang, P. V.; Miller, I. A.; Lo, A.; Codelli, J. A.; Bertozzi, C. R. Copper-Free Click Chemistry for Dynamic in Vivo Imaging. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2007**, *104* (43), 16793–16797. <https://doi.org/10.1073/pnas.0707090104>.
- (80) MacKenzie, D. A.; Sherratt, A. R.; Chigrinova, M.; Cheung, L. L.; Pezacki, J. P. Strain-Promoted Cycloadditions Involving Nitrones and Alkynes—Rapid Tunable Reactions for Bioorthogonal Labeling. *Current Opinion in Chemical Biology* **2014**, *21*, 81–88. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2014.05.023>.
- (81) Debets, M. F.; van Berkel, S. S.; Dommerholt, J.; Dirks, A. (Ton) J.; Rutjes, F. P. J. T.; van Delft, F. L. Bioconjugation with Strained Alkenes and Alkynes. *Acc. Chem. Res.* **2011**, *44* (9), 805–815. <https://doi.org/10.1021/ar200059z>.

- (82) Sinsheimer, J. E.; Jagodić, V.; Polak, L. J.; Hong, D. D.; Burckhalter, J. H. Polycyclic Aromatic Isothiocyanate Compounds as Fluorescent Labeling Reagents. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **1975**, *64* (6), 925–930. <https://doi.org/10.1002/jps.2600640605>.
- (83) McKinney, R. M.; Spillane, J. T. An Approach to Quantitation in Rhodamine Isothiocyanate Labeling*. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1975**, *254* (1), 55–64. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1975.tb29155.x>.
- (84) Cooper, M. S.; Ma, M. T.; Sunassee, K.; Shaw, K. P.; Williams, J. D.; Paul, R. L.; Donnelly, P. S.; Blower, P. J. Comparison of ⁶⁴Cu-Complexing Bifunctional Chelators for Radioimmunoconjugation: Labeling Efficiency, Specific Activity, and in Vitro/in Vivo Stability. *Bioconjugate Chem.* **2012**, *23* (5), 1029–1039. <https://doi.org/10.1021/bc300037w>.
- (85) Rosa-Neto, P.; Wängler, B.; Iovkova, L.; Boening, G.; Reader, A.; Jurkschat, K.; Schirrmacher, E. [18F]SiFA-Isothiocyanate: A New Highly Effective Radioactive Labeling Agent for Lysine-Containing Proteins. *ChemBioChem* **2009**, *10* (8), 1321–1324. <https://doi.org/10.1002/cbic.200900132>.
- (86) Linder, K. E.; Wen, M. D.; Nowotnik, D. P.; Malley, M. F.; Gougoutas, J. Z.; Nunn, A. D.; Eckelman, W. C. Technetium Labeling of Monoclonal Antibodies with Functionalized BATOs. 1. TcCl(DMG)3PITC [Phenyl Isothiocyanate]. *Bioconjugate Chem.* **1991**, *2* (3), 160–170. <https://doi.org/10.1021/bc00009a005>.
- (87) Brown, W. E.; Green, A. H.; Cedel, T. E.; Cairns, J. Biochemistry of Protein-Isothiocyanate Interactions: A Comparison of the Effects of Aryl vs. Alkyl Isothiocyanates. *Environmental Health Perspectives* **1987**, *72*, 5–11. <https://doi.org/10.1289/ehp.87725>.
- (88) Szijj, P. A.; Bahou, C.; Chudasama, V. Minireview: Addressing the Retro-Michael Instability of Maleimide Bioconjugates. *Drug Discovery Today: Technologies* **2018**, *30*, 27–34. <https://doi.org/10.1016/j.ddtec.2018.07.002>.
- (89) Ravasco, J. M. J. M.; Faustino, H.; Trindade, A.; Gois, P. M. P. Bioconjugation with Maleimides: A Useful Tool for Chemical Biology. *Chemistry – A European Journal* **2019**, *25* (1), 43–59. <https://doi.org/10.1002/chem.201803174>.
- (90) Brewer, C. F.; Riehm, J. P. Evidence for Possible Nonspecific Reactions between N-Ethylmaleimide and Proteins. *Analytical Biochemistry* **1967**, *18* (2), 248–255. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(67\)90007-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(67)90007-3).
- (91) Fodje, M. N.; Al-Karadaghi, S. Occurrence, Conformational Features and Amino Acid Propensities for the Pi-Helix. *Protein Eng* **2002**, *15* (5), 353–358. <https://doi.org/10.1093/protein/15.5.353>.
- (92) Meyer, J.-P.; Adumeau, P.; Lewis, J. S.; Zeglis, B. M. Click Chemistry and Radiochemistry: The First 10 Years. *Bioconjugate Chem.* **2016**, *27* (12), 2791–2807. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.6b00561>.
- (93) Alley, S. C.; Benjamin, D. R.; Jeffrey, S. C.; Okeley, N. M.; Meyer, D. L.; Sanderson, R. J.; Senter, P. D. Contribution of Linker Stability to the Activities of Anticancer Immunoconjugates. *Bioconjugate Chem.* **2008**, *19* (3), 759–765. <https://doi.org/10.1021/bc7004329>.
- (94) He, R.; Finan, B.; Mayer, J. P.; DiMarchi, R. D. Peptide Conjugates with Small Molecules Designed to Enhance Efficacy and Safety. *Molecules* **2019**, *24* (10), 1855. <https://doi.org/10.3390/molecules24101855>.
- (95) Holub, J.; Meckel, M.; Kubíček, V.; Rösch, F.; Hermann, P. Gallium(III) Complexes of NOTA-Bis (Phosphonate) Conjugates as PET Radiotracers for Bone Imaging: ⁶⁸Ga-NO2A-BIS (PHOSPHONATE) CONJUGATES FOR BONE IMAGING. *Contrast Media Mol. Imaging* **2015**, *10* (2), 122–134. <https://doi.org/10.1002/cmml.1606>.
- (96) Apps, M. G.; Johnson, B. W.; Sutcliffe, O. B.; Brown, S. D.; Wheate, N. J. Amide Coupling Reaction for the Synthesis of Bispyridine-Based Ligands and Their Complexation to Platinum as Dinuclear Anticancer Agents. *J Vis Exp* **2014**, No. 87. <https://doi.org/10.3791/51740>.
- (97) García, A. L. L. T3P: A Convenient and Useful Reagent in Organic Synthesis. *Synlett* **2007**, *2007* (08), 1328–1329. <https://doi.org/10.1055/s-2007-980339>.

- (98) El-Faham, A.; Albericio, F. Peptide Coupling Reagents, More than a Letter Soup. *Chem. Rev.* **2011**, *111* (11), 6557–6602. <https://doi.org/10.1021/cr100048w>.
- (99) Al-Warhi, T. I.; Al-Hazimi, H. M. A.; El-Faham, A. Recent Development in Peptide Coupling Reagents. *Journal of Saudi Chemical Society* **2012**, *16* (2), 97–116. <https://doi.org/10.1016/j.jscs.2010.12.006>.
- (100) Sharma, S.; Buchbinder, N. W.; Braje, W. M.; Handa, S. Fast Amide Couplings in Water: Extraction, Column Chromatography, and Crystallization Not Required. *Org. Lett.* **2020**, *22* (15), 5737–5740. <https://doi.org/10.1021/acs.orglett.0c01676>.
- (101) I. Vrettos, E.; Sayyad, N.; M. Mavrogiannaki, E.; Stylos, E.; D. Kostagianni, A.; Papas, S.; Mavromoustakos, T.; Theodorou, V.; G. Tzakos, A. Unveiling and Tackling Guanidinium Peptide Coupling Reagent Side Reactions towards the Development of Peptide-Drug Conjugates. *RSC Advances* **2017**, *7* (80), 50519–50526. <https://doi.org/10.1039/C7RA06655D>.
- (102) Hermanson, G. T. *Bioconjugate Techniques*, Third edition.; Elsevier/AP: London ; Waltham, MA, 2013.
- (103) Rossin, R.; Renart Verkerk, P.; van den Bosch, S. M.; Vulders, R. C. M.; Verel, I.; Lub, J.; Robillard, M. S. In Vivo Chemistry for Pretargeted Tumor Imaging in Live Mice. *Angewandte Chemie International Edition* **2010**, *49* (19), 3375–3378. <https://doi.org/10.1002/anie.200906294>.
- (104) Lockett, M. R.; Phillips, M. F.; Jarecki, J. L.; Peelen, D.; Smith, L. M. A Tetrafluorophenyl Activated Ester Self-Assembled Monolayer for the Immobilization of Amine-Modified Oligonucleotides. *Langmuir* **2008**, *24* (1), 69–75. <https://doi.org/10.1021/la702493u>.
- (105) Knall, A.-C.; Slugovc, C. Inverse Electron Demand Diels–Alder (IEDDA)-Initiated Conjugation: A (High) Potential Click Chemistry Scheme. *Chemical Society Reviews* **2013**, *42* (12), 5131–5142. <https://doi.org/10.1039/C3CS60049A>.
- (106) Devaraj, N. K.; Weissleder, R.; Hilderbrand, S. A. Tetrazine-Based Cycloadditions: Application to Pretargeted Live Cell Imaging. *Bioconjugate Chem.* **2008**, *19* (12), 2297–2299. <https://doi.org/10.1021/bc8004446>.
- (107) Knall, A.-C.; Hollauf, M.; Slugovc, C. Kinetic Studies of Inverse Electron Demand Diels–Alder Reactions (IEDDA) of Norbornenes and 3,6-Dipyridin-2-Yl-1,2,4,5-Tetrazine. *Tetrahedron Letters* **2014**, *55* (34), 4763–4766. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2014.07.002>.
- (108) Schoch, J.; Staudt, M.; Samanta, A.; Wiessler, M.; Jäschke, A. Site-Specific One-Pot Dual Labeling of DNA by Orthogonal Cycloaddition Chemistry. *Bioconjugate Chem.* **2012**, *23* (7), 1382–1386. <https://doi.org/10.1021/bc300181n>.
- (109) Song, W.; Wang, Y.; Qu, J.; Madden, M. M.; Lin, Q. A Photoinducible 1,3-Dipolar Cycloaddition Reaction for Rapid, Selective Modification of Tetrazole-Containing Proteins. *Angewandte Chemie International Edition* **2008**, *47* (15), 2832–2835. <https://doi.org/10.1002/anie.200705805>.
- (110) Remy, R.; Bochet, C. G. Application of Photoclick Chemistry for the Synthesis of Pyrazoles via 1,3-Dipolar Cycloaddition between Alkynes and Nitrilimines Generated In Situ. *European Journal of Organic Chemistry* **2018**, *2018* (3), 316–328. <https://doi.org/10.1002/ejoc.201701225>.
- (111) Baranyai, Z.; Reich, D.; Vágner, A.; Weisenstein, M.; Tóth, I.; Wester, H.-J.; Notni, J. A Shortcut to High-Affinity Ga-68 and Cu-64 Radiopharmaceuticals: One-Pot Click Chemistry Trimerisation on the TRAP Platform. *Dalton Trans.* **2015**, *44* (24), 11137–11146. <https://doi.org/10.1039/C5DT00576K>.
- (112) Farkas, E.; Vágner, A.; Negri, R.; Lattuada, L.; Tóth, I.; Colombo, V.; Esteban-Gómez, D.; Platas-Iglesias, C.; Notni, J.; Baranyai, Z.; Giovenzana, G. B. PIDAZTA: Structurally Constrained Chelators for the Efficient Formation of Stable Gallium-68 Complexes at Physiological PH. *Chem. Eur. J.* **2019**, *25* (45), 10698–10709. <https://doi.org/10.1002/chem.201901512>.
- (113) Šimeček, J.; Schulz, M.; Notni, J.; Plutnar, J.; Kubiček, V.; Havlíčková, J.; Hermann, P. Complexation of Metal Ions with TRAP (1,4,7-Triazacyclononane Phosphinic Acid) Ligands and

- 1,4,7-Triazacyclononane-1,4,7-Triacetic Acid: Phosphinate-Containing Ligands as Unique Chelators for Trivalent Gallium. *Inorg. Chem.* **2012**, *51* (1), 577–590. <https://doi.org/10.1021/ic202103v>.
- (114) Notni, J.; Hermann, P.; Havlíčková, J.; Kotek, J.; Kubíček, V.; Plutnar, J.; Loktionova, N.; Riss, P. J.; Rösch, F.; Lukeš, I. A Triazacyclononane-Based Bifunctional Phosphinate Ligand for the Preparation of Multimeric ⁶⁸Ga Tracers for Positron Emission Tomography. *Chemistry – A European Journal* **2010**, *16* (24), 7174–7185. <https://doi.org/10.1002/chem.200903281>.
- (115) Laitinen, I.; Notni, J.; Pohle, K.; Rudelius, M.; Farrell, E.; Nekolla, S. G.; Henriksen, G.; Neubauer, S.; Kessler, H.; Wester, H.-J.; Schwaiger, M. Comparison of Cyclic RGD Peptides for Avβ3 Integrin Detection in a Rat Model of Myocardial Infarction. *EJNMMI Research* **2013**, *3* (1), 38. <https://doi.org/10.1186/2191-219X-3-38>.
- (116) Steiger, K.; Quigley, N. G.; Groll, T.; Richter, F.; Zierke, M. A.; Beer, A. J.; Weichert, W.; Schwaiger, M.; Kossatz, S.; Notni, J. There Is a World beyond Avβ3-Integrin: Multimeric Ligands for Imaging of the Integrin Subtypes Avβ6, Avβ8, Avβ3, and A5β1 by Positron Emission Tomography. *EJNMMI Research* **2021**, *11* (1), 106. <https://doi.org/10.1186/s13550-021-00842-2>.
- (117) Quigley, N. G.; Tomassi, S.; di Leva, F. S.; Di Maro, S.; Richter, F.; Steiger, K.; Kossatz, S.; Marinelli, L.; Notni, J. Click-Chemistry (CuAAC) Trimerization of an Avβ6 Integrin Targeting Ga-68-Peptide: Enhanced Contrast for in-Vivo PET Imaging of Human Lung Adenocarcinoma Xenografts. *ChemBioChem* **2020**, *21* (19), 2836–2843. <https://doi.org/10.1002/cbic.202000200>.
- (118) Burai, L.; Ren, J.; Kovacs, Z.; Brücher, E.; Sherry, A. D. Synthesis, Potentiometry, and NMR Studies of Two New 1,7-Disubstituted Tetraazacyclododecanes and Their Complexes Formed with Lanthanide, Alkaline Earth Metal, Mn²⁺, and Zn²⁺ Ions. *Inorg. Chem.* **1998**, *37* (1), 69–75. <https://doi.org/10.1021/ic970599c>.
- (119) Eisenwiener, K.-P.; Powell, P.; Mäcke, H. R. A Convenient Synthesis of Novel Bifunctional Prochelators for Coupling to Bioactive Peptides for Radiometal Labelling. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2000**, *10* (18), 2133–2135. [https://doi.org/10.1016/S0960-894X\(00\)00413-3](https://doi.org/10.1016/S0960-894X(00)00413-3).
- (120) Maze, J. R.; Stanwix, P. L.; Hodges, J. S.; Hong, S.; Taylor, J. M.; Cappellaro, P.; Jiang, L.; Dutt, M. V. G.; Togan, E.; Zibrov, A. S.; Yacoby, A.; Walsworth, R. L.; Lukin, M. D. Nanoscale Magnetic Sensing with an Individual Electronic Spin in Diamond. *Nature* **2008**, *455* (7213), 644–647. <https://doi.org/10.1038/nature07279>.
- (121) Rehor, I.; Mackova, H.; Filippov, S. K.; Kucka, J.; Proks, V.; Slegerova, J.; Turner, S.; Van Tendeloo, G.; Ledvina, M.; Hruby, M.; Cigler, P. Fluorescent Nanodiamonds with Bioorthogonally Reactive Protein-Resistant Polymeric Coatings. *ChemPlusChem* **2014**, *79* (1), 21–24. <https://doi.org/10.1002/cplu.201300339>.
- (122) Zemek, O. Organofosforové deriváty pro “click-chemistry.” **2013**.
- (123) Rudovský, J.; Kotek, J.; Hermann, P.; Lukeš, I.; Mainero, V.; Aime, S. Synthesis of a Bifunctional Monophosphinic Acid DOTA Analogue Ligand and Its Lanthanide(III) Complexes. A Gadolinium(III) Complex Endowed with an Optimal Water Exchange Rate for MRI Applications. *Org. Biomol. Chem.* **2005**, *3* (1), 112–117. <https://doi.org/10.1039/B410103K>.
- (124) Kotková, Z.; Helm, L.; Kotek, J.; Hermann, P.; Lukeš, I. Gadolinium Complexes of Monophosphinic Acid DOTA Derivatives Conjugated to Cyclodextrin Scaffolds: Efficient MRI Contrast Agents for Higher Magnetic Fields. *Dalton Trans.* **2012**, *41* (43), 13509–13519. <https://doi.org/10.1039/C2DT30858D>.
- (125) Gilchrist, T. L.; Wasson, R. C.; King, F. D.; Wootton, G. Intramolecular Cycloaddition of Azoalkenes Derived from Terminal Alkenoic and Alkynoic Acids. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1987**, No. 0, 2511–2516. <https://doi.org/10.1039/P19870002511>.
- (126) Shalamova, E. A.; Lee, Y.; Chung, G.; Semakin, A. N.; Oh, J.; Sukhorukov, A. Yu.; Arkhipov, D. E.; Ioffe, S. L.; Semenov, S. E. Synthesis of Tris(β,β,γ-Oximinoalkyl)Amines from Aliphatic Nitro

- Compounds and Methyl Vinyl Ketone. *Tetrahedron Letters* **2014**, *55* (6), 1222–1225. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2014.01.003>.
- (127) Motiwala, H. F.; Fehl, C.; Li, S.-W.; Hirt, E.; Porubsky, P.; Aubé, J. Overcoming Product Inhibition in Catalysis of the Intramolecular Schmidt Reaction. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135* (24), 9000–9009. <https://doi.org/10.1021/ja402848c>.
- (128) Yau, H. M.; Croft, A. K.; Harper, J. B. Investigating the Origin of Entropy-Derived Rate Accelerations in Ionic Liquids. *Faraday Discuss.* **2012**, *154*, 365–371. <https://doi.org/10.1039/C1FD00060H>.
- (129) Försterová, M.; Svobodová, I.; Lubal, P.; Tábořský, P.; Kotek, J.; Hermann, P.; Lukeš, I. Thermodynamic Study of Lanthanide(III) Complexes with Bifunctional Monophosphinic Acid Analogues of H4dota and Comparative Kinetic Study of Yttrium(III) Complexes. *Dalton Trans.* **2007**, No. 5, 535–549. <https://doi.org/10.1039/B613404A>.
- (130) Wang, Y.; Zhang, R.; Xu, N.; Du, F.-S.; Wang, Y.-L.; Tan, Y.-X.; Ji, S.-P.; Liang, D.-H.; Li, Z.-C. Reduction-Degradable Linear Cationic Polymers as Gene Carriers Prepared by Cu(I)-Catalyzed Azide–Alkyne Cycloaddition. *Biomacromolecules* **2011**, *12* (1), 66–74. <https://doi.org/10.1021/bm101005j>.
- (131) Wu, Y.; Weil, T. Recent Developments of Nanodiamond Quantum Sensors for Biological Applications. *Advanced Science* **2022**, *9* (19), 2200059. <https://doi.org/10.1002/advs.202200059>.
- (132) Sestito, S.; Pruccoli, L.; Runfola, M.; Citi, V.; Martelli, A.; Saccomanni, G.; Calderone, V.; Tarozzi, A.; Rapposelli, S. Design and Synthesis of H₂S-Donor Hybrids: A New Treatment for Alzheimer's Disease? *European Journal of Medicinal Chemistry* **2019**, *184*, 111745. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.111745>.
- (133) Gama, S.; Mendes, F.; Esteves, T.; Marques, F.; Matos, A.; Rino, J.; Coimbra, J.; Ravera, M.; Gabano, E.; Santos, I.; Paulo, A. Synthesis and Biological Studies of Pyrazolyl-Diamine PtII Complexes Containing Polyaromatic DNA-Binding Groups. *ChemBioChem* **2012**, *13* (16), 2352–2362. <https://doi.org/10.1002/cbic.201200472>.
- (134) Keller-Schierlein, W.; Mertens, P.; Prelog, V.; Walser, A. Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen 49. Mitteilung. Die Ferrioxamine A1, A2 Und D2. *Helvetica Chimica Acta* **1965**, *48* (4), 710–723. <https://doi.org/10.1002/hlca.19650480407>.
- (135) Ballini, R.; Barboni, L.; Giarlo, G. The First Conversion of Primary Alkyl Halides to Nitroalkanes under Aqueous Medium. *J. Org. Chem.* **2004**, *69* (20), 6907–6908. <https://doi.org/10.1021/jo049048b>.
- (136) Shi, W.; Tang, F.; Ao, J.; Yu, Q.; Liu, J.; Tang, Y.; Jiang, B.; Ren, X.; Huang, H.; Yang, W.; Huang, W. Manipulating the Click Reactivity of Dibenzozacyclooctynes: From Azide Click Component to Caged Acylation Reagent by Silver Catalysis. *Angewandte Chemie* **2020**, *132* (45), 20112–20116. <https://doi.org/10.1002/ange.202009408>.
- (137) Wang, X.; Gobbo, P.; Suchy, M.; Workentin, M. S.; Hudson, R. H. E. Peptide-Decorated Gold Nanoparticles via Strain-Promoted Azide–Alkyne Cycloaddition and Post Assembly Deprotection. *RSC Adv.* **2014**, *4* (81), 43087–43091. <https://doi.org/10.1039/C4RA07574A>.
- (138) Beck, S.; Schultze, J.; Räder, H.-J.; Holm, R.; Schinnerer, M.; Barz, M.; Koynov, K.; Zentel, R. Site-Specific DBCO Modification of DEC205 Antibody for Polymer Conjugation. *Polymers* **2018**, *10* (2), 141. <https://doi.org/10.3390/polym10020141>.
- (139) Chigrinova, M.; McKay, C. S.; Beaulieu, L.-P. B.; Udachin, K. A.; Beauchemin, A. M.; Pezacki, J. P. Rearrangements and Addition Reactions of Biarylazacyclooctynones and the Implications to Copper-Free Click Chemistry. *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *11* (21), 3436–3441. <https://doi.org/10.1039/C3OB40683K>.

Seznam příloh a deklarace podílu autora

A

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>.

O. Zemek se podílel na syntéze titulního ligandu.

B

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>.

O. Zemek optimalizoval a provedl syntézu titulního ligandu, provedl komplexační a konjugační NMR studie a podílel se na sepsání publikace.

C

Simeček, 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

O. Zemek syntetizoval titulní ligand a provedl konjugační NMR studie.

D

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>.

O. Zemek se podílel na syntéze ligandů a komplexů.

E

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>.

O. Zemek syntetizoval a charakterizoval všechny ligandy a komplexy s funkčními spojkami, podílel se na jejich návrhu a na sepsání publikace.

F

Zemek, O.; Notni, J.; Kossatz, S. Syntéza ligandu odvozeného od PIDAZTA s pnutým cykloalkynem (dosud nepublikováno).

O. Zemek se podílel na návrhu ligandu a syntetizoval jej.

Contribution to the publications

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>.


Ondřej Zemek participated on the synthesis of NOPO ligand.

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>.

Ondřej Zemek optimised and carried out synthesis of the title compound, performed complexation and conjugation NMR studies, participated on interpretation of results and on manuscript preparation.

Šimeček, 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.

Ondřej Zemek synthesized NOPO ligand and carried out conjugation NMR studies.



PD Dr. Johannes Notni

Corresponding author

Contribution to the publications

Chilla, S. N. M.; Zemek, O.; Kotek, J.; Boutry, S.; Larbanoix, L.; Slavons, 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>.

Ondřej Zemek participated in ligand and complex synthesis.



Prof Sophie Laurent

Head of the GOBC laboratory, MONS,
Belgium

Contribution to the publication

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>.

Ondřej Zemek carried out synthesis and characterisation of all ligands and complexes with functional linkers, contributed to their design and to manuscript preparation.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Petr Cigler', is positioned above a horizontal dotted line.

Mgr. Petr Cíglér, Ph.D

Corresponding author