

Univerzita Karlova v Praze  
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové  
Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv

---



## DIPLOMOVÁ PRÁCE

Syntéza asymetrických derivátů azaftalocyaninů III.

Hradec Králové 2007

Jana Stříbná

## Poděkování

Děkuji PharmDr. Petru Zimčikovi, PhD. a Mgr. Zbyňku Musilovi za jejich pomoc a trpělivost při vypracovávání této diplomové práce.

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1. Seznam zkratek</b>   | <b>5</b>  |
| <b>2. Teoretická část</b>  | <b>6</b>  |
| <b>2.1. Úvod</b>   | <b>6</b>  |
| <b>2.2. Historie PDT</b>   | <b>7</b>  |
| <b>2.3. Princip PDT</b>  | <b>9</b>  |
| 2.3.1. Mechanismus PDT   | 9         |
| 2.3.2. Fotofyzikální základ PDT  | 10        |
| 2.3.3. Fotochemický základ PDT   | 11        |
| 2.3.3.1. Fotoproces typu I   | 11        |
| 2.3.3.2. Fotoproces typu II  | 13        |
| 2.3.4. Biologická odpověď  | 14        |
| <b>2.4. Fotosenzitizéry</b>  | <b>15</b> |
| 2.4.1. Vlastnosti ideálního fotosenzitizéru  | 15        |
| 2.4.2. Typy fotosenzitizérů  | 18        |
| 2.4.2.1. První generace  | 18        |
| 2.4.2.2. Druhá generace  | 20        |
| <b>3. Cíl práce</b>  | <b>29</b> |
| <b>4. Metodická část</b>   | <b>30</b> |
| <b>4.1. Syntéza nesymetrických ftalocyaninů (Pc)</b>   | <b>30</b> |
| 4.1.1. Nesymetrický prekurzor  | 30        |
| 4.1.2. Dva různé prekurzory  | 31        |
| <b>5. Experimentální část</b>  | <b>37</b> |
| <b>5.1. Schéma prováděných reakcí</b>  | <b>38</b> |
| <b>5.2. Syntetická část</b>  | <b>40</b> |
| 5.2.1. Dibutylester kyseliny 2,3-dihydroxyjantarové (1)  | 40        |
| 5.2.2. Dibutylester kyseliny 2,3-dioxyjantarové (2)  | 40        |
| 5.2.3. Dibutylester 5,6-dikyanpyrazin-2,3-dikarboxylové kyseliny (3)   | 41        |
| 5.2.4. Syntéza nesymetrických AzaPc – obecný postup  | 41        |
| 5.2.4.1. [2,3,9,10,16,17-Hexakis(terc-butylsulfanyl)-23,24-bis(butoxykarbonyl)-1,4,8,11,15,18,22,25-(oktaaza)ftalocyaninato] zinečnatý komplex (6)         | 42        |
| 5.2.4.2. [2,3,16,17-Tetrakis(terc-butylsulfanyl)-9,10,23,24-tetrakis(butoxykarbonyl)-1,4,8,11,15,18,22,25-(oktaaza)ftalocyaninato] zinečnatý komplex (7) a | 43        |
| [2,3,9,10-tetrakis(terc-butylsulfanyl)-16,17,23,24-tetrakis(butoxykarbonyl)-1,4,8,11,15,18,22,25-(oktaaza)ftalocyaninato] zinečnatý komplex (8)            | 43        |
| 5.2.4.3. [2,3,9,10-Bis(terc-butylsulfanyl)-16,17,23,24-hexakis(butoxykarbonyl)-1,4,8,11,15,18,22,25-(oktaaza)ftalocyaninato] zinečnatý komplex (9)         | 43        |
| 5.2.4.4. [2,3,9,10,16,17,23,24-Oktakis(butoxykarbonyl)-1,4,8,11,15,18,22,25-(oktaaza)ftalocyaninato] zinečnatý komplex (10)                                | 44        |

|                   |           |
|-------------------|-----------|
| <b>6. Diskuse</b> | <b>45</b> |
| <b>7. Příloha</b> | <b>47</b> |

## 1. Seznam zkratek

ALA.....5-aminolevulánová kyselina

AzaPc.....azaftalocyanin

DBU.....1,8-diazabicyklo[5,4,0]undec-7-en

DMF.....dimethylformamid

HpD....."hematoporphyrine derivative"

ISC....."intersystem crossing"

LDL....."low density lipoproteins"

Pc.....ftalocyanin

PDT....."photodynamic therapy", fotodynamická terapie

PS.....fotosenzitizér

ROS....."reactive oxygen species", reaktivní formy kyslíku

SubPc.....subftalocyanin

THF.....tetrahydrofuran

## **2. Teoretická část**

### **2.1. Úvod**

Fotodynamická terapie (PDT – photodynamic therapy) je v dnešní době poměrně důležitou a velmi rychle se rozvíjející součástí nádorové léčby. Historie fotodynamické léčby sahá až k přelomu 19. a 20. století, ale teprve nyní se začala v praxi mnohem více využívat. Vedle již tradiční terapie solidních tumorů, jako je radioterapie, chemoterapie či chirurgie, nám nabízí řadu výhod: je poměrně neinvazivní, v dnešní době se dá již účinek omezit pouze na cílovou nádorově pozmeněnou tkáň, ale hlavně s minimálním výskytem vedlejších efektů, které jsou problémem klasické léčby<sup>1</sup>. Neexistují proto téměř žádné omezení ze strany dávkování (kromě zřídka se vyskytující přecitlivělosti) jako tomu bývá u radioterapie a dokonce i z kosmetického hlediska se tato cesta ukázala jako schůdnější. Problémem dnes ale zůstává způsob, jak ozářit světlem větší část těla, popřípadě celé tělo, v pokročilém stádiu onemocnění při použití dostatečně účinné dávky fotosenzitizéru<sup>2</sup>.

Princip PDT spočívá v aplikaci vhodného fotosenzitizéru (PS), který se dokáže kumulovat v cílové tkáni, následném ozáření místa světlem určité vlnové délky, při níž je absorpce PS maximální, a přítomnosti molekulárního kyslíku, bez něhož by celková účinnost PDT byla nulová. Energie vzniklá při excitaci PS se přesouvá na molekulu kyslíku, vznikají tím reaktivní formy kyslíku (volné radikály, singletový kyslík), které oxidativně poškozují nádorové buňky. Na základě biochemických, genetických a molekulárních změn dochází k destrukci buňky. PS během celého procesu funguje jako „katalyzátor“ a proto se může generovat větší množství singletového kyslíku díky jediné molekule PS<sup>3,4</sup>.

## 2.2. Historie PDT

Počátky využití světla v terapii lze datovat několik tisíc let nazpět, kdy světlo používaly některé starověké společnosti (Egyptané, Indové nebo Číňané) k léčbě kožních onemocnění, jako je psoriasis nebo vitiligo, infekcí způsobené rickettsiemi nebo dokonce u některých psychóz. V Egyptě se podávaly perorálně rostliny s obsahem psoralenů, které v kombinaci se slunečním zářením vykazovaly terapeutický efekt při léčbě vitiliga a později ve 12. století i leukodermy. Za Otce helioterapie pokládáme řeckého lékaře Hérodota, který zdůrazňoval vliv světla na obnovu zdraví.

Ovšem teprve až na přelomu 19. a 20. století se fototerapie začala užívat mnohem více. Na tom měl zajisté velkou zásluhu i dánský lékař Niels Finsen. Použitím ultrafialového světla léčil kožní formu tuberkulózy, za což dostal roku 1903 Nobelovu cenu. Průběhem fotodynamických reakcí se zabýval na počátku 20. století Oskar Raab na kulturách prvoků rodu *Paramecium*. Kombinace akridinu a světla měla na protozoa letální efekt. Von Tappeiner ukázal závislost těchto jevů na kyslíku, v roce 1903 pak publikoval spolu s dermatologem Jesionkem první klinické zkušenosti s užitím eosinu v léčbě kožních nádorů. Jako první také použil výraz „fotodynamický efekt“<sup>5</sup>.

V roce 1911 Hausmann zjistil, že hematoporfyrin v kombinaci se světlem zabíjí prvoky rodu *Paramecium* a červené krvinky. Syntézou mnohem účinnějších hemotoporfyrinových derivátů (Photofrin<sup>®</sup>, HpD) se zabýval v polovině 50. let minulého století Richard Lipson se svými spolupracovníky. Pokoušeli se zlepšit jejich schopnost kumulace v nádorové tkáni. První testování na lidech zrealizoval Lipson až roku 1972, kdy vyléčil pacienta s metastázami na hrudníku. V 70. letech provedl Dougherty poměrně úspěšnou preklinickou studii s 25 pacienty. Ze 113 primárních i sekundárních nádorů kůže se u 111 případů docílilo částečné nebo úplné nekrózy nádorových buněk, pouze dvě ložiska se ukázala být k léčbě rezistentní. Tím také dokázal, že HpD

a světlo z červené oblasti světelného spektra mohou selektivně zničit nádorové buňky bez poškození zdravé tkáně<sup>6</sup>.

Tím započal vývoj PDT. HpD nepatří mezi ideální fotosenzitizéry, proto jsou snahy upřeny k nalezení látky, která má co nejvýhodnější farmakodynamické i farmakokinetické vlastnosti<sup>2</sup>. V současné době je většina těchto látek, ať zkoušených nebo již používaných v praxi, založena na tetrapyrrolovém skeletu (porfyriny, chloriny, bakteriochloriny a ftalocyaniny) a vypadá to, že tyto látky budou i nadále v této oblasti dominovat.

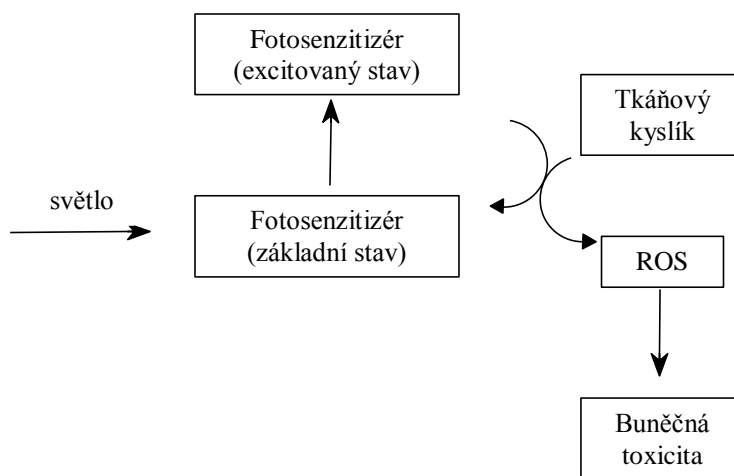


## 2.3. Princip PDT

### 2.3.1. Mechanismus PDT

Mechanismus PDT zahrnuje tři základní složky – fotosenzitizér, světlo dané vlnové délky a kyslík, jemuž excitovaný PS předává energii. Z molekulárního kyslíku se během této fotochemické reakce vytvoří jeho aktivní forma (zejména singletový kyslík) schopna zničit neoplastickou tkáň. Kromě toho svou úlohu hrají i indukované cévní uzávěry v ozářené oblasti vedoucí k nedostatku živin a kyslíku a v neposlední řadě k celé věci přispívá i aktivace imunitní odpovědi organismu<sup>4,7</sup>.

Celý mechanismus lze tedy popsat (viz obr. 1):



Obr. 1: Zjednodušený princip PDT

U světla používaného při PDT je jeho vlnová délka velmi důležitá. Světlo nízkých vlnových délek proniká živými tkáněmi jen do hloubky několika milimetrů a zasažená oblast je potom nedostatečná. Naopak při vysokých vlnových délkách má záření již nízkou energii a účinnost aktivace PS se ztrácí. Ideální rozpětí se tedy pohybuje v oblasti mezi 680-800 nm<sup>4</sup>.

Fotosenzitizér se obvykle podává intravenózně, rychle se distribuuje do tělesných tkání s následnou kumulací ve tkáni tumorózní. Není znám dosud přesný mechanismus tohoto vychytávání („uptake“), ale alespoň částečně je tento proces již objasněn. Pravděpodobnou příčinou je abnormální fyziologie nádorové tkáně (např.: nedostatečná lymfatická drenáž, zvýšená fagocytóza, větší propustnost cévní stěny, kyselejší pH), zvýšené množství receptorů pro LDL, které jsou schopny navázat PS a také abnormální složení stroma nádorové tkáně<sup>2</sup>.

Obecně lze tedy říci, že mechanismus PDT je založen na fotofyzikálních a fotochemických vlastnostech PS a jejich schopnosti produkovat cytotoxická agens, která následně způsobí buněčnou smrt<sup>7</sup>.

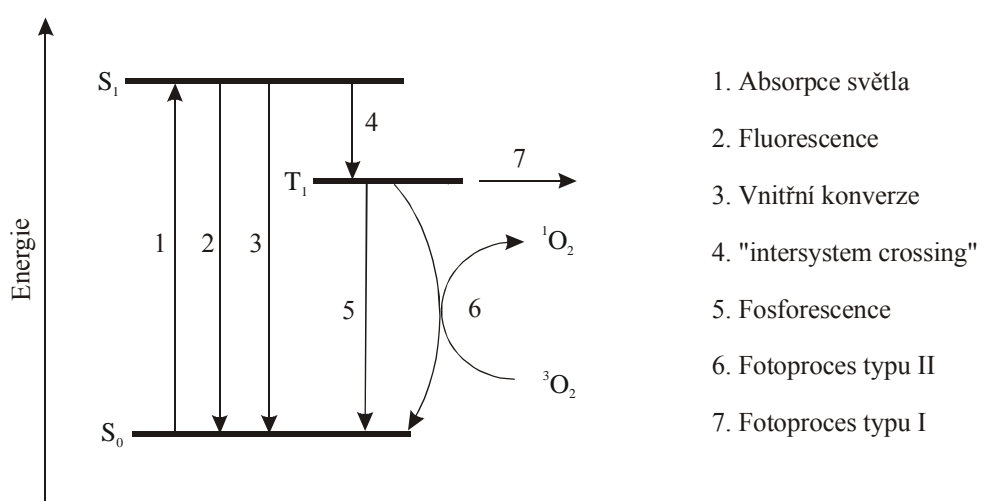
### **2.3.2. Fotofyzikální základ PDT**

Základní stav PS má dva elektrony s opačným spinem v molekulovém orbitalu s nízkou energií. Po světelné absorpci je jeden elektron excitován do orbitalu o vyšší energetické hladině a základní singletový <sup>1</sup>PS tak přechází na velmi krátkou chvíli (řádově nanosekundy) do stavu excitovaného (<sup>1</sup>PS\*). Z této hladiny může PS přecházet zpět do energeticky nižší hladiny hned několika způsoby a to buď procesy radiálními (emisí světla-fluorescencí), nebo neradiálními (vnitřní přeměnou-VP). Protože většina PS jsou látky schopny fluorescence, umožňují tak stanovení jejich množství v buňkách a tkáních a zároveň dovolují sledovat přímo farmakokinetické děje a distribuci PS u živých organismů<sup>4</sup>.

Důležitou součástí PDT představuje tzv. „intersystem crossing“ (ISC), při kterém dochází k inverzi spinu jednoho elektronu. <sup>1</sup>PS\* přechází do stavu relativně déle trvajícího (řádově mikrosekundy) - do excitovaného tripletového stavu (<sup>3</sup>PS\*). Tento proces je „spinem zakázaný“, PS v singletové stavu by měl správně přejít z tripletového stavu zpět do singletového. Tato sice

„nepovolená“ cesta není až tak preferovaná jako cesta „povolená“, ale dobrý PS prochází touto cestou poměrně s velkou pravděpodobností, což je pro fotodynamickou aktivitu velmi důležité<sup>4,8</sup>.

Z tripletového stavu se PS uvolňuje buď vyzářením fotonu ve formě fosforescence (triplet-singlet emise) nebo také dvěma procesy (fotoproces I a II), jež jsou základem vlastní PDT (hlavně fotoproces II). Oba se projevují současně a poměr mezi nimi je dán povahou použitého PS, koncentrací substrátu a kyslíku ve tkáni<sup>4</sup>.



Obr. 2: Jablonského diagram

### 2.3.3. Fotochemický základ PDT

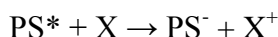
Jak již bylo řečeno, excitovaný tripletový stav  $^3PS^*$  může mimo emise fotonu fosforescencí podstoupit 2 následující procesy:

#### 2.3.3.1. Fotoproces typu I

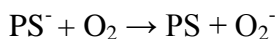
PS reaguje přímo se substrátem, rozpouštědlem nebo jiným PS. Dochází k přenosu protonu nebo elektronu na radikálovou formu iontu. Tyto radikály

jsou velmi reaktivní a mohou dále reagovat s molekulárním kyslíkem a vytvořit reaktivní formy kyslíku jako je např. superoxidový anion, nebo způsobit neopravitelné poškození. Tyto reakce způsobují oxidativní poškození a mohou eventuálně vést k cytotoxickému efektu pozorovaném v průběhu PDT<sup>4,8</sup>.

K tomuto procesu dochází především za snížené koncentrace kyslíku. Při úplné anoxii dojde k přenosu elektronu z excitovaného PS\* na okolní biologický substrát.



PS<sup>-</sup> může dále za hypoxie reagovat s kyslíkem za vzniku superoxidového anionu O<sub>2</sub><sup>-</sup>, který poskytuje reaktivní hydroxidový radikál HO· a právě ten se dále významně účastní oxidačních procesů.



Nebo dojde k přenosu elektronu rovnou. Výsledkem je radikál X·, vzniklý z biologického substrátu nebo okolního rozpouštědla, který pak reaguje přímo s kyslíkem, kdy vzniká buď superoxid anion radikál O<sub>2</sub><sup>-</sup> nebo přímo zafixují změnu v biologické molekule její oxidací XO. Samotný superoxid nemá příliš velkou oxidační aktivitu, ale vzájemnou reakcí (dismutací) mezi molekulami vznikají peroxid vodíku a kyslík.

V biologických systémech pak často probíhá tzv. Fentonova reakce, která zahrnuje přeměnu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na hydroxidový radikál HO· a hydroxidový iont HO<sup>-</sup>. Tato reakce je katalyzována kovovými ionty (např. Fe<sup>3+</sup>), ty jsou pomocí superoxidu jakožto donoru elektronu redukovány a následně schopny štěpit vazbu O-O v peroxidu vodíku.

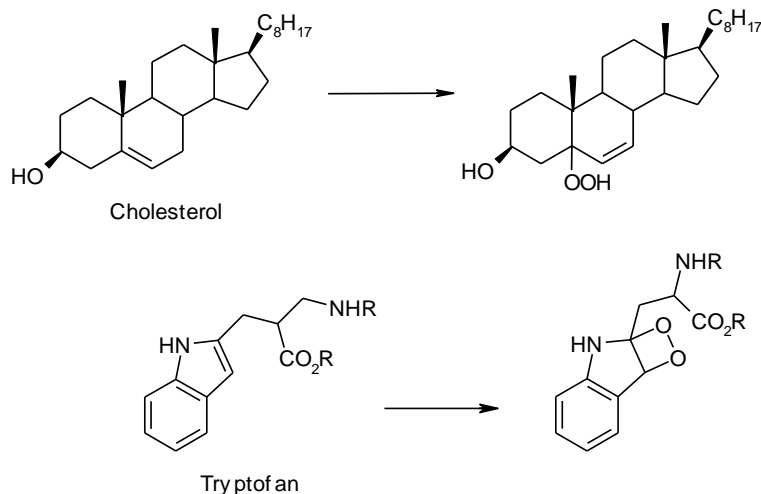
Tento vysoce reaktivní hydroxidový radikál podobně jako peroxid vodíku velice snadno prostupuje buněčnými membránami. Způsobuje další oxidativní změny a spolu s organickými substráty dává vznik dalším reaktivním radikálům, jako např. peroxidovému radikálu ROO·, který může dále napadat jiný organický substrát. Tento následný řetězec reakcí vysvětluje, proč hydroxidový radikál způsobuje tak rozsáhlé poškození<sup>4,8</sup>.

### 2.3.3.2. Fotoproces typu II

Tento fotoproces převažuje hlavně při vyšších koncentracích kyslíku ve tkáni. Jedná se o přenos energie z tripletového stavu PS na základní stav molekulárního kyslíku, což vede k vytvoření excitovaného stavu kyslíku známého jako singletový kyslík ( $^1\text{O}_2$ ). Vzniku této formy kyslíku předchází inverze spinu jednoho z jeho vnějších elektronů. Díky své vysoké reaktivitě může singletový kyslík reagovat s velkým množstvím biologických substrátů, způsobovat oxidativní poškození a buněčnou smrt<sup>7</sup>.

Doba života  $^1\text{O}_2$  je různá a liší se v závislosti na prostředí ve kterém se nachází. Předpokládá se však, že není schopen penetrovat hlouběji do tkání než jen přibližně na šířku buněčné membrány. Tím je v podstatě zaručena destrukce výhradně buněk obsahujících PS. Současně s tím lze, díky selektivní kumulaci v nádorové tkáni a následnému ozáření, umožnit poměrně přesně lokalizovaný zásah.

Aktivovaný kyslík reaguje s biologickým materiálem oxidací nebo cykloadicí. Terčem jsou především molekuly obsažené v membránách, cholesterol, nenasycené mastné kyseliny, DNA a aminokyseliny, např. cystein, methionin, tyrozin, histidin a tryptofan. Po poškození reaktivním kyslíkem přestávají plnit své biologické funkce a dochází k celkovému ireversibilnímu poškození buňky, popř. až k její smrti<sup>4</sup>.



Obr. 3: Příklad oxidace cholesterolu a cykloadice na aminokyselinu tryptofan

### 2.3.4. Biologická odpověď

Na konečném zničení nádoru se nepodílí, jak se zpočátku předpokládalo, pouze destrukce každé jednotlivé buňky, která akumulovala dostatečné množství PS a byla ozářena dostatečným množstvím světla potřebného k produkci reaktivní formy singletového kyslíku. Celkový PDT efekt je výsledkem spolupůsobení několika mechanismů.

V současnosti se předpokládají tři hlavní mechanismy, které umožňují krátkodobou i dlouhodobou kontrolu nádoru a podílí se na jeho konečném zničení. PS pomocí reaktivního singletového kyslíku ničí buď přímo maligní buňky v nádoru, způsobuje změny v cévním zásobování nádorové tkáně, nebo díky cytokinům a dalším mediátorům zánětu uvolněným z napadených buněk vede k aktivaci imunitního systému. Obecně se dá říct, že hydrofobní PS působí spíše přímým efektem na buňky, kdežto hydrofilní PS spíše poškozují cévy a brání tak přísunu živin. Jednotlivé složky ovšem nelze od sebe navzájem oddělovat a výsledek je vždy kombinací všech faktorů, jejichž vliv se mění v závislosti na použitém PS, typu nádoru a způsobu ozáření.

## 2.4. Fotosenzitizéry

Fotodynamicky aktivní sloučeniny můžeme nalézt jak mezi přírodními, tak mezi syntetickými barvivy. Hlavní charakteristikou PS je jejich schopnost kumulovat se v nemocné tkáni, kde začnou uvolňovat cytotoxické produkty nebezpečné pro nemocnou buňku a zároveň indukují požadované biologické efekty. Dnes už lze této cílené distribuci pomoci dalšími mechanismy, např.: lipozómy, konjugací s biomolekulami atd.<sup>9</sup>.

Součástí dnes běžně používaných typů PS v PDT je zpravidla porfyrinový skelet. Výzkum se tedy zaměřuje na syntézu nových látek odvozených od tohoto skeletu, jejichž vlastnosti se budou blížit stanoveným vlastnostem ideálního PS<sup>10</sup>.

### 2.4.1. Vlastnosti ideálního fotosenzitizéru

**Chemická čistota** – PS by měl být chemicky čistý a známého složení. Toto je problém u HpD, kde se jedná o směs mono-, di- a oligomerů derivatizovaného hematoporfyrinu. U novějších PS se jedná již většinou o dobře charakterizované látky (snad s výjimkou některých sulfonovaných ftalocyaninů, kdy u některých metod přípravy vznikají velice špatně separovatelné směsi mono-, di- a polysulfonovaných produktů o různé pozici a počtu sulfoskupin na základním makrocyclickém skeletu)

**Minimální toxicita ve tmě** – PS by měl být toxický pouze po ozáření světlem vlnové délky vhodné pro jeho aktivaci. Bez této aktivace jsou jeho jiné biologické účinky považovány za nežádoucí.

**Selektivní kumulace** – PS by měl vykazovat výrazně zvýšenou kumulaci v nádorové tkáni oproti jiným tkáním. Jedná se zejména o ukládání PS v kůži, kdy jeho přítomnost způsobuje např. u HpD následnou dlouhodobou (až 6 týdnů) kožní fotosenzitivitu, což je pro pacienty velice omezující.

**Rychlá exkrece** – Zbylý PS, jež zůstává v krevním řečišti po kumulaci v cílové tkáni, by mohl způsobovat systémovou toxicitu a proto je jeho rychlá exkrece z těla žádoucí.

**Kvalitní fotochemické vlastnosti** – Pro PS jsou žádoucí vysoký „triplet state quantum yield“ ( $\Phi_T$ ) a dlouhý „triplet state lifetime“ ( $\tau_T$ ), umožňující následně vysokou produkci hlavního cytotoxického agens singletového, kyslíku.

**Dobré spektrální vlastnosti** – Živé tkáně jsou pro elektromagnetické záření prostupné pouze v omezené míře, přičemž hloubka dostupnosti se zvyšuje se zvyšující se vlnovou délkou. Proto je potřebná silná absorpce s vysokými extinkčními koeficienty při delších vlnových délkách (v oblasti 650–800 nm), kde penetrační schopnosti světla jsou maximální a energie je stále dostačující pro účinnou produkci singletového kyslíku.

**Cena, dostupnost, modifikovatelnost** – Nezanedbatelnými vlastnostmi PS je také jejich cena, snadná dostupnost a případně jednoduchá možnost modifikace pro zlepšení farmakokinetických parametrů.

Jednou z obecných vlastností barviv a tudíž i PS, je tzv. „photobleaching“ neboli vyblednutí. Ve fotobiologii a fotochemii je photobleaching definován jako ztráta intenzity absorpce či emise způsobená světlem. U barviv dochází působením světla k chemickým změnám (ať už fotoadici, fotocyklizaci, ireverzibilní fotoredukcí nebo nejčastěji oxidací)<sup>11</sup>, v jejichž důsledku dochází



k narušení chromoforu. Jsou známy dva typy ireverzibilních chemických změn, fotomodifikace a tzv. "pravý photobleaching".

Při fotomodifikaci dochází ke ztrátě absorpce nebo fluorescence při určité vlnové délce, avšak chromofor zůstává zachován v modifikované formě.

Při pravém photobleachingu je chemický zásah hluboký a chromofor se rozpadá na malé fragmenty, jež nemají významnější absorpci ve viditelné oblasti.

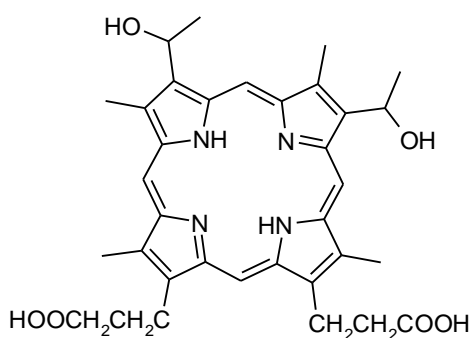
Důsledkem pro PDT (dochází většinou k pravému photobleachingu) je to, že PS už poté neabsorbuje světlo, kterému je tak umožněno proniknout do hlubších vrstev. Na druhou stranu ovšem rozložený PS je již neaktivní a nemůže vykazovat žádné cytotoxické vlastnosti. Photobleaching se může také podílet na rychlejšímu vylučování PS z těla díky jeho rozkladu v kůži<sup>12</sup>.

## 2.4.2. Typy fotosensitizerů

PS můžeme rozdělit do tří generací. První generaci tvoří HpD (popřípadě i deriváty Protoporfyriu IX), který byl donedávna nejrozšířenější a nejpoužívanější PS, ale pro značný počet jeho vedlejších negativních a i terapeuticky nevýhodných účinků je výzkum zaměřen na vhodnější deriváty porfyriu. Ty patří do druhé generace spolu s látkami odlišné chemické struktury. Do třetí generace řadíme PS deriváty porfyriu spojené s různými biomolekulami, které usnadňují distribuci látek v těle.

### 2.4.2.1. První generace

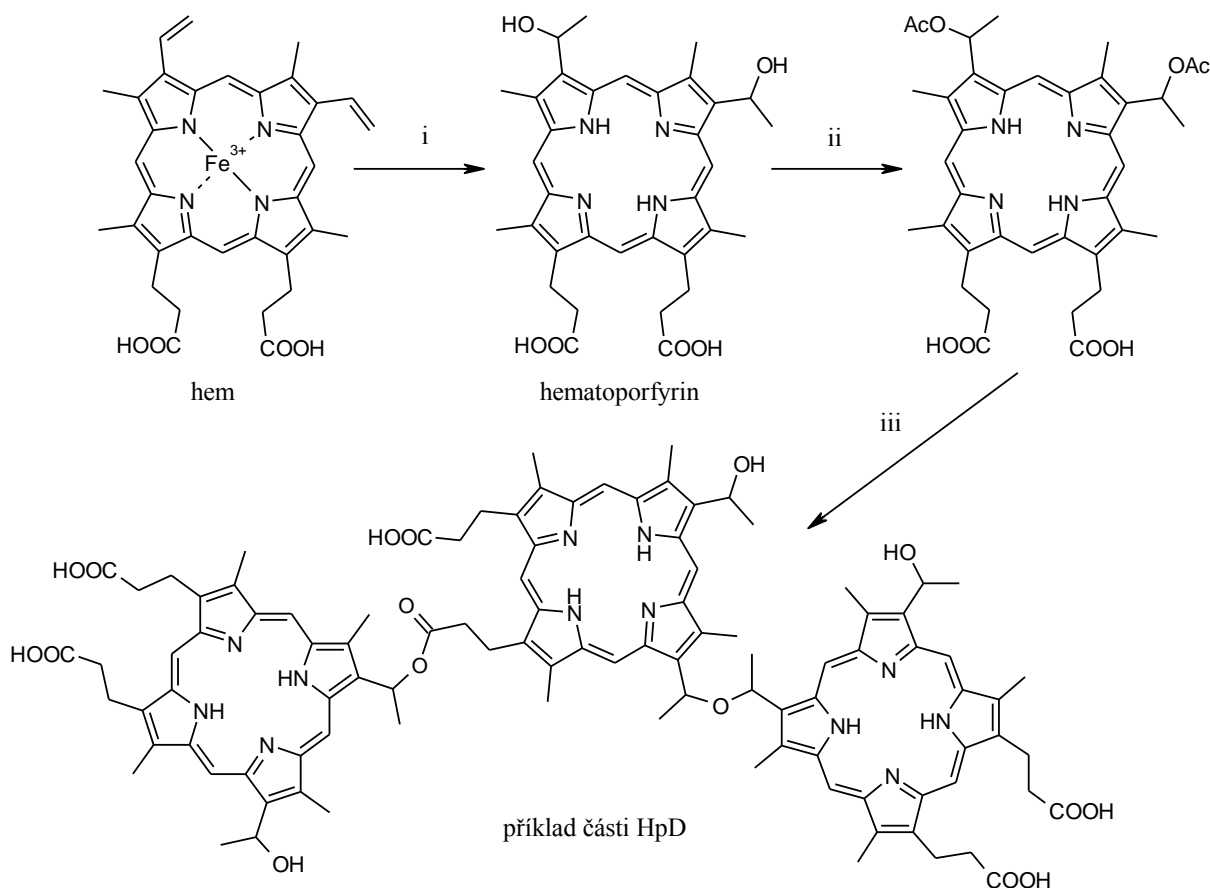
#### **Porfimer (HpD, Photofrin<sup>®</sup>, Photohem<sup>®</sup>, Photosan<sup>®</sup>)**



Obr. 4: Hematoporphyrin

Připravuje se z hemu, který se nejprve zbaví působením HBr v kyselině octové centrálního železa. HBr se naaduje na periferní dvojně vazby, potom se ve vodném prostředí brom odštěpí a vznikne hematoporphyrin, z něhož další úpravou reakčních podmínek (t.j. působení kyseliny sírové v kyselině octové a následná neutralizace hydroxidem sodným) získáme směs dimerů a oligomerů s jednotkami pospojovanými esterovými nebo éterovými vazbami (schéma reakce viz obr. 5). Tato směs byla dále částečně vyčištěna pomocí gelové chromatografie a stala se základem porfimeru, jež je ve formě sodné soli obsažen v přípravku Photofrin<sup>®</sup>. Ten byl vyvinut firmou QLT PhotoTherapeutics (Vancouver, Kanada) a poprvé zaveden k léčbě rakoviny

močového měchýře v roce 1993 v Kanadě jako první látka v PDT. Dnes patří práva na prodej Photofrinu<sup>®</sup> firmě AxcanPharma (Montreal, Kanada)<sup>13</sup>.



Obr. 5: Syntéza HpD. Reakční podmínky: i) HBr, k. octová, H<sub>2</sub>O, ii) H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, k. octová, iii) NaOH

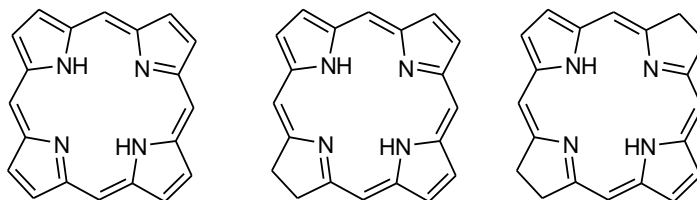
Mezi již výše zmíněné nevýhodné vlastnosti patří zejména jak velmi nízká vlnová délka vhodná pro aktivaci (630 nm), tak i nízký extinkční koeficient při této vlnové délce (1170 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>), takže je zapotřebí docela vysoká dávka PS a zároveň i vysoká dávka světla. Dalším problémem je velmi nesnadná reprodukovatelnost jeho složení, neboť i po důkladném vyčistění se směs skládá z více než 60 různých látek. Nemalé potíže jsou také způsobeny ne příliš selektivním vychytáváním HpD v nádorové tkáni, koncentruje se mimoto

v játrech, ledvinách a zejména v kůži (až 6 týdnů), což způsobuje dlouhodobou fotosenzitivitu nemocných<sup>14</sup>.

I přes výše uvedené nežádoucí účinky léčby se tento PS první generace stále používá, a to jak v léčbě prekancerózních stavů (např.: Barretův jícn)<sup>15</sup>, tak v léčbě samotné rakoviny (karcinom cervixu, jícnu, močového měchýře, žaludku, plic atd.) a nadále je testován na další druhy nádorových onemocnění nebo na různá jiná onemocnění (např.: psoriáza)<sup>2</sup>.

#### 2.4.2.2. Druhá generace

U látek druhé generace se absorpční maximum posouvá k vyšším vlnovým délkám (650-800 nm). To znamená, že je lze aktivovat světlem, které proniká mnohem hlouběji do tkání, než jak je tomu u generace první. Jsou to látky poměrně chemicky jednotné. Řadí se sem např. látky ze skupiny porfyrinů, jim příbuzných chlorinů a bakteriochlorinů, ftalocyaninů, naftalocyaninů, porfycenů, texafyrinů a dalších<sup>3</sup>.



Obr. 6: *porfyrin*

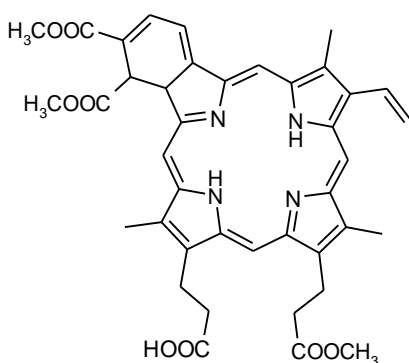
*chlorin*

*bakteriochlorin*

## CHLORINY

### **Verteporfin (BPD-MA, Visudyne™)**

Synonymum BPD-MA pochází z angličtiny benzoporphyrin-derivative monoacid ring A. Jako účinné látky s vhodnou vlnovou délkou okolo 690 nm se ukázaly deriváty s ortho-kondenzovaným benzenovým kruhem a jednou karboxylovou a jednou esterovou skupinou na porfyrinovém cyklu. Verteporfin



Obr. 7: verteporfin

je velice rychle absorbován (maximální koncentrace zhruba kolem 30-150 minut), ale taky velice rychle vylučován, tedy nehrozí tak velké riziko fotosenzibility.

Momentálně hlavní uplatnění má tato látka v oftalmologii při terapii stařecké makulární degenerace (AMD) nebo rakoviny. Byla uvedena na trh již roku 2000 pod obchodním názvem Visudyne™ firmou QLT PhotoTherapeutics<sup>16</sup>.

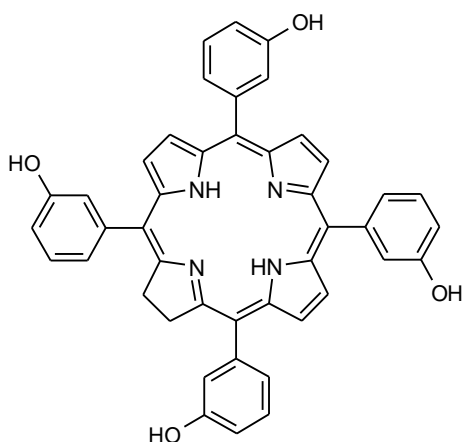
Je třeba brát ohledy na řadu vedlejších účinků verteporfinu. Kontraindikován je u nemocných s porfyrií nebo při přecitlivělosti na tuto látku. U dětí dosud nebylo dávkování stanoveno.

Dále byl objeven potenciál verteporfinu při terapii lokálních mykobakteriálních infekcí. Zatím byl testován pouze in vitro nebo in vivo na myších<sup>17</sup>.

Nyní probíhá několik studií, které ověřují možnost kombinace verteporfinu s ostatními léčivými, např. s triamcinolonem<sup>18</sup>.

## Temoporfin (*m*THPC, Foscan<sup>®</sup>)

Temoporfin (tetra(*meta*-hydroxyfenyl)chlorin, *m*THPC) patří do skupiny chlorinů. Má velmi vysoký extinkční koeficient, i když jeho absorpční maximum je docela nízké (zhruba kolem 652 nm). Také produkce singletového kyslíku je poměrně vysoká. Díky tomu je jedním z nejúčinnějších PS vůbec. Problém bývá se selektivitou vylučování temoporfinu nádorovými buňkami. Také fotosensitivita se u pacientů vyskytuje poměrně dlouho – doba mezi



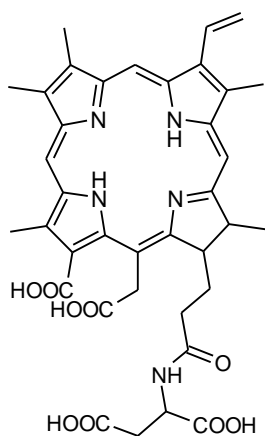
Obr. 8: temoporfin

parenterálním podáním a ozáření je zpravidla něco kolem 4 dní a v průběhu následujících 15 dní je pacient vysoce sensitivní na světlo.

Na trh byl zaveden roku 2001 firmou Biotech Pharma (Edinburgh) pod komerčním názvem Foscan<sup>®</sup>. Nejčastěji se užívá v terapii rakoviny mozku, kde nelze použít radioterapii, chemoterapii či chirurgický zákrok<sup>19</sup>, méně u rakoviny bronchů, žaludku nebo jícnu. Dále probíhají mnohé studie léčby jiných zhoubných novotvarů. Vhodný je při léčbě jícnové dysplazie (tzv. Barrettův jícen)<sup>20</sup>.

## Talaporfin (NPe6, MACE, talaporfin sodium, Laserphyrin<sup>®</sup>)

Talaporfin (mono N-aspartyl chlorin e6) řadíme do skupiny syntetických chlorinů. Absorpční maximum je posunuto k hodnotě 664 nm. Exkrece z tkání je poměrně rychlá, takže se pacient ozařuje 4 hodiny po intravenózním podání. Při aplikaci nízkých dávek se ústup nádoru projeví pouze krátkodobě, při aplikaci větších se zpravidla ztrácí selektivita.



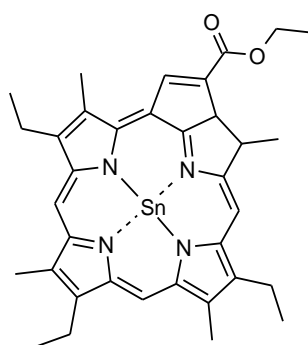
Obr. 9: talaporfin

kardiologii.

V současné době má své využití v terapii rakoviny plic (byla ukončena třetí fáze klinických zkoušek). Objevil se na japonském trhu pod názvem Laserphyrin<sup>®21</sup>. Ve třetí fázi je studie účinku talaporfinu na léčbu jaterního karcinomu (HCC, Hepatocellular Carcinoma)<sup>22</sup> a ve druhé fázi je klinické testování jeho účinku na metastáze kolonorektálního karcinomu do jater. Dále byla potvrzena prospěšnost talaporfinu v terapii stařecké makulární degenerace spolu s dalšími PS<sup>23</sup>. Zkoumá se i jeho využití v jiných oborech, např.

### Rostaporfin (Photrex<sup>®</sup>, Tin etiopurpurin, SnET2, Purlytin<sup>®</sup>)

Rostaporfin patří obecně také do skupiny chlorinů (resp. metalochlorinů - ve skeletu je navázán cín) a má srovnatelné vlastnosti s HpD (nutná větší dávka



Obr. 10: SnET2

světelného ozáření, aby bylo dosaženo potřebného účinku a relativně dlouhodobá kožní sensitivita pacientů). Absorpční maximum je vyšší (kolem 660 nm).

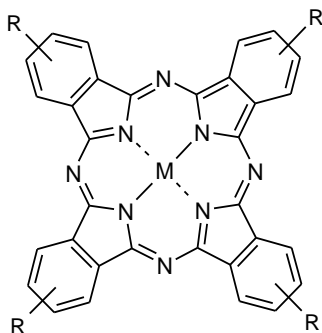
Pod obchodním názvem Photrex<sup>®</sup> zaregistrovala rostaporfin farmaceutická firma Miravant Medical Technologies (USA). Tato látka má potenciál hlavně v oftalmologii – např. v terapii AMD<sup>24</sup> (3. fáze studie zadané firmou Miravant na ověření účinku a bezpečnosti rostaporfinu začala v září r. 2005), rovněž při léčbě diabetické retinopatie nebo glaukomu<sup>25</sup>.

## PURPURINY, FEOFORBIDY, FEOFYTINY, FORBINY

### **Photochlor**

Patří rovněž do skupiny chlorinů, přesněji jde o derivát feoforbidu-a. Oproti Photofrinu<sup>®</sup> má výhodu vysoké selektivity k nádorové tkáni a současně mnohem nižší fototoxicity<sup>26</sup>.

### FTALOCYANINY (Pc)



Obr. 11: ftalocyaniny

Pc jsou strukturně podobné porfyrinu, s tím rozdílem, že pyrrolová jádra se spojují ne pomocí methinového můstku jak je tomu u porfyrinů, ale jsou spojeny přes dusík. Dále jsou na pyrrolová jádra přikondenzována 4 benzenová jádra, která mají tu funkci, že zvyšují absorpční maximum až k vlnovým délkám okolo 670-700 nm a zároveň zesilují absorpci při této délce ( $\epsilon = 200000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ).

Uvnitř celého cyklu se vyskytují chelátované kovy nebo polokovy (hlavně Zn, Al, Si), které také umožní těmto PS zvýšit jejich účinnost.

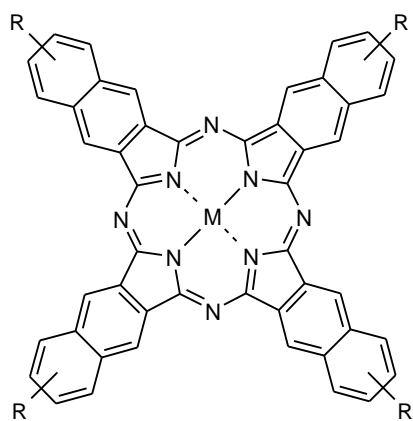
Problémem u těchto látek bývá jejich špatná rozpustnost jak ve vodě, tak i v organických rozpouštědlech. Aplikace je pak složitá a řeší se buď inkorporací léčiva do micel nebo lipozómů nebo se Pc naváže na vhodný nosič (cukry, polylysinové řetězce atd.).

Jednou z možností jak zvýšit rozpustnost může být sulfonace, při níž vzniká poměrně obtížně separovatelná směs sulfonových produktů. Zjistilo se, že disulfonované deriváty mají účinnost nejvyšší. Neseparovanou směs všech vzniklých sulfonových derivátů testují pod názvem Photosense v Rusku, kde se zaměřují hlavně na použití u nádorových onemocnění nebo také v oftalmologii<sup>27</sup>.



Dalším testovaným PS je Pc4 (křemičitý komplex ftalocyaninu). Právě probíhá první fáze klinického testování jeho účinku při terapii rakoviny kůže pod záštitou National Cancer Institute (NCI)<sup>28</sup>. Další možné využití by mohlo

být například ke sterilizaci krevních produktů nebo jako imunosupresivum.

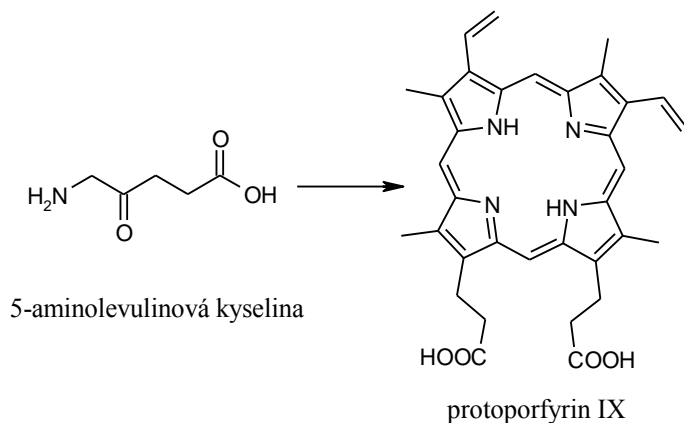


Obr. 12: naftalocyaniny

Přidáním dalšího benzenového kruhu (viz obr. 12) na periferii získáme naftalocyaniny. Přestože vlnové délky při nichž absorbují se tím posunou k ještě větším hodnotám (770 nm) a lze tak tyto látky použít v terapii vysoce pigmentovaných nádorů, nevýhodou zůstává jejich velmi špatná rozpustnost.

### 5-AMINOLEVULINOVÁ KYSELINA (ALA, Levulan<sup>®</sup>, Metvix<sup>®</sup>, Hexvix<sup>®</sup>,

Benzvix<sup>®</sup>)



5-aminolevulinová kyselina

protoporfyrin IX

Obr.13: Syntéza PpIX z kyseliny 5-aminolevulinové

Jedná se o látku tělu vlastní, neboť je součástí biosyntézy hemu. Prostřednictvím negativní zpětné vazby, kdy hladina hemu je zvýšená, dochází k inhibici konverze

glycinu a sukcylnikoenzymu A na ALA. Tím, že dodáme ALA exogenně, obejdeme tento kontrolní mechanismus a protoporfyrin IX (PpIX), který funguje jako spolehlivý PS, se může nadále syntetizovat. Ve zdravé tkáni

vzniká z PpIX pomocí ferrochelatasu fotodynamicky neaktivní hem, kdežto ve tkáni nádorové k této inkorporaci nedochází a PpIX se tedy kumuluje.

ALA používá firma DUSA Pharmaceuticals (Wilmington, Massachusetts) pod názvem Levulan<sup>®</sup> Kerastick<sup>®</sup> k terapii aktinoidní keratosy. Je používána topicky, hlavně na oblast obličeje a pokožky hlavy<sup>29</sup>.

Dále se zkoumá účinek ALA na acne vulgaris nebo jako nebolestivé ošetření bradavic (verruca vulgaris způsobené papilloma virem).

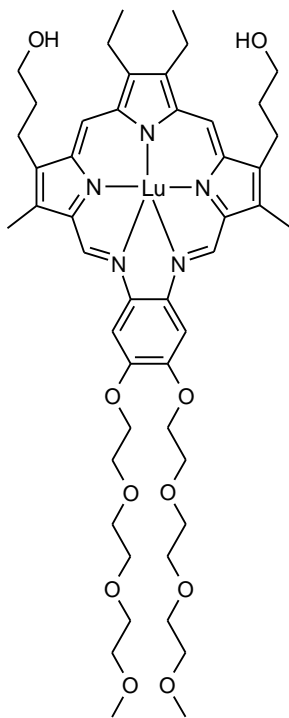
Ještě lepší než samotná kyselina 5-aminolevulinová jsou její estery, které lépe prostupují přes kůži. Samotnou ALA uvolňují až v tkáních hydrolyzou. Metvix<sup>®</sup> (methylester ALA) byl zaveden pro léčbu aktinoidní keratosy, rakoviny kůže, ale také k hojení různých ran nebo akné<sup>30</sup>. Hexvix<sup>®</sup> (hexylester ALA) se užívá v diagnostice a terapii rakoviny močového měchýře. Další výzkum je soustředěn i v oblasti gynekologie. Tyto produkty vyvinula norská firma PhotoCure (Oslo)<sup>31</sup>.

## TEXAFYRINY

### **Motexafin lutecium, gadolinium (Lutex, Optrin<sup>®</sup>, Antrin<sup>®</sup>, Xcytrin<sup>®</sup>)**

Motexafin je derivát texafyrinu (obsahuje pětiusíkaté makrocyclické jádro) s centrálním atomem lutecia nebo gadolinia. Má poměrně výhodné vlastnosti jako je jeho dobrá selektivita k nádorovým tkáním, nízká fotosensitivita nebo vysoké absorpční maximum (732 nm), díky němuž lze motexafin použít i při silně pigmentovaných nádorech jako je třeba maligní melanom. Exkrece je rychlá (ozařuje se 3 hodiny po aplikaci), často se podání opakuje.

Pod komerčním názvem Antrin<sup>®</sup> začala firma Pharmacyclics (Sunnyvale, USA) testovat motexafin lutecium. Látka nyní prochází první fází klinického testování jejího účinku v kardiologii při terapii aterosklerózy. Mechanismus



Obr. 14: motexafin lutecium

účinku spočívá v kumulaci léčiva v aterosklerotických plátech, kde po ozáření dochází k eliminaci makrofágů a buněk svaloviny, které se na tvorbě aterosklerotického plátu podílejí. Dalším produktem této firmy je motexafin gadolinium (Xcytrin<sup>®</sup>), které se nachází momentálně ve druhé, u mozkových nádorů ve třetí, fázi klinických testů. Mechanismus působení Xcytrinu je poněkud odlišný a není k němu zapotřebí světelné záření.. Kumuluje se přímo v nádorových buňkách, kde způsobí jejich apoptózu. Zároveň inhibuje thioredoxinreduktázu, což je enzym, který podporuje rakovinné bujení. Jeho předpokládané užití je v terapii rakoviny (metastáze rakoviny plic do mozku, dětské mozkové nádory, leukémie, myelom, rakovina ledvin, plic, hlavy, krku a další), ale také jako

detekční látka používaná MRI metodou při vizualizaci léčivých látek v tumorech<sup>32</sup>.

## DALŠÍ FOTOTSENZITIZÉRY

### **Porfyceny**

Pomocí modifikace na periférii dosáhneme velmi dobrých farmakokinetických vlastností. Aplikují se pouze topicky, hlavně tedy v terapii kožních onemocnění jako je např. psoriáza nebo nemelanotický kožní karcinom<sup>33</sup>.

## **Sarfyryny**

Patří do skupiny expandovaných porfyrinů, základní makrocykl obsahuje pět pyrrolických jader. Maximální absorpce se pohybuje okolo 675 nm. Jejich hlavní nevýhodou je pomalé dosažení  $c_{\max}$  ve tkáních (až po několika dnech)<sup>34</sup>.

## **Hypericin**

Hypericin je přírodní látka izolovaná z třezalky tečkované (*Hypericum perforatum*). Tzv. hypericismus (kožní podráždění, zvýšená teplota) se zpravidla objeví, pokud se po konzumaci vystavíme slunečnímu záření. Momentálně se zkoumá jeho antineoplastická aktivita, stejně jako vliv při léčbě proliferativní retinopatie<sup>35</sup>.

## **Methylenová modř**

Tento derivát fenothiazinu se používá k dekontaminaci čerstvě zmrazené plazmy. Pro člověka je netoxická, zato však inaktivuje viry. Účinnost methylenové modři je omezena poměrně rychlou enzymatickou redukcí na fotodynamicky neaktivní leukoformu<sup>3</sup>.

## **Rhodaminy**

Díky vysoké produkci fluorescence jsou využívány jako fluorescenční barviva. Zesílení jejich fotodynamického účinku dosáhneme substitucí těžkými atomy, např. bromací<sup>36</sup>. Bromovaný rhodamin se testuje při autotransplantační léčbě myeloidní leukémie<sup>37</sup>.

### 3. Cíl práce

Cílem této práce byla příprava nových nesymetrických AzaPc, které by obsahovaly různý počet elektron-odtahujících a elektron-poskytujících skupin. Jako elektron-odtahující substituent byla zvolena butoxykarbonylová skupina, jako elektron-poskytující substituent byla vybrána *terc*-butylsulfanyl skupina. Na základě již dříve zjištěných vlastností, *terc*-butylsulfanyl skupina výrazně inhibuje agregaci<sup>38</sup> a navíc zvyšuje produkci singletového kyslíku. Mým úkolem tedy bylo statistickou kondenzací připravit ze dvou odlišných prekurzorů směs šesti různých molekul AzaPc, tyto sloučeniny izolovat, vyčistit a charakterizovat. Tyto výsledky byly následně využity v souhrnné práci, která se zabývala vlivem těchto substituentů na fotofyzikální vlastnosti (UV-vis absorpce, produkce singletového kyslíku, fluorescence) připravených AzaPc.

## 4. Metodická část

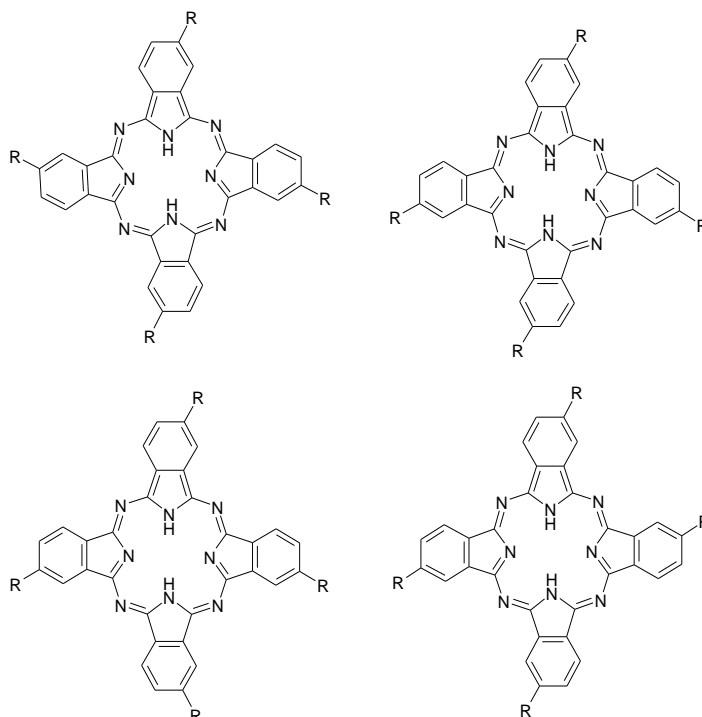
### 4.1. *Syntéza nesymetrických ftalocyaninů (Pc)*

Symetrické Pc se skládají ze čtyř stejných isoindolových kruhů spojených dohromady přes atomy dusíku. V poslední době je pozornost více než na syntézu symetrických Pc zaměřena spíše na syntézu nesymetrických molekul. Důvodem je snaha o změnu fyzikálních a chemických vlastností např. rozpustnost, posun v UV-vis, a zejména možnost specificky vázat molekulu Pc na daný nosič. Známe dva základní způsoby přípravy nesymetrických Pc v závislosti na typu prekurzoru:

1. nesymetrický prekurzor
2. dva různé prekurzory

#### 4.1.1. Nesymetrický prekurzor

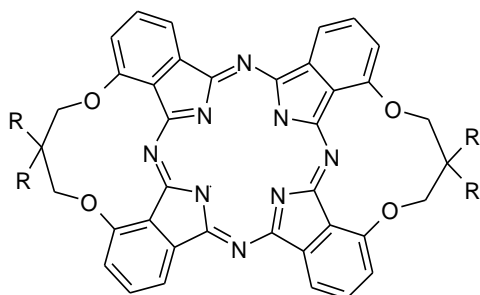
Pokud je prekurzorem nesymetricky substituovaný (např.: monosubstituovaný ftalonitril), získáme směs 4 různých izomerů. Jednotlivé konstituční izomery nelze až na výjimky<sup>39</sup> dost dobře charakterizovat a ani efektivně rozdělit díky jejich takřka shodným fyzikálně - chemickým vlastnostem.



Obr. 15: 4 konstituční izomery

Účinnější se zdá využití selektivní syntézy, která vede ke vzniku pouze jednoho ze čtyř možných izomerů.

Při statistickém přístupu ("statistical approach") lze po úpravě reakčních podmínek vyprodukovat pouze jeden z možných izomerů<sup>40</sup>. Mezi tyto úpravy zahrnujeme především snížení reakční teploty, přidání katalyzátoru (např.: alkoholát lithný), který usměrní reakci žadaným směrem, nebo přidání kovového nosiče, jako je např.:  $Zn^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ .

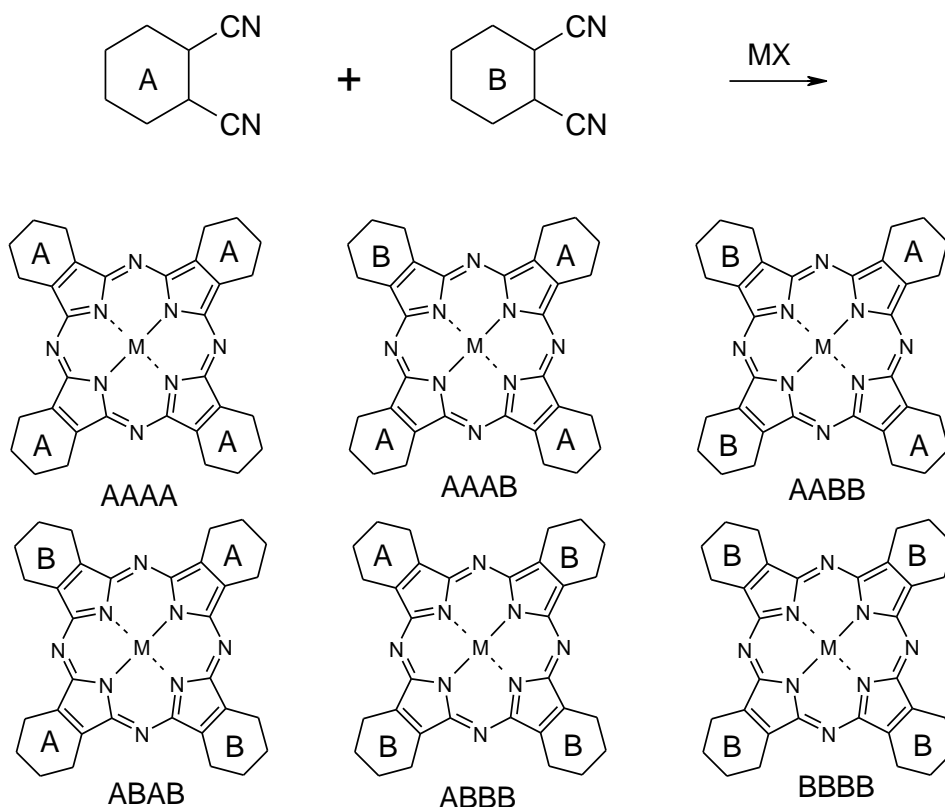


Obr. 16: Dimer složený ze 2 ftalonitrilových jednotek

Další přístup ("directed approach") spočívá v racionální konstrukci molekuly prekurzoru. Dvě molekuly ftalonitrilu jsou jednoduše spojeny vhodným spojovacím můstkem ("spacer"). Tím zaručíme syntézu pouze jednoho typu izomeru<sup>41</sup>.

#### 4.1.2. Dva různé prekurzory

Základní reakcí je tzv. statistická kondenzace, kdy za přítomnosti kovu nebo silné báze (DBU) vzniká ze dvou odlišných prekurzorů šest různých molekul - "kongenerů" (AAAA, AAAB, AABB, ABAB, ABAB, BBBB)<sup>42</sup>, z toho dvě molekuly jsou symetrické (AAAA a BBBB). Odlišný typ symetrie vykazují molekuly ABAB a AABB, které představují dva různé izomery  $A_2B_2$  ftalocyaninů. Pokud jsou stejné jednotky proti sobě (ABAB), označuje se tento izomer jako "opposite" (trans izomerie), pokud spolu stejné jednotky sousedí (AABB), nazýváme tento izomer jako "adjacent" (cis izomerie). Oba mají obdobné fyzikálně-chemické vlastnosti, tudíž je jejich separace velmi komplikovaná, ne však nemožná<sup>43</sup>.



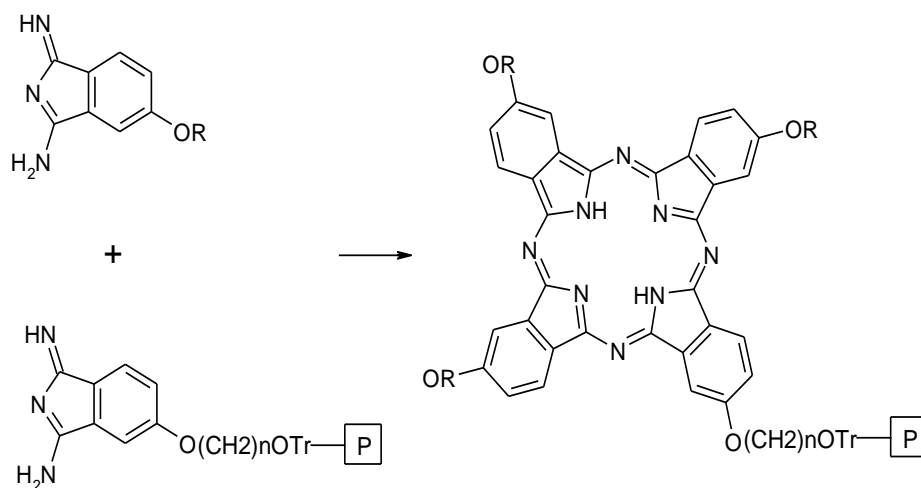
Obr. 17: 6 různých kongenerů

Většinou je vynaložena snaha o to, aby měl jeden z kongenerů ve vzniklé směsi dominantní zastoupení, a výsledná směs byla snadno dělitelná. Toho lze docílit několika způsoby:

- upravením poměru výchozích látek ve prospěch jednoho prekurzoru (pokud použijeme nadbytek látky A zhruba v poměru 3:1, obvykle 44% z celkového výtěžku tvoří látka A<sub>3</sub>B). Velký nadbytek jednoho z reaktantů se používá i v případech, kdy druhý prekurzor je příliš reaktivní.
- objemný substituent na prekurzoru B (např. substituovaný fenyl) redukuje počet možných Pc a zároveň zamezuje jejich agregaci. Většinou vzniknou A<sub>4</sub>, A<sub>3</sub>B nebo ABAB, naopak AABB, AB<sub>3</sub> a B<sub>4</sub> vznikají v zanedbatelném množství, jelikož jsou stericly bráněné.

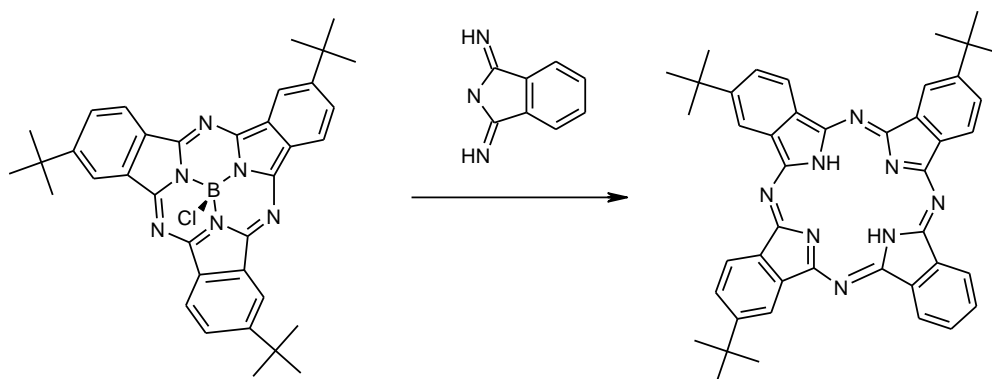


Další variantou je metoda objevena Leznoffem. Prekurzor (B) navázaný na polymer spolu s "volným" reaktantem (A) dávají vzniknout ftalocyaninu  $A_3B$  vázanému na polymer<sup>44</sup>.



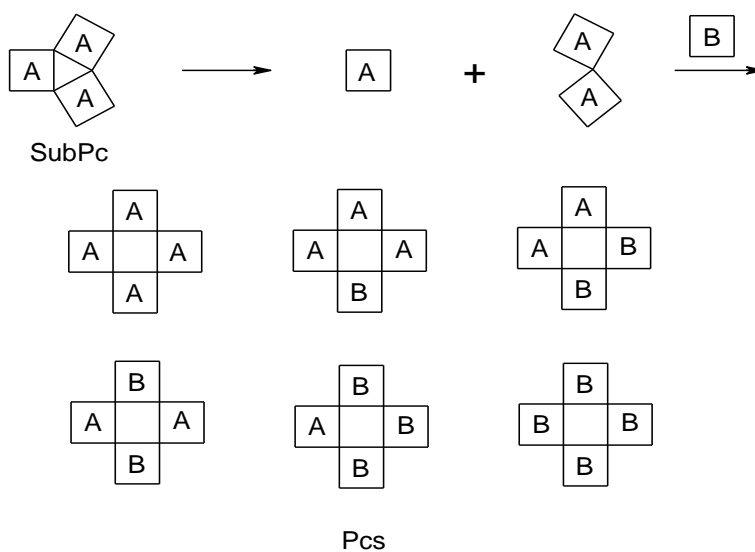
Obr. 18: Syntéza Pc vázaného na polymer

Dnes daleko více využívanou metodu objevil na konci 80. let Kobayashi<sup>45</sup>. Je založena na expanzi subftalocyaninového kruhu (subPc jsou nižší homology ftalocyaninů složené ze tří isoindolových podjednotek s borem jako centrálním atomem) při reakci se sukcinimidem nebo s diiminoisoindolinovými deriváty. Tato reakce je velmi selektivní při vzniku některých  $A_3B$  ftalocyaninů a dokonce se ukázala jako účinná při vývoji doposud nepřipravitelných derivátů (subPc reagují s méně reaktivními ftalonitrilovými deriváty v přítomnosti silné báze jako je např. DBU)<sup>46</sup>. Výsledek celé reakce závisí především na reakčních podmínkách a na charakteru výchozích prekurzorů. Výhodou této metody je poměrně vysoký výtěžek, který se dá ještě zvýšit přidáním kovového kationtu, snadné čištění produktu sloupcovou chromatografií a především selektivita celé reakce.<sup>47</sup>



Obr. 19: Expanze SubPc kruhu

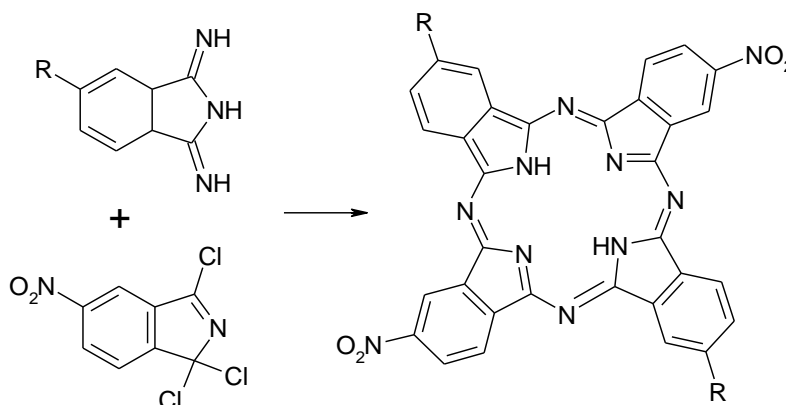
Na druhou stranu, částečnou nebo úplnou fragmentací subPc AAA můžeme dostat segmenty A nebo AA a následnou kondenzací s diiminoisoindolinovými deriváty všech 6 možných struktur Pc (obr. 20). Tudíž ani tato metoda není stoprocentně selektivní.



Obr. 20: Fragmentace SubPc kruhu

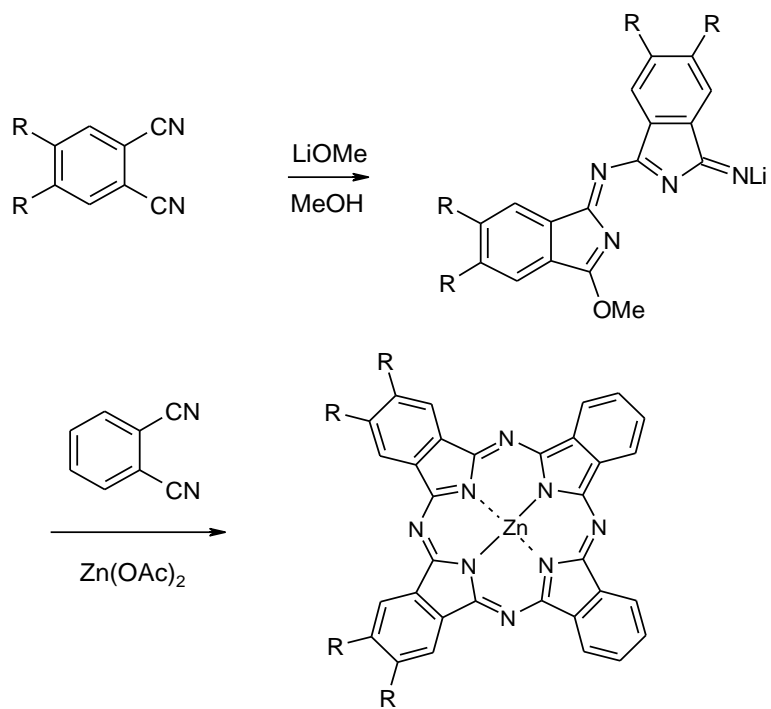
Dalším postupem použitelným k získání nesymetrických Pc je tzv. „cross coupling“ (obr. 21), což je záměrná syntéza při níž vzniká pouze produkt typu ABAB. V tomto případě se využívá reakce substituovaného 1,1,3-trichlorisoindolu s 1,3-diiminoisoindolinem<sup>40</sup>. Tato syntéza probíhá za velmi

mírných podmínkách za přítomnosti báze a redukčního činidla, přičemž výtěžek bývá poměrně vysoký<sup>48</sup>.



Obr. 21: cross coupling

K získání AABB izomeru (podle Leznoffa) se používá tzv. "half-Pc intermediát" (obr. 22). Tento reaktant následně kondenzuje s "klasickým" ftalonitrilem za velmi mírných podmínek. Nevýhodou tohoto přístupu je fakt, že stabilní a izolovatelný "half-Pc intermediát" musí být substituován pouze silně elektronegativní skupinou. Další varianta jak získat pouze izomer AABB je metoda, kdy použijeme 2 stejné jednotky (např. AA) spojené "spacerem" (viz. "directed approach")<sup>46</sup>.



Obr. 22: Použití half-Pc intermediátu

## 5. Experimentální část

Všechny chemikálie a rozpouštědla byla použita ve stejném stavu, v jakém byla zakoupena, kromě octanu zinečnatého (Lachema, Česká republika), který byl sušen v sušící pistolí při teplotě 78°C za podtlaku po dobu 8 hodin. Ostatní látky jsme získali: DMF - Aldrich, diaminomaleonitril a bezvodý DMF - Across Organics, CCl<sub>4</sub> - Lachema, Česká republika, ZnPc - Eastman Organic Chemicals, USA.

Průběh reakcí a čistota produktů a meziproductů byly kontrolovány tenkovrstvou chromatografií na deskách Silica gel 60 F<sub>254</sub> (Merck, Darmstadt).

Sloupcová chromatografie byla prováděna na silikagelu Merck Kieselgel 60 (0,040-0,063 mm).

IČ spektra byla získána v KBr peletách nebo v chloroformu na IČ spektrometru Nicolet Impact 400 IR-Spectrometer (USA).

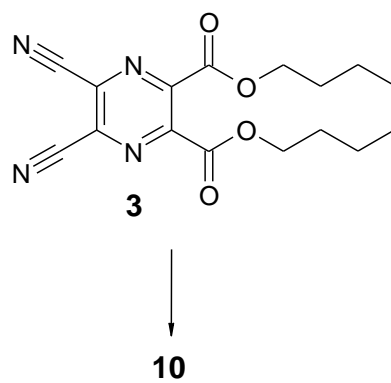
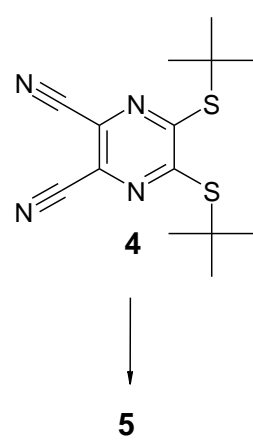
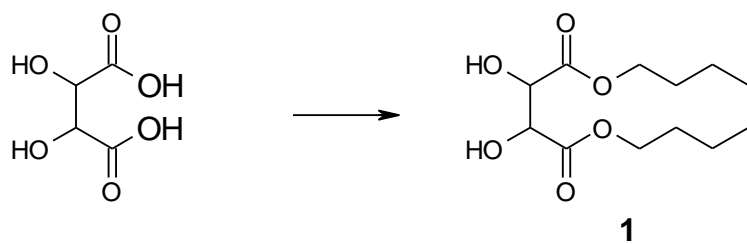
<sup>13</sup>C NMR a <sup>1</sup>H NMR spektra byla naměřena na Varian Mercury, VxBB 300 (299,95 MHz, <sup>1</sup>H 2 75,43 MHz, <sup>13</sup>C). Posuny jsou vztaženy k vnitřnímu standardu Si(CH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>.

UV-VIS spektra byla zaznamenána na spektrofotometru UV-2401PC (Shimadzu Europa GmbH, Duisburg, Germany).

Elementární analýzu jsme získaly na Automatic Microanalyser EA1110CE (Fisons Instruments S.p.a., Milano, Italy).

MALDI-TOF hmotnostní spektra byla naměřena v negativním módu na hmotnostním spektrometru Voyager-DE STR (Applied Biosystems, Framingham, MA, USA).

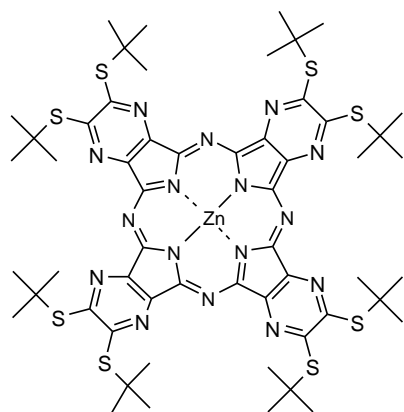
## 5.1. Schéma prováděných reakcí



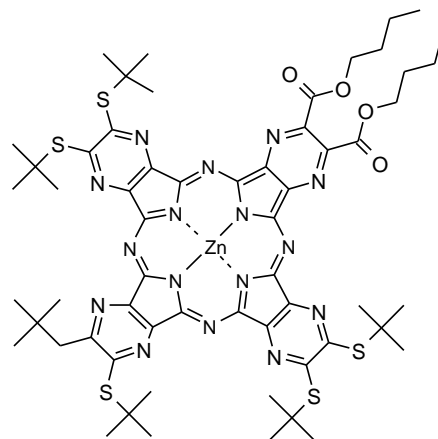
**3 + 4**

↓

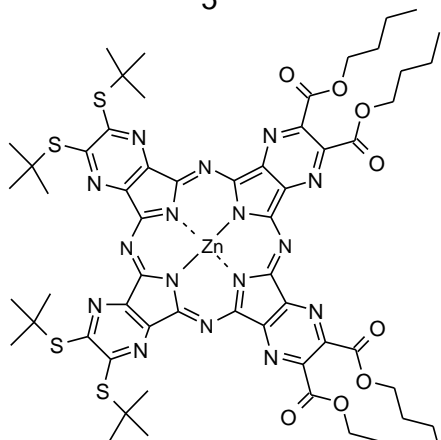
**5, 6, 7, 8, 9, 10**



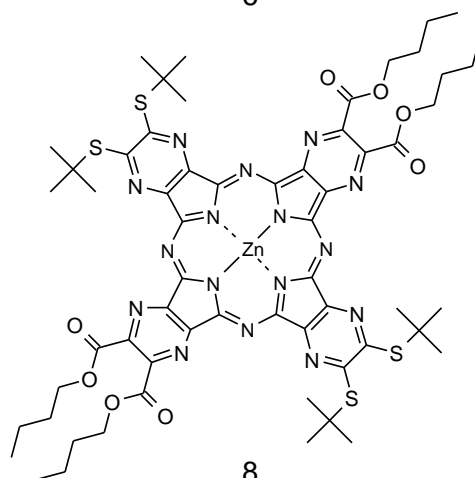
5



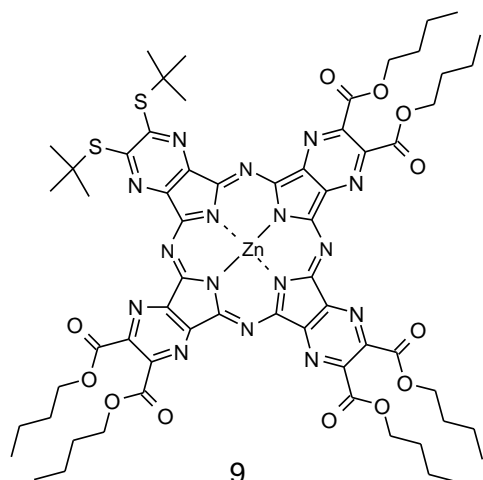
6



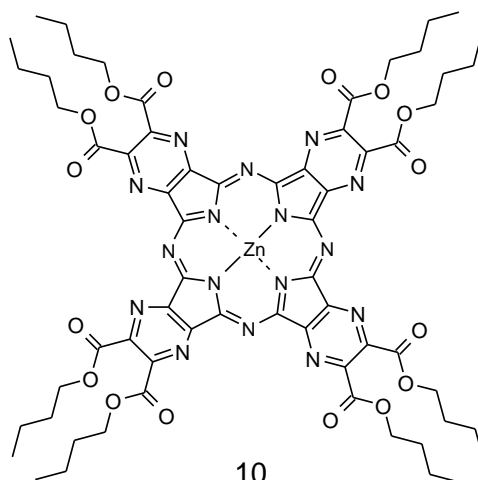
7



8



9



10

## 5.2. Syntetická část

Prekurzor (4) byl připraven již dříve na Katedře farmaceutické chemie a kontroly léčiv<sup>36</sup>.

### 5.2.1. Dibutylester kyseliny 2,3-dihydroxyjantarové (1)

Asi 10,8 g (33 mmol) vínanu draselno-sodného jsem vařila 2-3 hodiny v butanolu spolu s 29,3 g (100 mmol) kyseliny p-toluensulfonové. Po odpaření butanolu jsem vytřepala několikrát ve směsi chloroform/H<sub>2</sub>O. Z organické fáze jsem získala 10 g (74 %) výsledného produktu olejovité konzistence a žluté barvy.

<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 13,6; 18,9; 30,4; 66,2; 72,0; 171,6.

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 4,51 (s, 2H, CH); 4,18-4,32 (m, 4H, O-CH<sub>2</sub>); 3,18 (br s, 2H, OH); 1,60-1,72 (m, 4H, CH<sub>2</sub>); 1,31-1,46 (m, 4H, CH<sub>2</sub>); 0,93 (t, 6H, *J*=7,4 Hz, CH<sub>3</sub>).

### 5.2.2. Dibutylester kyseliny 2,3-dioxojantarové (2)

Ve 400 ml bezvodého CCl<sub>4</sub> jsem zahřívala pod zpětným chladičem suspenzi 17,8 g (100 mmol) N-bromsukcinimidu a 8,5 g (33 mmol) dibutylesteru kyseliny 2,3-dihydroxyjantarové (1). Po 2 hodinách jsem směs zchladila, zfiltrvala a sraženinu promyla diethyléterem. Po odpaření jsem filtrát rozpustila v diethyléteru (-20 °C) a zfiltrvala. Po odpaření mi zůstalo 7,4 g (86,3 %) produktu žluté barvy a olejovité konzistence.

IČ (CHCl<sub>3</sub>) 2964; 2936; 2876; 1746 (CO); 1466.



$^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  13,6; 18,9; 30,4; 66,2; 72,0; 171,6.

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  4,25 (t, 4H,  $J=6,9$  Hz, O- $\text{CH}_2$ ); 1,60-1,72 (m, 4H,  $\text{CH}_2$ ); 1,31-1,46 (m, 4H,  $\text{CH}_2$ ); 0,93 (t, 6H,  $J=7,4$  Hz,  $\text{CH}_3$ ).

### 5.2.3. Dibutylester 5,6-dikyanpyrazin-2,3-dikarboxylové kyseliny (3)

2,58 g (10,0 mmol) dibutylesteru kyseliny 2,3-dioxoantaronové (2) a 1,1 g (10,0 mmol) diaminomaleonitrilu jsem zahřívala 2 hodiny pod zpětným chladičem v ledové kyselině octové. Po odpaření rozpouštědla jsem produkt vyčistila pomocí sloupcové chromatografie, kdy jako mobilní fázi použijeme chloroform. Získáme 3,0 g (91,0 %) produktu olejovité konzistence.

IČ ( $\text{CHCl}_3$ ) 2964; 2936; 2876; 2245 (CN); 1739 (CO); 1465; 1411.

$^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  13,5; 18,9; 30,2; 67,9; 111,7; 133,3; 146,5; 161,5.

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  4,45 (t, 4H,  $J=6,7$  Hz, O- $\text{CH}_2$ ); 1,70-1,85 (m, 4H,  $\text{CH}_2$ ); 1,35-1,53 (m, 4H,  $\text{CH}_2$ ); 0,98 (t, 6H,  $J=7,4$  Hz,  $\text{CH}_3$ ).

### 5.2.4. Syntéza nesymetrických AzaPc – obecný postup

Směs 2,0 g (6,54 mmol) (4) a 3,5 g (16,0 mmol) bezvodého octanu zinečnatého v bezvodém DMF (cca 20 ml) jsem ponořila do olejové lázně předehřáté na 160 °C a míchala za stále teploty do doby než směs začne zelenat (zhruba 15 minut). Během následující hodiny jsem postupně přikapávala směs 3,0 g (9,1 mmol) (3) ve 20 ml DMF. Stabilní teplota byla udržována ještě další hodinu a půl. Poté jsem směs zchladila a nalila do 400 ml destilované vody. Vzniklou suspenzi jsem zfiltrovala, promyla destilovanou vodou a nechala na vzduchu vysušit. Následně jsem tuto směs šesti různých AzaPc dělila pomocí

sloupcové chromatografie za použití mobilní fáze chloroform/THF 30:1. Nejdříve se ze sloupce vymývá látka (5), jako druhá (6) a jako třetí směs izomerů (7) a (8). Po výměně mobilní fáze za chloroform/THF 14:1 a získáme AzaPc (9). Všechny takto izolované "kongenery" se následně několikrát dočišťovaly pomocí další sloupcové chromatografie s různými mobilními fázemi (viz níže). Symetrický AzaPc (10) byl připraven vlastní kondenzací a nebyl z této směsi separován.

5.2.4.1. [2,3,9,10,16,17-Hexakis(terc-butylsulfanyl)-23,24-bis(butoxykarbonyl)-1,4,8,11,15,18,22,25-(oktaaza)ftalocyaninato] zinečnatý komplex (6)

Tuto frakce se jsem chromatograficky vyčistila ve stejné fázi, tj. chloroform/THF v poměru 30:1, poté jsem poměr upravila na 14:1 (chloroform/THF). Konečný výtěžek čistého produktu (6) činil 57 mg (2,0 %).

IČ (KBr) 2960; 2919; 2873; 1735 (CO); 1517; 1456; 1363; 1252.

<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 13,9; 19,3; 29,7; 30,6; 51,4; 66,4.

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 4,37-4,54 (m, 4H, O-CH<sub>2</sub>); 1,90-2,62 (bs, 4H, CH<sub>2</sub>); 1,56-1,73 (m, 54H, CH<sub>2</sub>); 1,34-1,44 (m, 4H, CH<sub>2</sub>); 0,93-1,00 (t, 6H, *J*=7,3 Hz, CH<sub>3</sub>).

UV-vis (DMF) λ<sub>max</sub>, nm (ε) 656 (174500); 597 (21100); 394 (92000).

MALDI-TOF MS *m/z* 1312 (M-H<sup>+</sup>).

5.2.4.2. [2,3,16,17-Tetrakis(terc-butylsulfanyl)-9,10,23,24-tetrakis(butoxykarbonyl)-1,4,8,11,15,18,22,25-(oktaaza)ftalocyaninato] zinečnatý komplex (7) a

[2,3,9,10-tetrakis(terc-butylsulfanyl)-16,17,23,24-tetrakis(butoxykarbonyl)-1,4,8,11,15,18,22,25-(oktaaza)ftalocyaninato] zinečnatý komplex (8)

Obě tyto sloučeniny jsem izolovala ze směsi současně na základě podobných retenčních faktorů ( $R_F$ ). K čištění byla použita jako mobilní fáze chloroform/THF v poměru 14:1 a později 5:1. Výtěžek byl 42 mg (1,0 %).

IČ (KBr) 2960; 2930; 2873; 1733 (CO); 1457; 1363; 1248.

$^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  13,8; 19,2; 30,5; 51,8; 66,9.

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  4,17-4,95 (bs, 8H, O- $\text{CH}_2$ ); 0,34-2,66 (bs, 66H).

UV-vis (DMF)  $\lambda_{\text{max}}$ , nm ( $\epsilon$ ) 660 (194300); 599 (23100); 391 (83000).

MALDI-TOF MS  $m/z$  1336 ( $\text{M-H}^+$ ).

5.2.4.3. [2,3,9,10-Bis(terc-butylsulfanyl)-16,17,23,24-hexakis(butoxykarbonyl)-1,4,8,11,15,18,22,25-(oktaaza)ftalocyaninato] zinečnatý komplex (9)

Tuto frakci jsem vyčistila na sloupci použitím mobilní fáze chloroform/aceton 2:1. Výtěžek je 258 mg (6,3 %).

IČ (KBr) 2960; 2933; 2879; 1732 (CO); 1465; 1401; 1246.

$^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  13,6; 19,4; 30,5; 51,9; 67,1.

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  4,14-4,91 (bs, 12H, O- $\text{CH}_2$ ); 1,27-2,44 (bs, 42H); 0,72-1,24 (bs, 18H).

UV-vis (DMF)  $\lambda_{\text{max}}$ , nm ( $\epsilon$ ) 660 (159500); 602 (20700); 394 (55500).

MALDI-TOF MS  $m/z$  1360 ( $\text{M-H}^+$ ).

5.2.4.4. [2,3,9,10,16,17,23,24-Oktakis(butoxykarbonyl)-1,4,8,11,15,18,22,25-(oktaaza)ftalocyaninato] zinečnatý komplex (10)

600 mg (1,82 mmol) (**3**), 800 mg (3.65 mmol) bezvodého octanu zinečnatého a 10 ml bezvodého dimethylformamidu jsem míchala na olejové lázni přehřáté na 160 °C. Po 90 minutách vylila do asi 200 ml vody a nechala dalších 90 minut stát. Po zfiltrování jsem směs vysušila a vyčistila sloupcovou chromatografií s použitím mobilní fáze chloroform/aceton 2:1. Výtěžek byl 80 mg (12,7 %).

IČ (KBr) 2961; 2873; 1732 (CO); 1496; 1467; 1250.

<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 13,8; 19,1; 30,4; 67,4; 145,8; 148,8; 150,8; 164,3.

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 4,32-4,83 (bs, 16H, O-CH<sub>2</sub>); 1,72-2,11 (bs, 16H, CH<sub>2</sub>); 1,35-1,70 (bs, 16H, CH<sub>2</sub>); 0,75-1,20 (bs, 24H, CH<sub>3</sub>).

UV-vis (DMF) λ<sub>max</sub>, nm (ε) 659 (136500); 598 (18900); 393 (35100).

MALDI-TOF MS *m/z* 1384 (M-H<sup>+</sup>).

## 6. Diskuse

Dibutylester kyseliny 2,3-dioxojantarové (**2**) se podařilo připravit v poměrně dobrém výtěžku (86,3 %), problémem byly některé nečistoty (hlavně N-bromsukcinimid), které jsem odstranila až teprve extrakcí produktu do diethyléru. Následně jsme jednoduchou kondenzací (**2**) s diaminomaleonitrilem připravili dibutylester 5,6-dikyanpyrazin-2,3-dikarboxylové kyseliny (**3**).

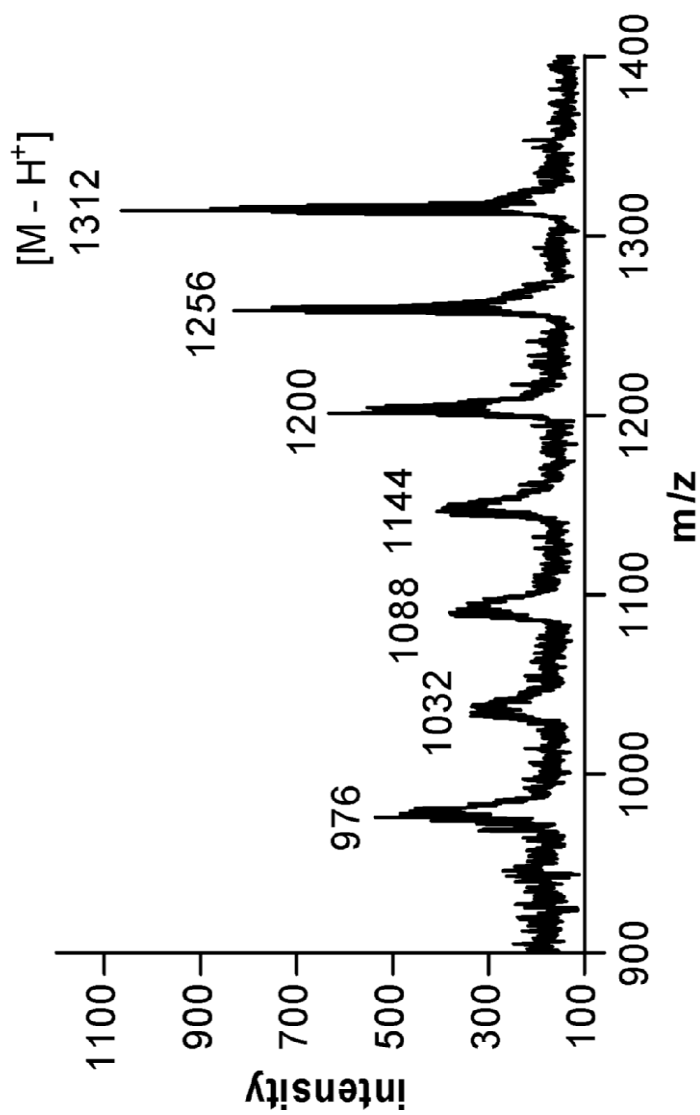
Z prekurzoru (**3**) a prekurzoru (**4**) vznikla statistickou kondenzací směs 6 různých AzaPc. Nejprve jsem cyklizaci zkoušela v různém prostředí (např.: dimethylaminoetanol, chinolin, apod.), ale nakonec se ukázala jako nejvhodnější cyklizace v prostředí DMF. Zároveň jsem musela počítat s odlišnou reaktivitou obou prekurzorů. Elektron-odtahující vlastnosti karboxylové skupiny podpořily rychlou kondenzaci samotného prekurzoru (**3**). Ve výsledné směsi se proto nacházely převážně látky (**5**) a (**10**), což není žádoucí. Po úpravě reakčních podmínek, kdy prekurzor (**3**) v malém množství DMF byl postupně v průběhu celé reakce po kapkách přidáván do zahříváné směsi prekurzoru (**4**) a bezvodého octanu zinečnatého v bezvodém DMF, jsem dosáhla optimálního poměru všech AzaPc ve vzniklé směsi.

Jednotlivé látky (**6**)-(9) jsem získala postupným dělením směsi pomocí sloupcové chromatografie. Bohužel se nepodařilo oddělit od sebe dva izomery (**7**) a (**8**) - "adjacent" AABB a "opposite" ABAB izomerie. Látky (**5**) a (**10**) se nacházely ve směsi také, což bylo potvrzeno jejich porovnáním s příslušnými standardy syntetizovanými samostatně tetramerizací pouze jednoho prekurzoru. Výhodnější je získat tyto symetrické molekuly samostatnou kondenzací, a proto nebyly tyto deriváty izolovány ze statistické směsi. Já jsem tímto způsobem připravila látku (**10**), látka (**5**) by se dala připravit pomocí již dříve publikovaných postupů<sup>41</sup>.

Při charakterizaci jednotlivých substancí se NMR ukázalo jako nevhodné. Některé signály se překrývaly, takže nebylo možné si struktury jednoznačně ověřit. Proto jsme použili spíše MALDI-TOF hmotnostní spektrometrii. Naměřené hodnoty odpovídaly hodnotám spočítaným. Struktura byla dále potvrzena přítomností fragmentů produktů, které vznikají po odštěpení isobutenu z *terc*-butyl sulfanylové skupiny<sup>49</sup>. U všech látek obsahujících tyto substituenty byly fragmenty nalezeny a jejich počet přesně odpovídal počtu výše zmiňovaných substituentů v molekule AzaPc. Příklad MS spektra látky (**6**) je v příloze.

## 7. Příloha

MS MALDI-TOF spektrum látky (6) se štěpy odpovídajícími odštěpeným šesti isobutenovým fragmentům.



- 
- <sup>1</sup> National Cancer Institute [online](2006)[cit. 2006-09-03]. Dostupné z: [www.cancer.gov](http://www.cancer.gov)
- <sup>2</sup> Brown, S. B., Brown, E. A., Walker, I. (2004). *Lancet Oncol.* **5**, 497-508.
- <sup>3</sup> Zimčik, P., Miletín, M. (2004) *Čes. Slov. Farm.* **53**, 271-279.
- <sup>4</sup> Zimčik, P., Miletín, M.(2004) *Čes. Slov. Farm.* **53**, 219-224.
- <sup>5</sup> Ackroyd, R., Kelty, C., Brown, N., Reed, M. (2001) *Photochem. Photobiol.* **74**, 656-669.
- <sup>6</sup> Dougherty, T. J., Grindey, G. B., Fiel, R., Weishaupt, K. R., Boyle, D. G. (1975) *J. Natl. Cancer Inst.* **55**, 115-121.
- <sup>7</sup> Sharman, W. M., Allen, C. M., Van Lier, J. E (2000) *Methods Enzymol.* **319**, 376-400.
- <sup>8</sup> Castano, A. P., Demidova, T. N., Hamblin, M. R. (2004) *Photodiagn. Photodyn. Ther.* **1**, 279-293.
- <sup>9</sup> Silva, J. N., Filipe, P., Morlière, P., Mazière, J. C., Freitas, J. P., Cirne de Castro, J. L., Santos, R., (2006) *Biomed Mater Eng.* **4**, 147-54.
- <sup>10</sup> Nyman, E. S., Hynninen, P. H. (2004) *J. Photochem. Photobiol. B, Biol.* **73**, 1-28.
- <sup>11</sup> Bonnet, R., Martínez, G. (2001) *Tetrahedron* **57**, 9513-9547.
- <sup>12</sup> Boyle, D. G., Potter, W. R. (1987) *J. Photochem. Photobiol. B, Biol.* **46**, 997-1001.
- <sup>13</sup> Marcus, S. L., McIntyre, W. R. (2002) *Expert Opin Emerg Drugs* **7**, 321-334.
- <sup>14</sup> Sharman, W. M., Allen, C. M., van Lier, J. E. (1999) *Drug Discov. Today* **4**, 507-517.
- <sup>15</sup> Panjehpour, M., Overholt, B. F. (2006) *Lasers Surg Med.* **38**, 390-395.
- <sup>16</sup> QLT, inc. [online] (2006) [cit. 2006-07-26]. Dostupné z: <http://www.qlt-pdt.com/QLTinc/main/mainpages.cfm?InternetPageID=143>
- <sup>17</sup> O'Riordan, K., Sharlin, D. S., Gross, J., Chang, S., Errabelli, D., Akilov, O. E., Kosaka, S., Nau, G. J., Hasan, T. (2006) *Antimicrob Agents Chemother.* **50**, 1828-1864.
- <sup>18</sup> ClinicalTrials gov [online] (2006) [cit. 2006-07-27]. Dostupné z: <http://clinicaltrials.gov/ct/gui/search;jsessionid=8D300FA1C62113B956F51A7A9B69F415?term=verteporphin&submit=Search>
- <sup>19</sup> Biolitec, Ltd. [online] (2006) [cit. 2006-07-26]. Dostupné z: <http://www.biolitecpharma.com/public/foscan.asp?s=foscan>
- <sup>20</sup> Lovat, L. B., Jamieson, N. F., Novelli, M. R., Mosse, C. A., Selvasekar, C., Mackenzie, G. D., Thorpe, S. M., Bown, S. G. (2005) *Gastrointest. Endosc.* **62**, 617-623.



- 
- <sup>21</sup> Lightsciences Oncology [online] (2007) [cit. 2007-03-02]. Dostupné z: <http://www.lightsciences.com/>
- <sup>22</sup> ClinicalTrials.gov [online] (2006) [cit. 2006-08-01]. Dostupné z: <http://www.clinicaltrials.gov/ct/show/NCT00355355?order=2>
- <sup>23</sup> Culham, L. (2006) *Ophthalmol. Physiol. Opt.* **26**, 215.
- <sup>24</sup> Amd.org [online] (2007) [cit. 2007-03-02]. Dostupné z: <http://www.amd.org/site/PageServer?pagename=pdf>
- <sup>25</sup> Miravant Medical Technologies [online] (2006) [cit. 2006-07-26]. Dostupné z: <http://www.miravant.com>
- <sup>26</sup> Bellnier, D. A., Greco, W. R., Nava, H., Loewen, G. M., Oseroff, A. R., Dougherty, T. J. (2006) *Cancer Chemother. Pharmacol.* **57**, 40-45.
- <sup>27</sup> Budzinskaia, M. V., Likhvantseva, V. G., Shevchik, S. A., Loshchenov, V. B., Kuz'min, S. G., Vorozhtsov, G. N. (2005) *Vestn Oftalmol.* **121**, 13-16.
- <sup>28</sup> ClinicalTrials.gov [online] (2007) [cit. 2007-03-05]. Dostupné z: <http://clinicaltrials.gov/ct/gui/show/NCT00103246?order=1>
- <sup>29</sup> DUSA Pharmaceuticals, Inc. [online] (2006) [cit. 2006-08-06]. Dostupné z: [http://www.dusapharma.com/products\\_levulan\\_brochures.html](http://www.dusapharma.com/products_levulan_brochures.html)
- <sup>30</sup> Fotinos, N., Campo, M.A., Popowycz, F., Gurny, R., Lange, N. (2006): *J. Photochem. Photobiol B, Biol.* **82**, 994-1015.
- <sup>31</sup> PhotoCure ASA [online] (2006) [cit. 2006-08-06]. Dostupné z: <http://photocure.com/?sectionId=275>
- <sup>32</sup> Pharmacyclics, Inc. [online] (2006) [cit. 2006-08-01]. Dostupné z: <http://www.pharmacyclics.com/>
- <sup>33</sup> Fickweiler, S., Abels, C., Karrer, S., Baumler, W., Landthaler, M., Hofstadter, F., Szeimies, R.M. (1999) *J Photochem Photobiol B, Biol* **48**, 27-35.
- <sup>34</sup> Král, V., Davis, V., Andrievski, A., Kralova, J., Synytsya, A., Pouckova, P., Sessler, J. L. (2002) *J. Med. Chem.* **45**, 1073-1078.
- <sup>35</sup> Agostinis, P., Vantieghem, A., Merlevede, W., de Witte, P. A. (2002) *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **34**, 221-241.
- <sup>36</sup> Lacerda, S. H., Abraham, B., Stringfellow, T. C., Indig, G. L. (2005) *Photochem Photobiol.* **81**, 1430-1438.

- 
- <sup>37</sup> Brasseur, N., Menard, I., Forget, A., el Jastimi, R., Hamel, R., Molfino, N. A., van Lier, J. E. (2000) *Photochem Photobiol.* **72**, 780-787.
- <sup>38</sup> Kostka, M., Zimcik, P., Miletin, M., Klemera, P., Kopecky, K., Musil, Z. (2006) *J Photochem Photobiol.A: Chem.***178**, 16-25.
- <sup>39</sup> Hanack, M., Schmid, G., Sommerauer, M., (1993) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **32**, 1422-1424.
- <sup>40</sup> Leznoff, C. C., Hu, M., Nolan, K. J. M., (1996) *Chem. Commun.*, 1245-1246.
- <sup>41</sup> Kobayashi, N., Kobayashi, Y., Osa, T. (1993) *J. Am. Chem. Soc.* **115**, 10994-10995.
- <sup>42</sup> Maizlish, V. E., Kulinich, V. P., Shaposhnikov, G. P. (2004) *Russ. J. Gen. Chem.* **74**, 1801-1817.
- <sup>43</sup> Zimčik, P., Miletín, M., Musil, Z., Kopecký, K., Kubza, L., Brault, D. (2006) *J. Photobiol. Photochem. A. Chem.* **183**, 59-69.
- <sup>44</sup> Leznoff, C. C., Hall, T. W. (1982) *Tetrahedron Lett.* **23**, 3023-3026.
- <sup>45</sup> Kobayashi, N., Kondo, R. Nakajima, S.-I., Osa, T. (1990) *J. Am. Chem. Soc.* **112**, 9640-9641.
- <sup>46</sup> Torre, G. de la, Claessens, Ch. G., Torres, T. (2000) *Eur. J. Org. Chem.* **16**, 2821-2831.
- <sup>47</sup> Torres, T. (2000) *J. Porphyrines Phtalocyanines* **4**, 325-330.
- <sup>48</sup> Dabak, S., Bekaroglu, O. (1997) *New J. Chem.* **21**, 267-271.
- <sup>49</sup> Musil, Z., Zimcik, P., Miletín, M., Kopecký, K., Link, M., Petrik, P., Schwarz, J (2006) *J. Porphyrins Phthalocyanines* **10**, 122-131.