

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA FARMACEUTICKÉ CHEMIE A KONTROLY LÉČIV



DIPLOMOVÁ PRÁCE

Syntéza derivátů chinoxalinoporfyrasinů jako potenciálně
biologicky aktivních látek I



Hradec Králové, 2009

Jaroslav Švec

Poděkování

Děkuji mému školiteli, PharmDr. Petru Zimčíkovi Ph.D., za pečlivé vedení a cenné rady.

Prohlášení

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpal, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány.

Dne:

Podpis:

Abstrakt

Název práce: Syntéza derivátů chinoxalinoporfyrazinů jako potenciálně biologicky aktivních látek I

Autor: Jaroslav Švec

Cílem mé diplomové práce bylo získat symetrický oktasubstituovaný tetrachinoxalinoporfyrazin (TQP) se specifickými vlastnostmi – s absorpčním maximem v oblasti 750 nm, s centrálním atomem zinkem, s dobrou rozpustností ve vodě. Nejprve jsem si připravil prekurzor 2,3-bis[2-(diethylamino)ethylsulfanyl]chinoxalin-6,7-dikarbonitril, který jsem následně použil do dalších syntéz. Příprava [2,3,11,12,20,21,29,30-oktakis(diethylaminoethylsulfanyl)tetra[6,7]chinoxalino-porfyrazinato] zinečnatého komplexu (ZnTQP) cyklizací prekurzoru s octanem zinečnatým v DMF nevyšla. Proto jsem tento požadovaný TQP získal přípravou hořečnatého komplexu, jeho odkovením a následnou reakcí s octanem zinečnatým. Rozpustnou formu ZnTQP připravil školitel (v mé přítomnosti) reakcí s ethyljodidem. Nové látky byly charakterizovány za použití standardních spektrálních metod (UV-vis, IČ, ^1H NMR, ^{13}C NMR, MS, elementární analýza).

Abstract

Title of diploma thesis: Synthesis of quinoxalinoporphyrazines as potentially active substances I

Author: Jaroslav Švec

The aim of my diploma thesis was synthesis of symmetrical octasubstituted zinc tetraquinoxalinoporphyrazine (TQP) with specific properties. In this work, 2,3-bis[2-(diethylamino)ethylsulfanyl]-quinoxaline-6,7-dicarbonitrile was chosen as the starting material.

The synthesis of 2,3,11,12,20,21,29,30-Octakis[2-(diethylamino)ethylsulfanyl]tetra[6,7]-quinoxalinoporphyrazine zinc(II) (ZnTQP) by the cyclization of precursor with zinc acetate in DMF failed. That is why, I prepared the magnesium complex of TQP first, then I obtained the metal-free TQP from it using acid (HCl). Incorporation of Zn ions into the center of TQP was accomplished by treatment of the metal-free derivative with zinc acetate. Finally, ZnTQP was treated with ethyliodide and the water soluble ZnTQP, with quaternary ammonium groups, was obtained. The new compounds were characterized by using standard spectral methods (UV-vis, IR, ^1H NMR, ^{13}C NMR, mass spectra, elemental analysis).

Obsah

1. Seznam zkratek	8
2. Teoretická část.....	9
2.1. Úvod.....	9
2.2. Princip PDT	9
2.3. Historický pohled.....	10
2.4. Mechanismus PDT.....	11
2.4.1. Fotoproces typu I.....	12
2.4.2. Fotoproces typu II.....	13
2.5. Reakce na léčbu PDT	14
2.6. Fotosensitizéry	15
2.7. Zdroje záření	22
2.8. Uplatnění PDT	23
2.9. Spojení PDT s jinými postupy léčby	24
3. Cíl práce	26
4. Metodická část.....	27
4.1. Prekurzory pro syntézu tetrachinoxalinoporfyrazinů	27
4.2. Cyklizační postupy při syntéze ftalocyaninů.....	29
5. Experimentální část	33
5.1. Schéma prováděných reakcí	34
5.2. Příprava prekurzoru.....	37
5.2.1. Příprava 2,3-bis[2-(diethylamino)ethylsulfanyl] chinoxalin-6,7- dikarbonitrilu (2).....	37
5.3. Příprava tetrachinoxalinoporfyrazinů	38
5.3.1. Příprava látky 2 před reakcí	38
5.3.2. Příprava [2,3,11,12,20,21,29,30- oktakis(diethylaminoethylsulfanyl)tetra[6,7]chinoxalinoporfyrazinato] zinečnatého komplexu (3).....	38

5.3.3. Příprava [2,3,11,12,20,21,29,30- oktakis(diethylaminoethylsulfanyl)tetra[6,7]chinoxalinoporfyrazinato] hořečnatého komplexu (4).....	39
5.3.4. Příprava 2,3,11,12,20,21,29,30- oktakis(diethylaminoethylsulfanyl)tetra[6,7]chinoxalinoporfyrazinu (5)	40
5.3.5. Příprava [2,3,11,12,20,21,29,30- oktakis(diethylaminoethylsulfanyl)tetra[6,7]chinoxalino-porfyrazinato] zinečnatého komplexu (3).....	41
5.3.6. Příprava oktajodidu 2,3,11,12,20,21,29,30- oktakis(triethylammonioethylsulfanyl)tetra- [6,7]chinoxalinoporfyrazinato zinečnatého komplexu (6).....	42
6. Diskuse.....	44
7. Závěr.....	48
8. Literatura.....	49

1. Seznam zkratk

ALA	kyselina 5-aminolevulinová
CNV	choroidální neovaskularizace
Hp	hematoporfyrin
HpD	„hematoporphyrine derivate“
ISC	„intersystem crossing“, inter-systémová přeměna
Pc	ftalocyaniny
PDT	„photodynamic therapy“, fotodynamická terapie
PS	fotosensitizér
ROS	reaktivní formy kyslíku
THF	tetrahydrofuran
TQP	tetrachinoxalinoporfyrizin
VPMD	věkem podmíněná makulární degenerace

2. Teoretická část

2.1. Úvod

Léčba rakoviny byla po celé minulé století založena především na třech postupech a to chemoterapii, radioterapii a chirurgické resekci. Neselektivnost, nežádoucí účinky, či dokonce psychické trauma pacienta vedly k hledání nových šetrnějších metod.

Fotodynamická terapie (photodynamic therapy – PDT) je od 80. let 20. století alternativní a šetrnou léčbou nádorových onemocnění, ale i řady jiných nemocí, především kožních projevů a očních chorob. Jedná se o fotochemoterapii, která představuje kombinované použití fotodynamicky aktivní látky (fotosensitizeru, PS) a světla za přítomnosti kyslíku. Kombinuje v sobě relativně vysokou účinnost se selektivním zásahem cíleného místa, což je způsobeno afinitou PS k nádorovým buňkám a směrem elektromagnetického záření používaného k aktivaci. PDT nemá kromě krátkodobé fotosenzibilizace závažné vedlejší účinky^{1,2}.

2.2. Princip PDT

Principem fotodynamické terapie je aplikace látky (PS), která je charakteristická tím, že se specificky hromadí v rychle se prolifерujících buňkách. Takovou tkáň vytvářejí i buňky nádorového bujení. PS je většinou podáván intravenózně, u povrchových projevů pak lokálně. Farmakologická distribuce je přímo závislá na druhu použité látky, jejíž optimální koncentrační hladina kulminuje v širokém časovém intervalu od 5 minut do 48 hodin. Po ideálním nasycení nádorové tkáně se aplikuje viditelné záření o vlnové délce shodné s absorpčním maximem fotosensitizeru a dochází tak k vybuzení PS do excitovaného stavu. Látka pak spontánně přechází do základní energetické hladiny, za přenosu kvanta energie, na kyslík, kterým je každá buňka bohatě prosycena. Na principu dovolených a zakázaných energetických přechodů tak vzniká velké množství reaktivních forem kyslíku (reactive oxygen species)³.

Jejich přímý oxidační účinek způsobuje změny v buněčných membránových strukturách a poškozuje biologické molekuly, včetně lipidů, proteinů a nukleových

kyselin. Účinnost PDT závisí na typu a koncentraci PS, na dávce ozáření, na koncentraci kyslíku v nádorové tkáni a na vazbě PS na substrát. Vlastní fluorescence PS bývá užitečná také k detekci léze, k určení její velikosti a k stanovení koncentrace PS⁴.

2.3. Historický pohled

Počátky PDT sahají do přelomu minulého století, kdy v roce 1900 publikoval von Tappeiner pozorování svého žáka Raaba, který zjistil, že akridinový roztok usmrcuje nálevníky rodu *Paramecium*, ale ve tmě je neúčinný. V této práci již von Tappeiner předpokládal, že fluoreskujících látek bude možno použít k léčbě pacientů s kožními chorobami⁵.

První experimenty s hematoporfyrinem jako novým fotosenzitizerem byly popsány Hausmanem v roce 1911⁶. K jeho zavedení přispěl také v roce 1912 německý lékař Meyer-Betz hrdinským pokusem, kdy si sám intravenózně aplikoval tuto látku, což vedlo ke kožní přecitlivělosti na světlo přetrvávající déle než 2 měsíce⁷.

Novodobou éru PS v diagnostice a terapii zahájili Lipson a Schwartz na Mayo klinice v 60. letech minulého století, kteří pozorovali fluorescenci neoplastických lézí po aplikaci hematoporfyrinu, což umožňovalo jejich vizualizaci v průběhu operace. Následně za účelem zlepšení akumulace hematoporfyrinu v nádorové tkáni byla vytvořena směs porfyrinů označovaná jako deriváty hematoporfyrinu (HpD). Komerčně se HpD začaly vyrábět pod názvem Photofrin. Tato látka byla v roce 1993 v Kanadě schválena k profylaxi karcinomu močového měchýře. Jejím nejzávažnějším vedlejším účinkem byla několik dní přetrvávající kožní fotosenzitivita. Lokální aplikace této látky nebyla možná pro poměrně velkou molekulu, která nepronikla do kůže.

Rozhodujícím přelomem bylo následné použití 5- aminolevulinová kyseliny (ALA) jako prekurzoru hematoporfyrinu IX Kennedym a spol. v roce 1990. Relativně malá molekula ALA snadněji pronikla pokožkou a akumulovala se v metabolicky aktivních buňkách⁸. PDT s lokálně aplikovaným PS se přesunula z výzkumných laboratoří do klinické praxe v roce 1999, kdy byla tato léčebná metoda s použitím přípravku obsahujícího ALA (Levulan®, DUSA Pharmaceuticals, Wilmington, Massachusetts, USA) schválena americkým Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (FDA) k léčbě aktinoidních keratóz. Následně byl v mnoha evropských zemích a

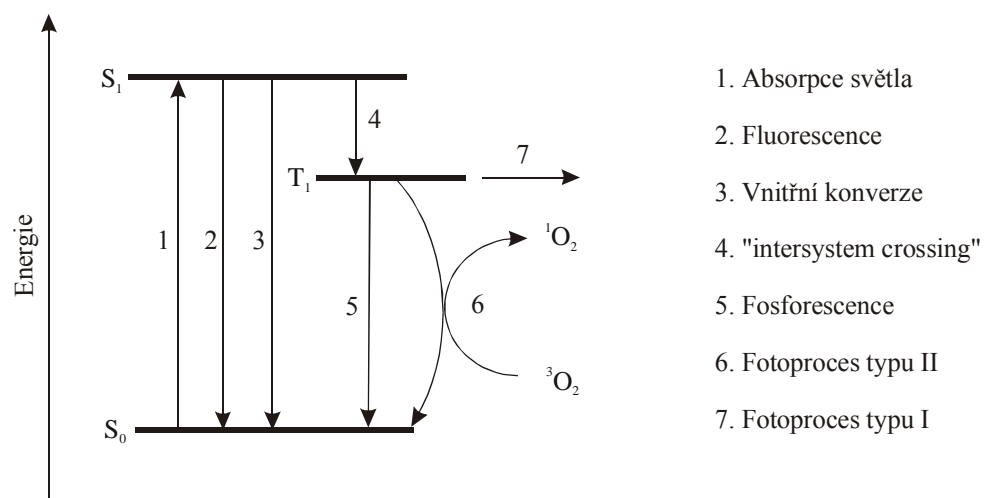
v Austrálii schválen methylester 5- aminolevulová kyseliny (Metvix®, Galderma, Paříž, Francie) k léčbě aktinoidních keratóz a bazaliomů. Dnes tyto dvě látky představují jedny z nejčastěji používaných PS v dermatologii⁹.

Také v České republice v 90. letech minulého století vznikla Společnost pro fotobiologii, jejíž duší byl prof. M. Jirsa.

Od té doby proběhla řada studií s novými fotosensitizéry. Některé z nich již úspěšně prošly klinickým hodnocením a jsou užívány pro léčbu jak kancerózních (temoporfin, ALA), tak nekancerózních (verteporfin, toluidinová modř) nemocí. Jiné těmito zkouškami teprve procházejí (ftalocyaniny).

2.4. Mechanismus PDT

Princip probíhajícího fotofyzikálního procesu, který je podstatou PDT, vysvětluje modifikovaný Jablonského diagram (Obr.1).



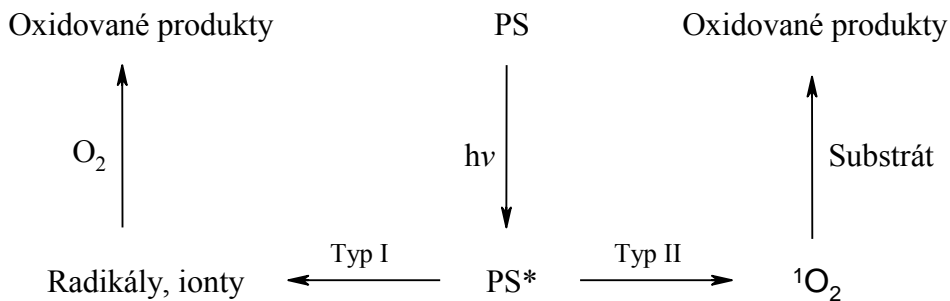
Obr. 1: Modifikovaný Jablonského diagram

Popisuje chování typického fotosensitizéru. Po absorpci světelného kvanta se PS transformuje ze základního singletového stavu (S_0) do excitovaného singletového stavu (S_1)¹⁰. Tento stav trvá příliš krátce (v jednotkách nanosekund) na to, aby umožnil efektivní interakci s okolním prostředím a vzhledem k tomu se předpokládá, že zanedbatelně ovlivňuje fotodynamickou aktivitu PS. Z této energetické hladiny se PS může uvolnit několika způsoby¹¹ zahrnujícími procesy jak radiační (fluorescence), tak neradiační (vnitřní konverze a tzv. „intersystem crossing“, ISC, cesta 4 na obr.1).

Při vnitřní konverzi dochází ke srážkám s molekulami rozpouštědla a k uvolnění energie ve formě tepla. Někteří autoři považují tento proces také za důležitý při vlastním účinku na buňky¹².

ISC má zvláštní význam pro PDT. Je to spinem „nepovolený“ proces a vyžaduje inverzi spinu, čímž přeměňuje fotosensitizer do tripletového stavu (T_1). Každá taková „nepovolená“ cesta je méně pravděpodobná než cesta „povolená“, ale dobrý fotosensitizer se přeměňuje „nepovolenou“ ISC cestou s vysokou pravděpodobností. Molekula pak může relaxovat z tripletového stavu několika způsoby: může ztrácet energii tzv. triplet-singlet emisí fotonu známou jako fosforescence (cesta 5) a bez vyzařování spinovou výměnou s jinou molekulou v tripletovém stavu¹³ – tzv. „zhášením“ excitovaného tripletového stavu.

„Zhášecí“ mechanismus T_1 stavu fotosensitizeru může být rozlišen dle převažující cesty na fotoproces typu I a typu II¹⁴ (Obr.2). Oba fotoprocesy se objevují současně a poměr mezi nimi je silně ovlivněn použitým PS, substrátem a koncentrací kyslíku. Všeobecně se přijímá, že fotoproces typu II, při němž vzniká singletový kyslík, je zejména odpovědný za vlastní fotodynamický účinek¹⁵.



Obr. 2

2.4.1. 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 (ROS) nebo způsobit neopravitelné poškození. Tyto reakce způsobují oxidativní poškození a mohou eventuálně vést k cytotoxickému efektu pozorovanému v průběhu PDT^{4,16}.

K tomuto procesu dochází především za snížené koncentrace kyslíku. Při úplné anoxii reaguje excitovaný (PS*) přímo s okolním biologickým substrátem (X).

PS⁻ může dále za hypoxie reagovat s kyslíkem za produkce superoxid anion radikálu (O₂^{·-}), který poskytuje reaktivní hydroxidový radikál (HO·) a právě ten se dále významně účastní oxidačních procesů. Samotný superoxid nemá příliš velkou oxidační aktivitu, ale vzájemnou reakcí (dismutací) mezi jeho molekulami vznikají peroxid vodíku a kyslík. V biologických systémech pak často probíhá tzv. Fentonova reakce, která zahrnuje přeměnu H₂O₂ na hydroxylový radikál (HO·) a hydroxylový iont (HO⁻). Tato reakce je katalyzována kovovými ionty (např. Fe³⁺), ty jsou pomocí superoxidu jakožto donoru elektronu redukovány a následně schopny štěpit vazbu O-O v peroxidu vodíku.

Vysoce reaktivní hydroxylový 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^{4,16}.

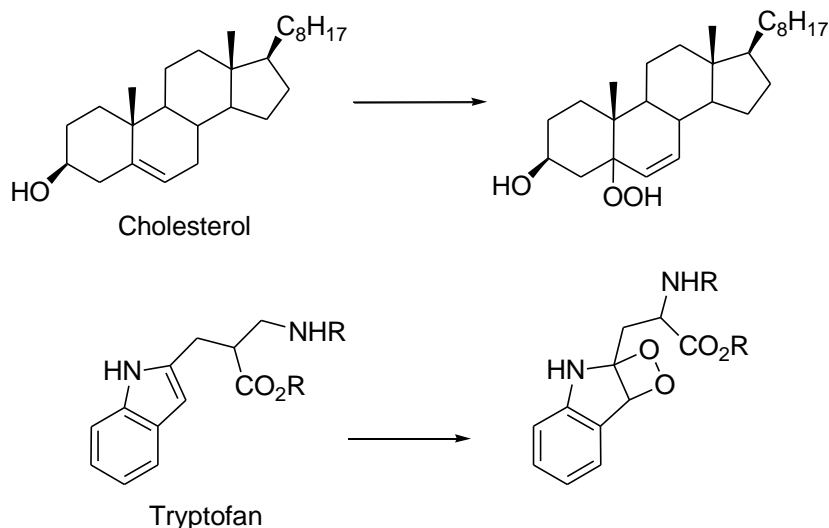
2.4.2. Fotoproces typu II

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 (¹O₂). 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 smrt¹¹.

Doba života ¹O₂ je různá a liší se v závislosti na prostředí, ve kterém se nachází. Předpokládá se však, že není schopen do tkání penetrovat hlouběji 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.

Singletový kyslík reaguje s biologickým materiálem oxidací nebo cykloadicí (Obr.3). Terčem jsou především molekuly obsažené v membránách, cholesterol, nenasyčené mastné kyseliny, dále 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 smrti⁴. Z důvodu velké reaktivity a krátkého poločasu singletového kyslíku a hydroxylových radikálů jsou zasaženy pouze molekuly a struktury v místě jejich vzniku. Poločas singletového kyslíku v biologickém systému je < 40 ns, a proto akční rádius je v řádu 20 nm¹⁷.



Obr. 3: Příklad oxidace cholesterolu singletovým kyslíkem a cykloadice singletového kyslíku na aminokyselinu tryptofan

2.5. Reakce na léčbu PDT

Existují tři hlavní mechanismy, kterými PDT ničí nádor. V prvním případě, dochází k přímé destrukci nádorových buněk vzniklým singletovým kyslíkem. Přímou destrukci doprovází poškození cévního zásobení nádoru. Tím je významně omezena výživa tumoru. Konečně dokáže PDT aktivovat imunitní systém a vyvolat tak jeho odpověď na nádorové buňky (díky cytokinům a dalším mediátorům zánětu uvolněným z napadených buněk). Výsledek terapie závisí na všech třech mechanismech, které se navzájem potencují¹⁸.

2.6. Fotosensitizéry

Fotosensitizér je látka, která je schopna absorbovat světelnou energii a následně ji předávat molekulám jiným nebo ji vyzařovat. Látek s těmito vlastnostmi existuje velké množství, avšak pro potřeby klinické aplikace musí splňovat řadu dalších podmínek⁹. Mezi požadavky ideálního PS patří chemická čistota, schopnost selektivního vychytání v cílových tkáních, krátký časový interval mezi jeho aplikací a maximální akumulací v postižené tkáni, krátký biologický poločas, aktivace vlnovými délkami s optimální penetrací lidskými tkáněmi, vysoká účinnost tvorby singletového kyslíku, nízká toxicita^{19,20}.

Fotosensitizéry můžeme rozčlenit podle chemické struktury do několika základních skupin (viz tabulka 1) nebo podle vývoje do tří generací.

Tabulka 1. Členění fotosensitizérů podle chemické struktury

Skupina porfyrinu

Hp

HpD

BPD (benzoporfyrinové deriváty, např. verteporfin)

ALA (kyselina 5-aminolevulinová)

Texafyriny (např. motexafin lutecium)

Skupina chlorofylu

Chloriny (např. temoporfin, talaporfin)

Bakteriochloriny (např. *m*-THPBC)

Purpuriny (např. cíničitý komplex etiopurpurinu)

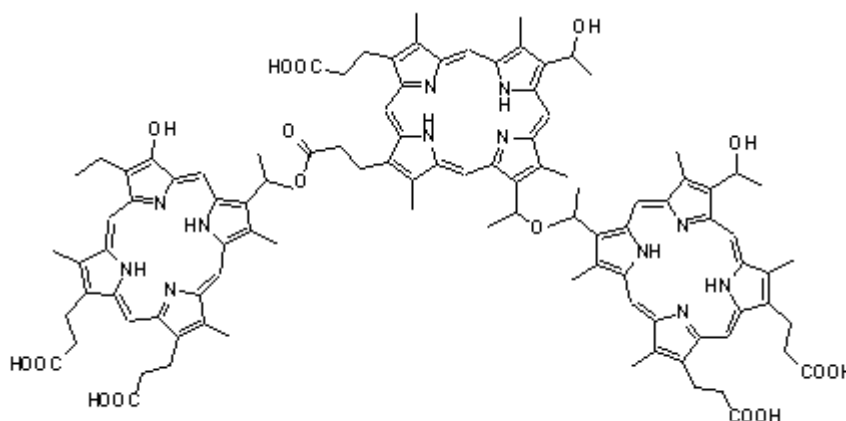
Skupina barviv

Ftalocyaniny

Naftalocyaniny

První generace

První nejstarší generaci tvoří hlavně hematoporfyrin (**Hp**) a jeho derivát – směs oligomerů, dimerů a monomerů Hp (**HpD**)¹⁹. Především oligomerní část je odpovědná za PDT efekt. HpD nebo-li porfimer sodný (obr. 4) byl první oficiálně schválený PS pro PDT. Je zaregistrován pod různými firemními názvy - Photofrin (USA), Photocarcinorin (Čína), Photosan (Německo), Photogem (Rusko), Haematodrex (Bulharsko)²¹. Vyznačuje se však některými nevýhodnými vlastnostmi, kvůli kterým byly vyvíjeny PS druhé generace²².



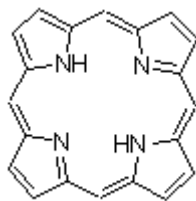
Obr. 4: Příklad části HpD

Druhá generace

Kromě látek odvozených od porfyrinů sem patří i látky jiných chemických struktur např. ftalocyaniny, naftalocyaniny, chloriny, bakteriochloriny apod. Předností nových PS je nižší fotosenzitivita kůže po léčbě. Mají vyšší aktivační vlnové délky s hlubší penetrací světla do tkání. Jsou chemicky jednodušší a snadno charakterizovatelné, mají lepší poměr kumulace mezi nádorovou a zdravou tkání.

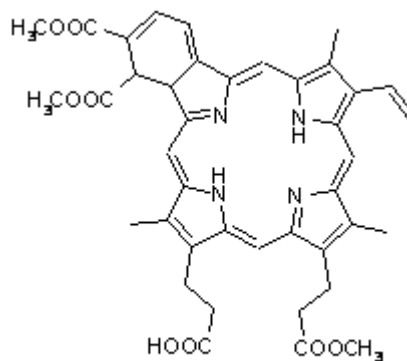
Fotosensitizéry 5,10,15,20-tetra(4-sulfonatofenyl)porfyrin (*p*-TPPS₄) a 5,10,15,20-tetra(3-hydroxyfenyl)porfyrin (*m*-THPP) patří mezi **porfyrinové deriváty** (obr. 5), které byly objeveny jako nové potenciální PS fotodynamické terapie²³. Pro klinické lokální použití v dermatologii bylo u nás zkoušen unikátně čištěný TPPS₄, ale zánikem Lachema Brno skončily tyto studie. Širšímu využití TPPS₄ brání neurotoxické účinky, které byly popsány po parenterální aplikaci PS u laboratorních krys. Při lokální intraleziální aplikaci nebyla tato neurotoxicita u čištěného PS potvrzena. TPPS₄ je látka, která působí přímo senzibilizací a její účinek je závislý na vstřebání do buňky. Výhodou

jeho lokální aplikace. Je dosaženo podstatně vyšší koncentrace fotosensitizeru v nádorové tkáni bez vyššího celkového fototoxického zatížení organismu²⁴.



Obr.5: Struktura porfyriu

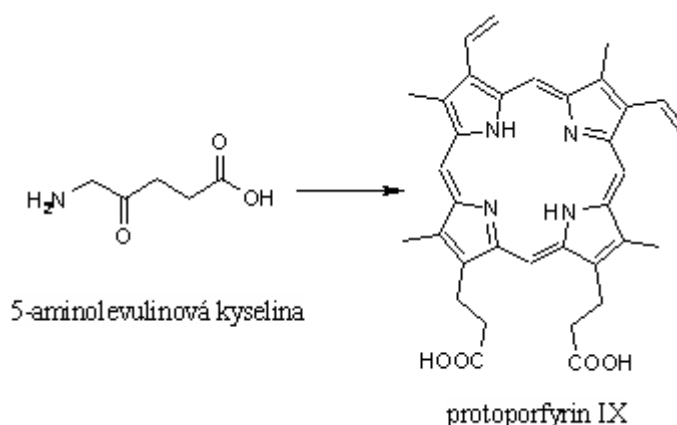
Fotosensitizerem 2.generace **benzoporfyrinového typu** je verteporfin (BPD-MA) (obr.6). Tato hydrofobní látka má absorpční maximum při vlnové délce 690 nm. Verteporfin, aplikovaný ve formě lipozómů, je tumorózní tkáni rychle vychytáván, ale zrovna tak je brzy odstraněn. Díky tomu je jeho kožní sensitivita minimální. Třebaže jeho selektivita v nádorové tkáni není ideální, je tato látka ve stadiu klinických zkoušek pro léčbu karcinomu z bazálních buněk kůže, psoriázy a revmatoidní artritidy. Největší úspěch zaznamenal verteporfin v očním lékařství. Pod obchodním názvem Visudyne[®] je zaregistrován již v 71 zemích a užívá se k léčbě věkem podmíněné makulární degenerace (VPMD)²².



Obr. 6: verteporfin

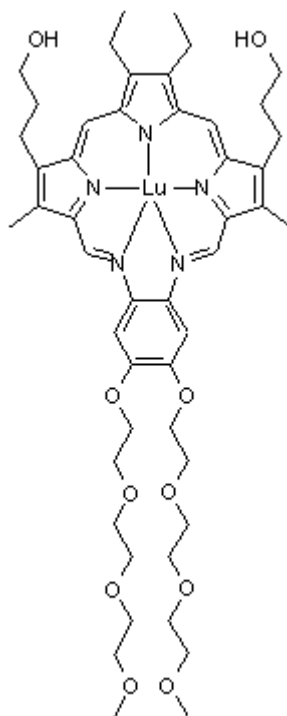
Do druhé generace patří také kyselina 5-aminolevulinová (**ALA**). V dnešní době je snad nejvíce využívaným PS k lokální aplikaci. Tato endogenní látka se podílí na biosyntéze hemu. Její exogenní podání vede k syntéze protoporfyrinu IX (PpIX) (obr. 7), který je účinným PS a akumuluje se především v nádorech. Nicméně k hromadění PS dochází i ve zdravé tkáni, což vyvolává generalizovanou fotosensitizaci, která je však přechodná a ustupuje po 3 - 6 hodinách. K eliminaci PpIX z organismu dochází do 24 hodin, což umožňuje opakování léčby po 48 hodinách bez rizika poškození zdravé

tkáně. Další výhodou tohoto proléčiva jsou jeho různé formy podání: lokálně, perorálně, injekčně. ALA se používá pro léčbu kožních nádorových i nenádorových onemocnění (rakovina kůže, lupénka, aktinoidní keratóza). Vzhledem k nízké penetraci ALA se používají její estery, které jsou více lipofilní a lépe pronikají tkání (methylester ALA – Metvix[®], hexylester ALA – Hexvix[®]). Při hydrolýze uvolňují volnou ALA. Estery ALA jsou také vhodné k fotodetekci nádorů^{23,25}. Nádorová ložiska, ve kterých se po podání esteru ALA nahromadil protoporfyrin IX, se ozáří modrým světlem. Ložiska potom červeně fluoreskují a umožní detekovat a lokalizovat nádor²⁵.



Obr. 7: Syntéza PpIX z kyseliny 5-aminolevulinové

Mezi synteticky připravené zástupce druhé generace patří skupina **texafyrinů**. Jedná se o expandované porfyriny s charakteristickým pětiusíkatým makrocyklem¹⁹. Jedním z hlavních členů této skupiny se stal motexafin lutecium (obr. 8). Jedná se tedy o derivát texafyrinu s centrálně chelatovaným atomem lutecia. Byl registrován pod komerčním názvem Antrin[®], Optrin[®], Lutrin[®]. Mezi jeho velké výhody patří silná absorpce při dlouhé vlnové délce 732 nm a dobrá selektivita pro maligní tkáň. Je také rychle vylučován z krevní plazmy²⁶. Díky těmto výhodám můžeme motexafin lutecium použít k léčbě silně pigmentovaných nádorů a byl také testován na fotoangioplastiku²⁷.



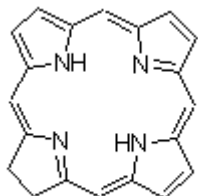
Obr.8: motexafin lutecium

Dále pak do této generace řadíme i PS chlorinového typu (obr. 9). **Chloriny** se od porfirinu liší pouze redukcí jedné dvojně vazby v makrocyclickém systému. Další částečnou hydrogenací porfyrinové jednotky lze získat bakteriochloriny (obr. 10). Hlavním zástupcem skupiny chlorinů je temoporfin (5,10,15,20-tetra(3-hydroxyfenyl)chlorin, *m*-THPC) (obr. 11). Jeho absorpční maximum je při 652 nm. Díky zvýšené absorpci v červené oblasti světla a dalším faktorům, jako je vazba této látky na komponenty plazmy, jeho penetrace do buněk a subcelulární lokalizace, je z hlediska požadované fotodynamické dávky (což je dávka záření × dávka léku) přibližně stokrát účinnější než Photofrin. Jeho nevýhodou jsou jeho farmakologické parametry, poměrně malá selektivita mezi nádorovou a zdravou tkání a poměrně dlouho přetrvávající kožní senzitivita (asi 2-3 týdny). Tento PS pod jménem Foscan[®] byl zaveden k léčbě nádorů v oblasti hlavy a krku. V klinických zkouškách je testován pro léčbu nádorů jícnu a Barretova jícnu, připravují se další klinické zkoušky u karcinomu žaludku, prostaty a kůže²⁵.

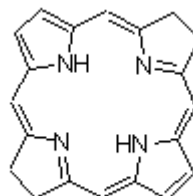
Fotosensitizer 5,10,15,20-tetra(3-hydroxyfenyl)bakteriochlorin (*m*-THPBC) je plně syntetický zástupce **bakteriochlorinů**²³.

Rostaporfin (Tin etiopurpurin, SnET2, **Purlytin**[®])(obr. 12) je látka patřící do skupiny metalochlorinů (má uprostřed chelatovaný kation cínu). Má silné absorpční

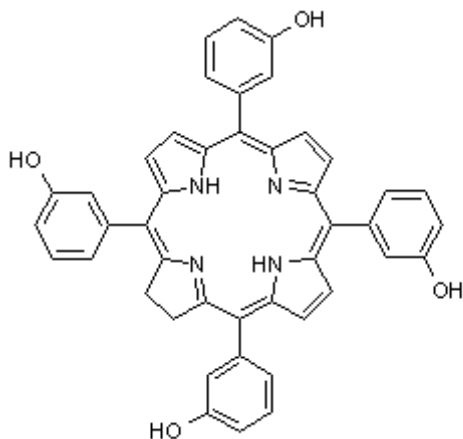
maximum (při 660 nm), ale přesto jsou pro účinnou terapii potřebné vysoké dávky světla (srovnatelné s Photofrinem[®])²⁸. Rostaporfin je testován firmou Miravant Medical Technologies jako prostředek k léčbě AMD a třetí fáze klinických zkoušek je již pro tuto aplikaci ukončena²⁹.



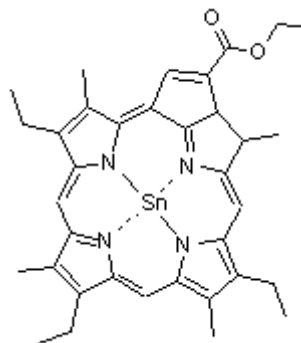
Obr. 9: chlorin



Obr. 10: bakteriochlorin



Obr. 11: temoporfin

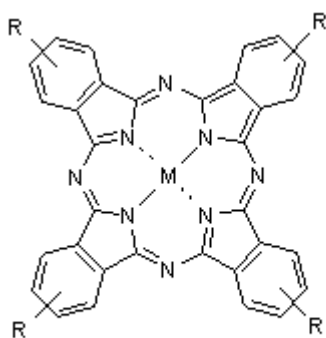


Obr. 12: rostaporfin

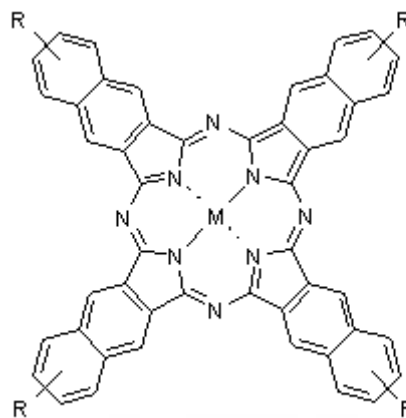
Do druhé generace náleží další nadějná skupina - **ftalocyaniny** (Pc) (obr. 13). Mezi rozličnými Pc můžeme nalézt látky se základním porfyrinovým kruhem, v jehož aktivním centru je koordinačně kovalentní a iontovou vazbou připoután kov (Zn, Al, Si apod.) a jako substituenty navázané na benzenová jádra sulfonové, hydroxylové či obdobné skupiny. Počtem i druhem těchto skupin a centrálního atomu lze ovlivnit farmakokinetické vlastnosti PS. Ftalocyaniny jsou skupinou PS s rozsáhlou možností využití v průmyslu, ekologii i medicíně. Vykazují největší absorpci v červené části světla (670 – 700 nm). Tento posun v oblasti červeného světla je výhodný pro lepší penetraci světla do tkáně. Jejich velkou předností je minimální kožní fototoxicita a mají cytotoxický účinek na většinu nádorových buněk. Ftalocyaniny mohou být chelatovány diamagnetickými kovy (Zn, Al, Si), které prodlužují trvání tripletového stavu PS a tím zvyšují účinnost v PDT. Naproti tomu komplexy s paramagnetickými kovy (Cu, Co, Fe)

nebo bez kovu mají krátké doby života tripletového stavu a tím jsou méně účinné. Nevýhodou některých Pc je jejich špatná rozpustnost ve vodě i v organických rozpouštědlech. Změnou substituentů na periferii, či spojením s přenašečem (lipozómem) lze pozitivně ovlivnit jejich farmakokinetické vlastnosti. Ftalocyaniny vstupují do buněk endocytózou a jsou lokalizovány v lysozomech. V současné době je ve fázi klinických testů preparát na bázi zinečnatých ftalocyaninů (firma Ciba-Geigy, Švýcarsko; firma QLT PhotoTherapeutics, Kanada), a preparát Photosens na bázi směsi hlinitých sulfonovaných ftalocyaninů (NIOPIK, Moskva)²². V České republice byly ve Výzkumném ústavu organických syntéz a.s. v Pardubicích ve spolupráci s Divizí radiofarmak Ústavu jaderného výzkumu v Řeži u Prahy a s Ústavem biofyziky 1. Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze ukončeny preklinické testy preparátu na bázi čistého, disulfonovaného hydroxyhlinitého ftalocyaninu³⁰.

Přidáním dalšího benzenového jádra na periferii Pc vznikají PS typu **naftalocyaninů** (obr. 14). I ty se potýkají se špatnou rozpustností z důvodu vysoké lipofility. Naftalocyaniny silně absorbují při dlouhých vlnových délkách (770 nm), což opět prohlubuje možný terapeutický zásah²² a předpovídá tak jejich aplikaci i na vysoce pigmentované nádory. V Bulharsku je testován křemičitý naftalocyanin.



Obr. 13: ftalocyanin



Obr. 14: naftalocyanin

Třetí generace

Jako látky třetí generace se označují konjugáty PS s různými biomolekulami. Mezi látkami tvořícími fotosenzitivní část konjugátů zaujímají vedoucí postavení porfyriny, zřejmě z důvodu snadné přípravy. Ve farmakokinetice konjugátu dominuje afinita porfyrinové části k sérovým proteinům. Afinita biomolekul k receptorům na povrchu

buňky je vyjádřena méně. Porfyriny se konjugují zejména s protilátkami, steroidy, dále se sacharidy a polynukleotidy¹³. Tato vazba zlepšuje farmakokinetické vlastnosti PS.

Dělení PS do generací vede občas k nesprávné představě o kvalitě nových látek. Nové PS nemusejí být zrovna výhodnější pro PDT. Dochází například k vyššímu nepohodlí pacienta (pocit bolesti po aplikaci látky), PS jsou méně aktivní, nespecificky napadají místa v organismu a mohou být také méně bezpečné než ověřené starší látky. Pacienti, kteří si prošli řadou chemoterapií, radioterapií či chirurgickými zákroky se neobávají přetrvávající fotosensitivity starších látek, je to jen malá částka k zaplacení za bezbolestnou a účinnou terapií¹⁹.

2.7. Zdroje záření

Rozhodujícím faktorem v léčbě rakoviny pomocí PDT je dostupnost světla pro oblast postižené tkáně. Hloubka průniku světla do tkáně závisí na vlnové délce, v oblasti viditelného světla se při vyšší vlnové délce penetrace zvyšuje. Z tohoto důvodu musí být vybrána vlnová délka tak, aby určeného místa zásahu dosáhlo dostatečné množství fotonů.

V souvislosti s PDT byla zkoumána hloubka průniku červeného světla. Bylo stanoveno, že hloubka průniku je dostatečná k tomu, aby se vyvolala biologická odezva v hloubce až 10 mm ve tkáni.

Jako zdroje pro PDT se mohou používat koherentní i nekoherentní zdroje světla, které mohou být aplikovány na postižené místo přímo nebo pomocí optického vlákna. Zdrojem světla mohou být širokopásmové lampy, jejichž použití je výhodné v případě, kdy se světlo aplikuje přímo na nádor (kožní nádory, nádory v dutině ústní atd.). Jejich zářivé výkony v aktivačních vlnových délkách nemusí být dostatečné pro navození fotodynamického jevu v celém objemu nádoru a z tohoto důvodu se jako zdroj velmi intenzivního koherentního, monochromatického a lineárně polarizovaného světla používají lasery. Při PDT je třeba zajistit co nejkratší ozařovací časy a velkou intenzitu záření na relativně malých plochách a proto laser vyhovuje jako vhodný zdroj záření. Stále více se používají lasery polovodičové, které mají menší rozměry a nižší pořizovací a provozní náklady²¹.

2.8. Uplatnění PDT

Fotodynamická terapie byla poprvé schválena roku 1993 v Kanadě pro léčbu rakoviny močového měchýře pomocí fotosensitizeru Photofrin. Dodnes je jedním z nejvíce používaných PS v klinické praxi. Jeho objev byl průlomový. Postupně došlo k schválení léčby různých typů nádorů a premaligních lézí³¹. PDT také našla uplatnění v paliativní a podpůrné péči o pacienta, lze ji použít i jako doplňkovou léčbu při chirurgickém řešení rozsáhlých tumorů různých systémů.

PDT je zejména výhodná pro terapii některých kožních projevů. Léčba, je-li provedena pečlivě, je zdařilá a i když výsledná odpověď přichází pomaleji, má slušný kosmetický efekt. Při správném provedení terapie nedochází ani k jizvení, ani k jiným vedlejším účinkům²⁴.

V očním lékařství zaznamenala fotodynamická léčba velký úspěch. Byla první skutečně účinnou terapií vlhké formy věkem podmíněné makulární degenerace (VPMD)³². VPMD je nejčastější příčinou těžké ztráty zraku ve vyspělých zemích v populaci nad 65 let věku³³. Vlhká forma je charakterizována prorůstáním novotvořených cév ze spodních vrstev pod sítnicí (tvoří zde útvar tzv. „choroidální neovaskularizaci“ - CNV). Po podání PS a následné aplikaci laseru dochází v důsledku srážení krve v cévách k jejich uzávěru, jež vede k zástavě progresu CNV a k ústupu prosakování. Vzhledem k opětovnému otevření cév a k obnovenému prosakování dochází k opakování PDT. Průměrný počet aplikací je šest³⁴.

PDT je dále standardně využívána k čištění kostní dřeně, k odstranění leukemických buněk z autonomních štěpů kostní dřeně. PDT se začala používat i u některých nemaligních onemocnění, například u kardiovaskulárních aterosklerotických změn a revmatoidní artritidě. Ve stadiu preklinického výzkumu je využití antivirového efektu PDT, proti HIV, herpes simplex viru a cytomegaloviru⁴.

Uplatnění fotodynamické terapie v klinické praxi je limitováno velikostí tumoru (PDT je určena pro nádory menších rozměrů) a je také omezeno lokalizací tumoru³⁵.

Fotodynamického jevu lze s prospěchem využít v některých případech, kde je obtížné klinicky ověřit přesný rozsah nádorového procesu a vzhledem k tomu, že nádorové buňky zvýšeně akumulují molekuly PS, lze toho využít k jejich fotodetekci a k rozpoznání časné recidivy³⁶.

Tabulka 2. Typ nemoci a schváleného léku

Nemoc	Fotosensitizer
Aktinoidní keratóza	ALA
Basaliom	ALA
Barretův jícn	porfimer sodný
Rakovina děložního čípku	porfimer sodný
Rakovina plic	porfimer sodný
Rakovina jícnu	porfimer sodný
Rakovina žaludku	porfimer sodný
Rakovina krku a hlavy	mTHPC
Rakovina močového měchýře	porfimer sodný
VPMD	verteporfin

31

PDT můžeme považovat za další vhodnou formu léčení, kterou jsme si rozšířili škálu dosavadních terapeutických postupů. Její výhodou je selektivnost, nevýrazné subjektivní obtíže pacienta, dále pak možnost opakování léčby a také eventuálně kombinace s ostatními léčebnými postupy.

2.9. Spojení PDT s jinými postupy léčby

Efekt některých monoterapií na nádorové buňky byl srovnán s výsledky získanými z léčby pomocí dvou různých terapií např. PDT se specifickým chemoterapeutikem^{37,38,39,40}. A opravdu cíleně lokalizovaný PS a přiměřená dávka světla kombinovaná s nízkou dávkou chemoterapeutika přinesla slibnou strategii léčby rakoviny. Spojení PDT a chemoterapeutika nejen lépe ničí nádorové buňky, ale také snižuje výskyt nežádoucích účinků samotné chemoterapie, díky nižší dávce chemoterapeutika potřebného k získání požadovaného efektu. Tímto způsobem byl aditivní a synergický účinek kombinované léčby pozorován v několika studiích^{37,38}.

Nízká dávka cisplatinu společně použita s radioterapií či PDT je považována za významnou novou formu léčby v onkologii^{41,42}. PDT je také považována některými autory za doplňující léčbu k radioterapii a bylo by ji tak možné využít k léčbě větších

nádorů⁴³. Tento způsob spojení je velmi vhodný, neboť PDT představuje léčbu s nízkou morbiditou a komplikacemi, a dosahuje se tak zvýšené pravděpodobnosti přežití, i zlepšení kvality života, dokonce i u pacientů s malou šancí⁴⁴.

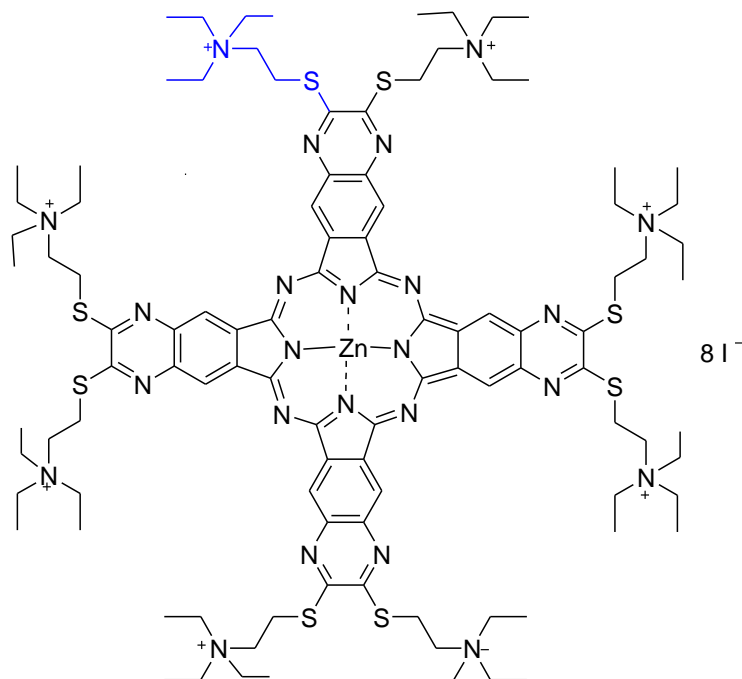
PDT můžeme dále použít spolu s jinými typy léčby např. s hypertermií. Byly prokázány synergické letální účinky PDT a hypertermie. Jiným postupem je například aplikace glukózy za účelem snížení pH nádoru. Díky nízkému pH dochází také k selektivnějšímu vychytání PS v nádoru, jako například Photofrin II. Rovněž zajímavý synergický efekt byl dosažen kombinací Photofrinu a elektrického pole.

Výše popsané metody otvírají nové možnosti využití PDT a umožňují i cílenější a bezpečnější léčbu⁴⁵.

3. Cíl práce

Cílem mé práce byla syntéza ve vodě rozpustného tetrachinoxalinoporfyrázinu (TQP), s absorbcí při vysokých vlnových délkách (750 nm). Tato látka je potenciálně vhodná pro použití ve fotodynamické terapii. Rozpustnost ve vodě je jednou z výhodných vlastností, jež usnadňuje aplikaci léku a absorpce při 750 nm umožňuje průnik do hlouběji položených tkání. Absorpce při této hodnotě se dosahuje použitím chinoxalinových derivátů jako syntetických prekurzorů.

Molekula TQP byla koncipována tak, aby měla v postraních řetězcích diethylaminoethylsulfanylová seskupení. Terciární aminoskupinu lze následně kvarternizovat a umožnit tak rozpustnost ve vodě, přičemž nabité skupiny navíc odpuzují elektrostaticky molekuly TQP navzájem od sebe a tím snižují agregaci ve vodném prostředí. Alkylsulfanyl skupinu jsme zvolili proto, že má nejlepší produkci singletové kyslíku⁵⁰.



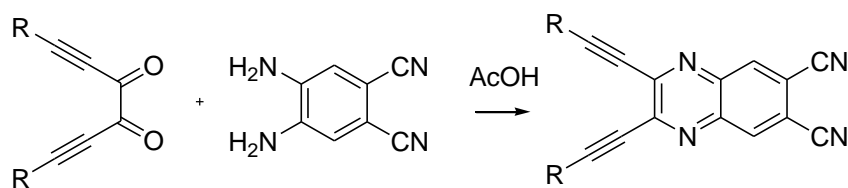
4. Metodická část

4.1. **Prekurzory pro syntézu tetrachinoxalinoporfyrazinů**

Při výběru prekurzoru klademe důraz zejména na určité vlastnosti, mezi které patří: snadná a nenákladná syntéza s vysokými výtěžky, stabilita, jednoduchá substituce postranních řetězců. Díky variabilitě substitucí těchto řetězců, získáváme zajímavý stavební materiál pro přípravu různých makrocyclů s odlišnými vlastnostmi (např. spektrální vlastnosti, rozpustnost, lipofilita atd.)

Při syntéze vhodného prekurzoru lze postupovat tak, že se nejprve připraví výchozí diketon již substituovaný skupinami, které hodláme zavést na periferii výsledného makrocyclu. Po kondenzaci s 4,5-diaminofthalonitrilem se pak dostane přímo požadovaný prekurzor.

Takto postupovali např. Mitzel s kolektivem ve své syntéze tetrachinoxalinoporfyrazinů. Příprava prekurzoru chinoxalin-5,6-dikarbonitrilu byla provedena v jednom kroku kondenzací diketonu hexa-1,5-diyne-3,4-dionu s 4,5-diaminofthalonitrilem v prostředí kyseliny octové za pokojové teploty (obr. 15)⁴⁶. Nicméně tato cesta závisí na náročné syntéze požadovaného diketonu a nelze použít pro syntézu derivátů chinoxalinů substituovaných heteroatomy.



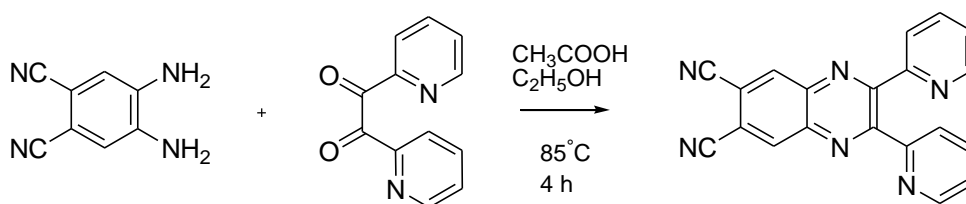
R= Si(*i*-Pr)₃

R= 3,5-di(*tert*-butyl)fenyl

R= 4-[(*i*-Pr)₃SiO]fenyl

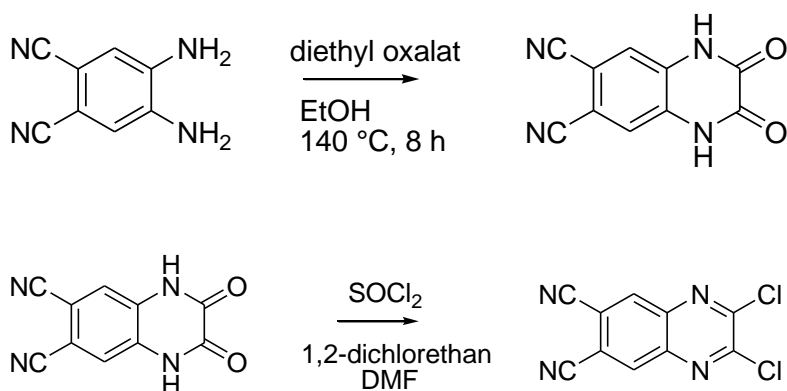
Obr. 15

Podobnou přípravu prekurzoru chinoxalin-5,6-dikarbonitrilu si zvolil Haas. Kondenzací 1,2-di(pyridin-2-yl)ethan-1,2-dionu s 4,5-diaminofthalonitrilem v prostředí ledové kyseliny octové a ethanolu. Výtěžky se pohybovaly na úrovni 89% (obr. 16)⁴⁷.



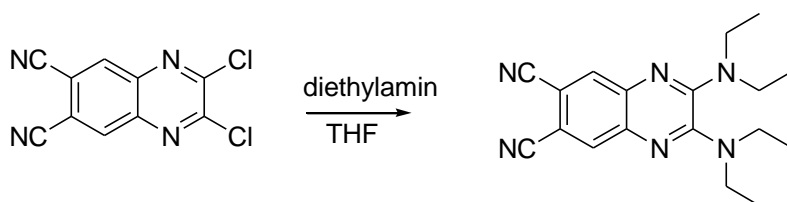
Obr. 16

Na Katedře farmaceutické chemie FaFUK byl vyvinut alternativní postup vycházející z 2,3-dichlorchinoxalin-6,7-dikarbonitrilu. Syntéza prekursoru 2,3-dichlorchinoxalin-6,7-dikarbonitrilu byla rozdělena do dvou kroků: přípravu dioxoderivátu a jeho převedení na reaktivní dichlorderivát působením thionylchloridu (obr. 17)⁴⁸



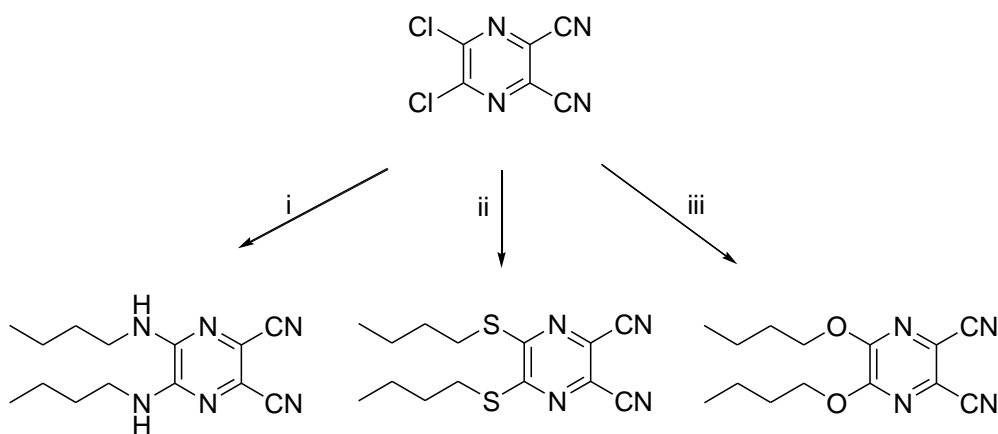
Obr. 17

Tento prekursor lze pak velmi jednoduše nukleofilně substituovat a měnit tak periferní řetězce. Například reakcí s diethylaminem v prostředí THF, za pokojové teploty byl získán 2,3-bis(diethylamino)chinoxalin-6,7-dikarbonitril (obr. 18)⁴⁸.



Obr. 18

Chemické vlastnosti prekursoru 2,3-dichlorchinoxalin-6,7-dikarbonitrilu jsou velmi podobné 5,6-dichlorpyrazin-2,3-dikarbonitrilu, který je široce využíván v syntéze tetrapyrazinoporfyrinů. U těchto látek se používají řetězce vázané přes dusík (reakce s aminy), kyslík (reakce s alkoholáty) nebo síru - reakce s thioláty (obr. 19)^{49, 50}.



i) $C_4H_9NH_2$, THF

ii) C_4H_9SH , NaOH, THF/ H_2O

iii) butanol, triethylamin

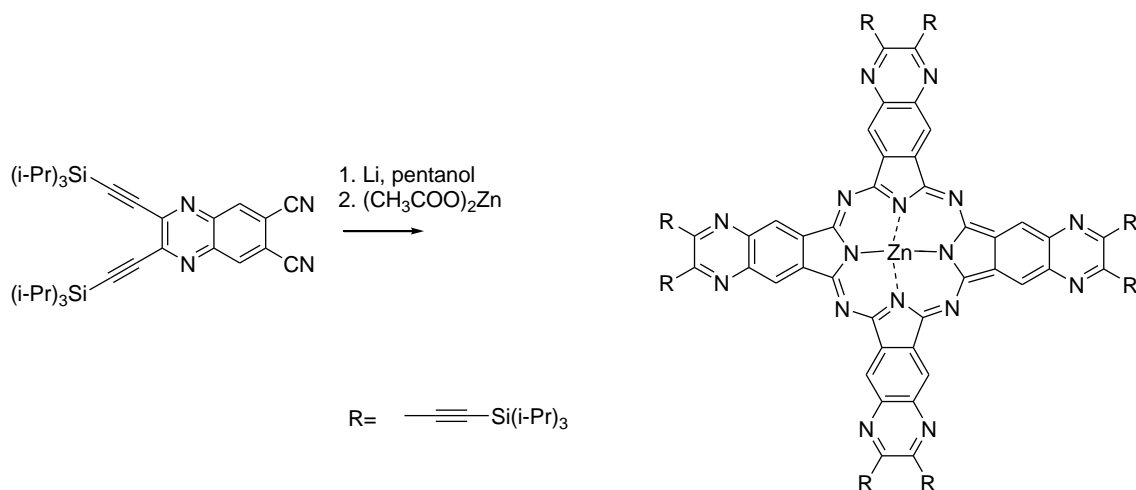
Obr. 19

4.2. Cyklizační postupy při syntéze ftalocyaninů

Jednou z nejčastějších syntetických cest přípravy Pc je cyklotetramerizace prekurzorů. Tetrachinoxalinoporfyraziny (TQP) reagují obdobně.

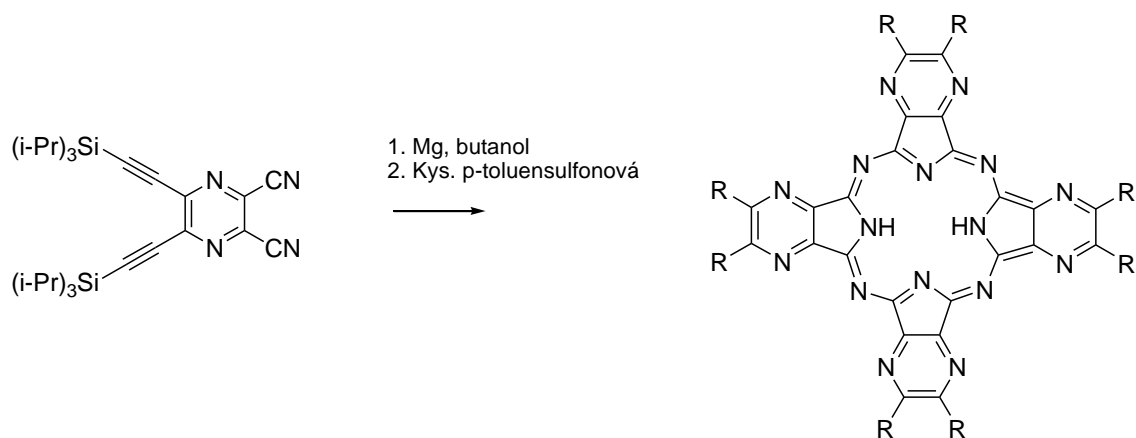
Do centra makrocyclických systémů lze zavést kov nebo polokov, jež poté může vhodně měnit jejich vlastnosti, zejména co se týče spektrálních, oxidačních nebo fotodynamických vlastností. V praxi se kovy do makrocyclů vpravují již při cyklizaci přidáním solí vhodného kovu nebo vložení kovového kationtu do centra připraveného bezkovového makrocyclu⁵¹.

Makrocyclky bez centrálního kovu lze připravit cyklizací za použití alkoholátů alifatických alkoholů (methanol až oktanol). Pro přípravu alkoholátů se využívá buď silné base 1,8-diazabicyklo[5,4,0]undec-7-enu (DBU)⁵² nebo alkalických kovů (většinou lithium)⁵³. Alkalické kovy jsou jako centrální kovy velmi slabě chelátovány a působením slabých kyselin se snadno mění za atomy vodíku (dokonce i v přítomnosti vody). Tato vlastnost je s výhodou použita při syntéze zinečnatého komplexu TQP, tím že do reakční směsi je přidán octan zinečnatý a jeho kov nahradí lithium (obr. 20).

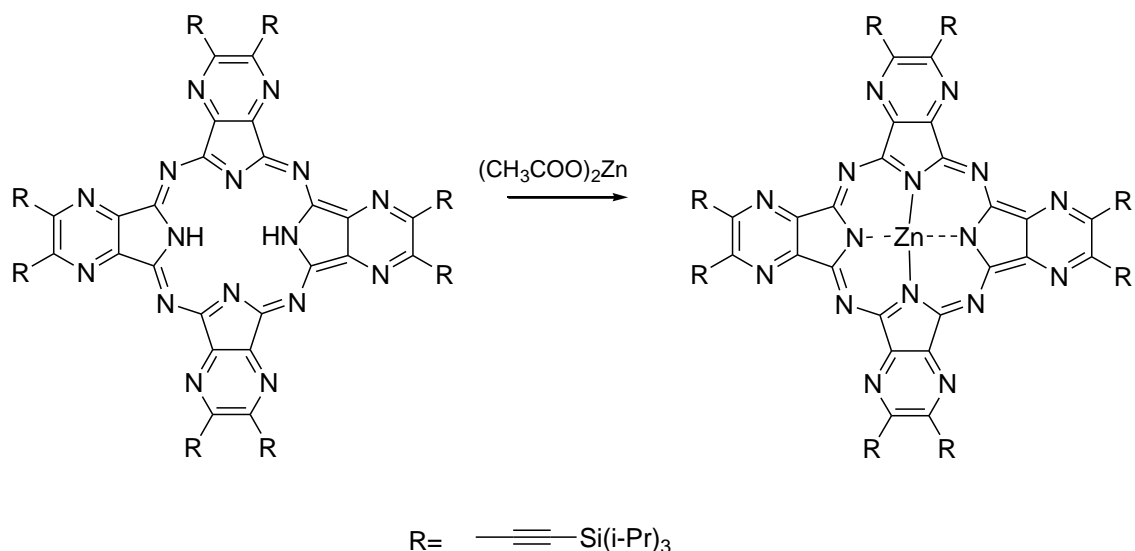


Obr. 20

Kovy alkalických zemin (například hořčík) jsou vázány silněji v centru molekuly, a proto je nutné je vytěsnit za pomoci silnější kyseliny (např. *p*-toluensulfonové, nebo trifluoroctové)(obr. 21). Teprve bezkovový komplex reaguje v nové syntéze s octanem zinečnatým (obr. 22)⁵⁴.

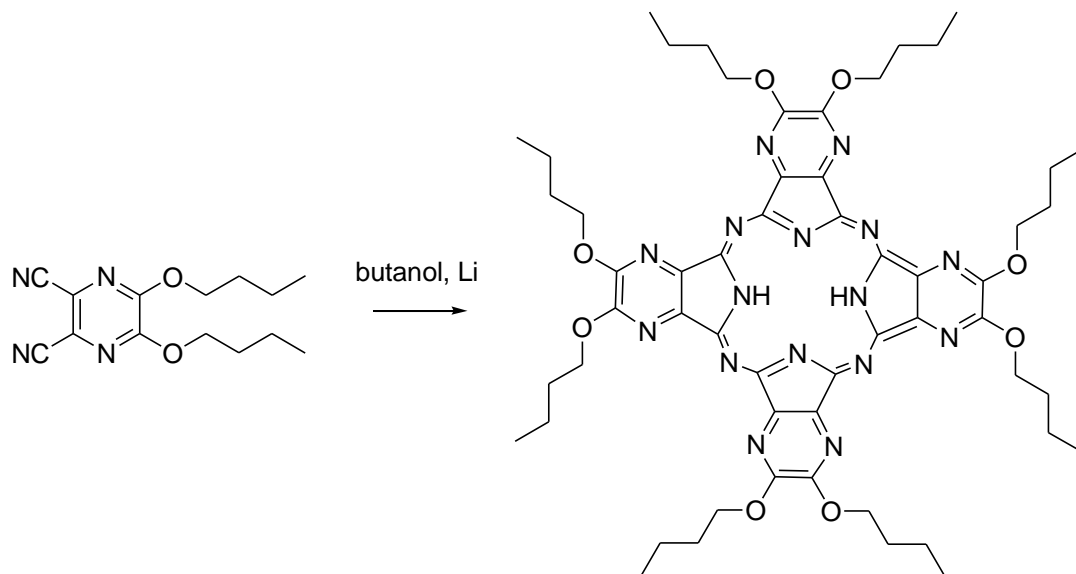


Obr. 21

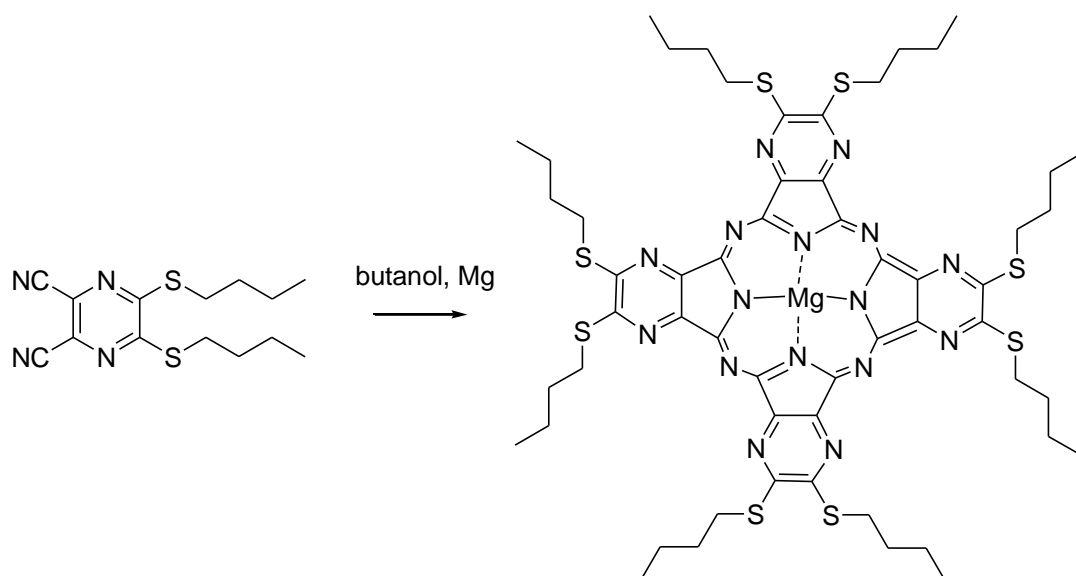


Obr. 22

Bylo pozorováno, že při syntéze tetrapyrazinoporfyrazinů, může docházet vlivem použitého alkoholátu k odtržení periferních řetězců. Neděje se tak v případě řetězců vázaných přes dusík. Daný problém nastává, když má prekurzor postranní řetězec vázaný přes kyslík nebo síru. Pokud je postranní řetězec s alkoxy skupinou shodný s použitým alkoholátem (butoxy, butanolát) je problém vyřešen (obr. 23). V jiném případě dochází na periférii k transesterifikaci použitým alkoholátem. U alkylsulfanyl derivátů je nevhodné provést cyklizaci za pomoci alkoholátu lithného, neboť nastává náhrada alkylsulfanyl řetězců za alkoxy substituenty shodné s použitým alkoholátem. Zde se osvědčil alternativní postup přípravy. Bylo zjištěno, že při použití butanolátu hořečnatého, nedochází k těmto nežádoucím vedlejším reakcím (obr. 24)⁵⁰.



Obr. 23



Obr. 24

5. Experimentální část

Teploty tání byly stanoveny na digitálním přístroji pro stanovování teplot tání Electrothermal IA9200 a nejsou korigovány.

Průběh reakcí a čistota produktů a meziproductů byly kontrolovány tenkovrstvou chromatografií na deskách Merck Silikagel 60 F254 s detekcí UV světlem vlnové délky 254 nm a 366 nm. Vytvájecí soustavy jsou uvedeny u jednotlivých příprav. Sloupcová chromatografie byla provedena na silikagelu Merck 60 (40-63 μm).

NMR spektra byla naměřena na přístroji Varian Mercury VxBB 300 na KAOCH. Měření bylo prováděno při frekvencích 299,95 MHz (^1H NMR) a 75,43 MHz (^{13}C NMR). Posuny jsou vztaženy k vnitřnímu standardu Si (CH_3)₄.

Spektra ve viditelné oblasti byly měřeny na přístroji Shimadzu UV 240 1 PC: UV-VIS recording spectrophotometer na KFCHKL.

Infračervená spektra (IČ) byla měřena IČ spektrofotometrem Nicolet Impact 400 IR-Spectrometer (USA) na KAOCH.

Elementární analýzy byly provedeny na přístroji CHNS-O Elemental Analyzer 1110 (Carlo Erba Instruments) na KFCHKL.

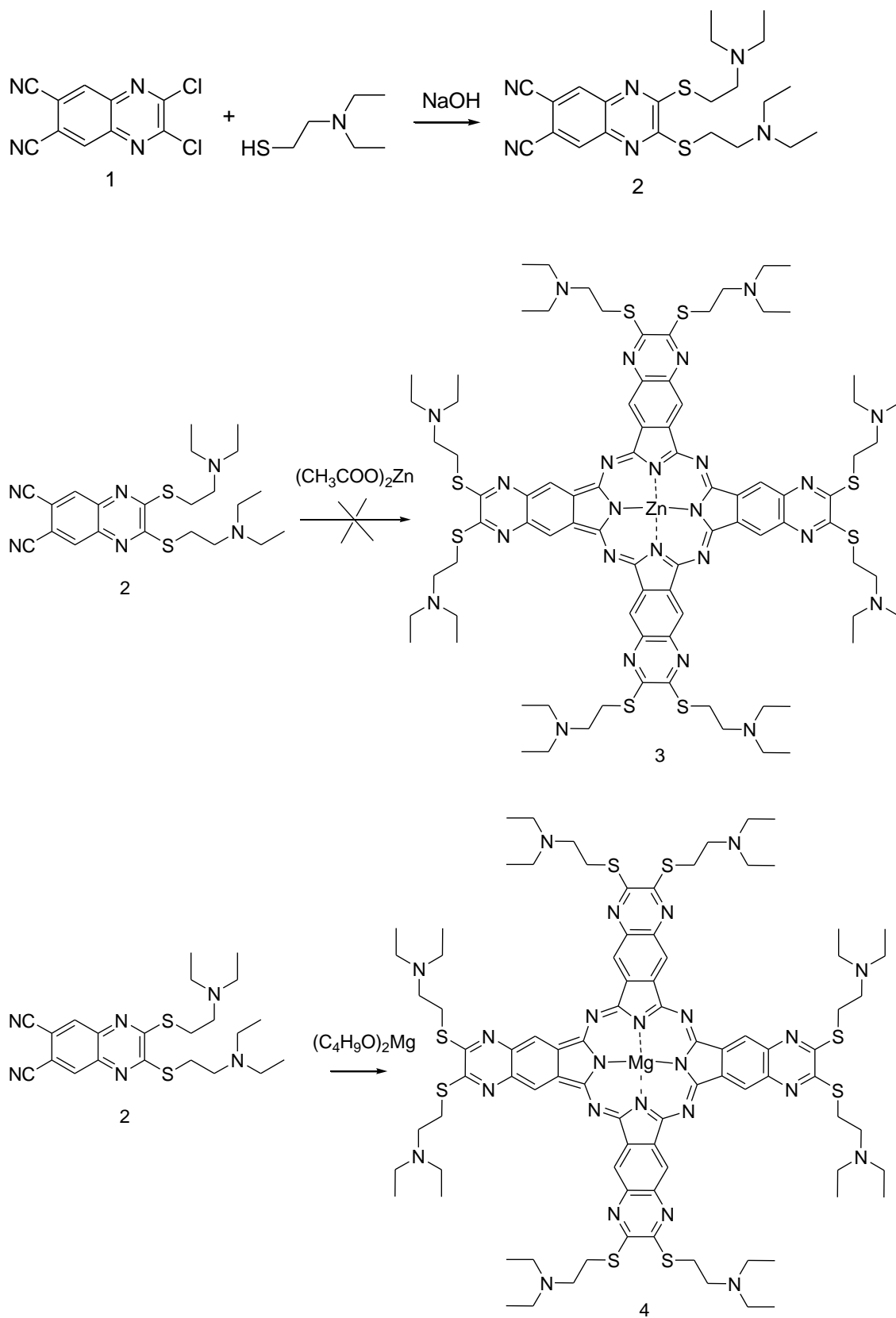
MALDI-TOF hmotnostní spektra byla naměřena v pozitivním módu na hmotnostním spektrometru Voyager-DE STR (Applied Biosystems, Framingham, MA, USA) na Univerzitě obrany, Fakultě vojenského zdravotnictví..

Testy toxicity a fotodynamické aktivity na buňkách Hep2 byly provedeny ve firmě Generi-Biotech, Hradec Králové.

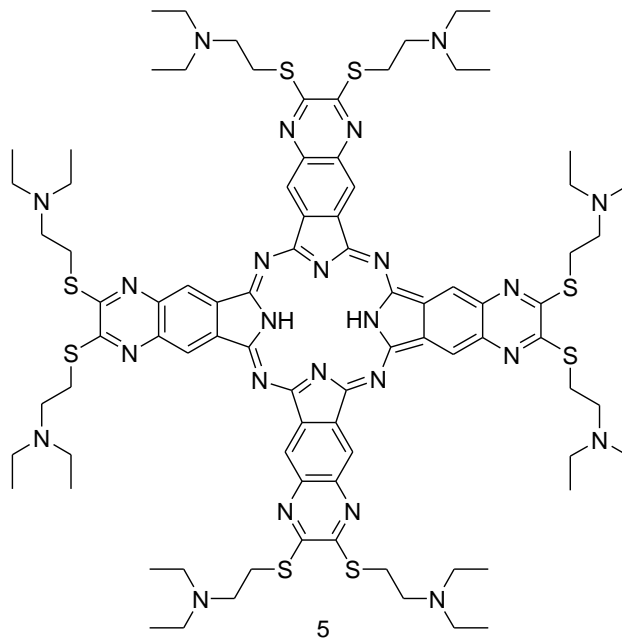
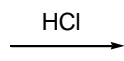
Látky připravené již dříve na Katedře farmaceutické chemie a kontroly léčiv dle publikovaných postupů:

2,3-dichlorchinoxalin-6,7-dikarbonitril (1)⁴⁸

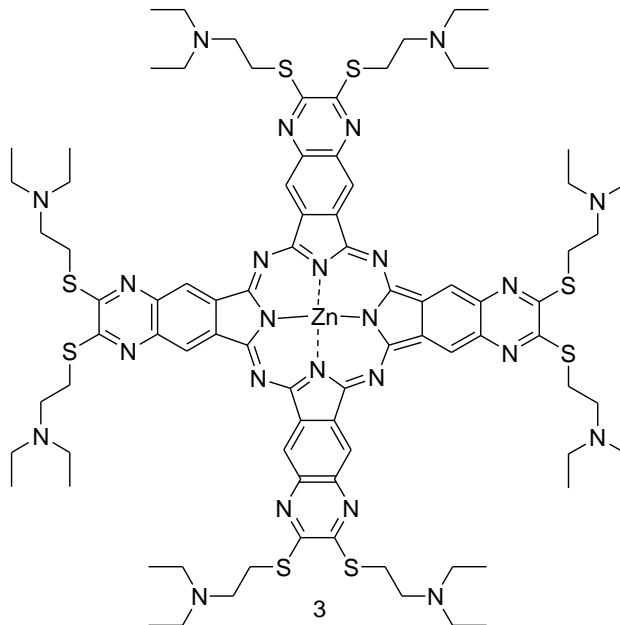
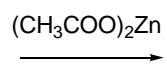
5.1. Schéma prováděných reakcí

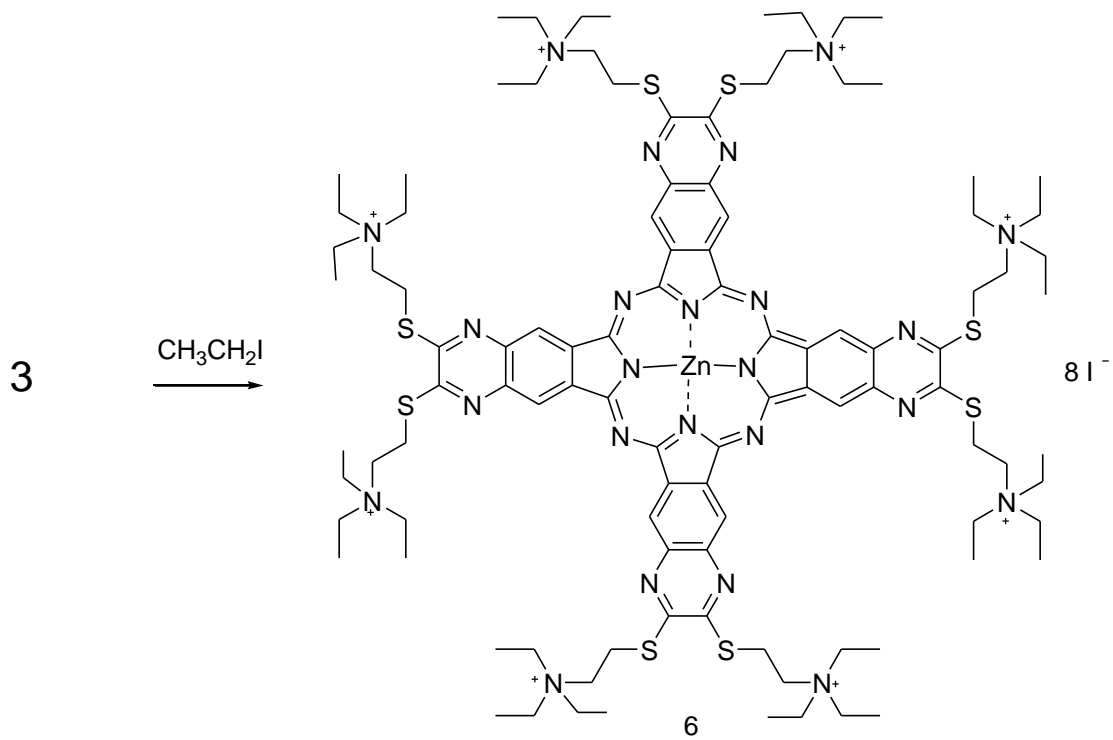


4



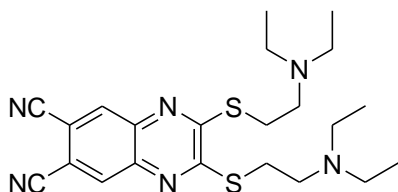
5





5.2. Příprava prekurzoru

5.2.1. Příprava 2,3-bis[2-(diethylamino)ethylsulfanyl]chinoxalin-6,7-dikarbonitrilu (2)



Vodný roztok diethylaminoethanthiol hydrochloridu (42,3 mg; 0,3 mmol) jsem smíchal s 1M roztokem hydroxidu sodného (0,5 ml; 0,5 mmol) a nechal reagovat při pokojové teplotě po dobu 15 minut. Poté jsem do reakce přidal látku **1** (25 mg; 0,1 mmol) suspendovanou v THF (10 ml). Směs změnila okamžitě barvu na žlutou. Reakce probíhala jednu hodinu při pokojové teplotě, poté jsem odpařil THF. Do zbylé vodné suspenze jsem přidal pár kapek NaOH (do zásadité reakce) a oddělil přes filtr produkt, který jsem několikrát promyl vodou. Žlutohnědé krystalky jsem rozpustil v diethyletheru a vytřepal vodou s pár kapkami NaOH. Potom jsem produkt v diethyletheru vytřepal HCl okyselenou vodou a oddělil. K okyselené vodě jsem opět přidal NaOH do bazické reakce a vytřepal několikrát s diethyletherem a organická fáze byla vysušena (Na₂SO₄). Nakonec byl odpařen diethylether.

Výtěžek: 28 mg (62 %)

Popis: žluté krystalky

T.t.: 127,8-128,7 °C

¹H NMR (CDCl₃) δ (ppm) 8,23 (2H, s, aromH); 3,45 (4H, t, *J*=7Hz, S-CH₂); 2,83 (4H, t, *J*=7Hz, N-CH₂); 2,65 (8H, q, *J*=7Hz, N-CH₂), 1,09 (12H, t, *J*=7Hz, CH₃).

¹³C NMR (CDCl₃) δ (ppm) 161,0; 140,2; 134,3; 115,3; 112,2; 50,9; 47,1; 28,9; 12,0.

IČ (KBr) ν (cm⁻¹) 3097; 3073; 3027; 2970; 2934; 2874; 2798; 2237 (CN); 1507; 1470; 1386; 1290; 1265; 1195; 1124; 1069; 1030.

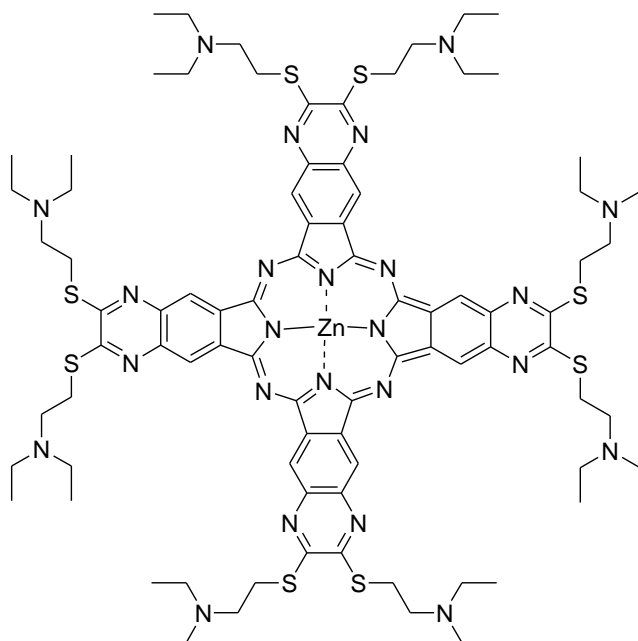
Látka **2** byla převedena na dihydrochlorid po rozpuštění ve směsi aceton/diethylether (1:3), probubláním plynným HCl.

5.3. Příprava tetrachinoxalinoporfyrasinů

5.3.1. Příprava látky **2** před reakcí

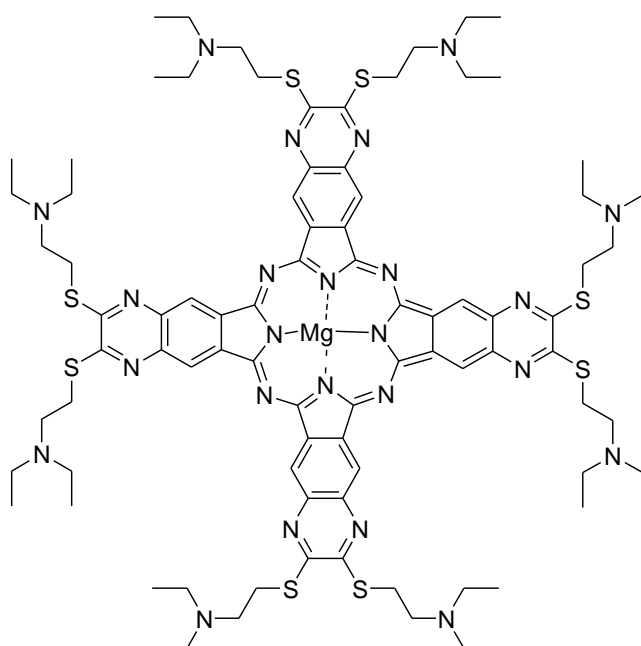
Před reakcí musela být látka **2** uvolněna z formy hydrochloridu, proto jsem ji rozpustil ve vodě a do roztoku přidal po kapkách 1M roztok NaOH až do změny prostředí na alkalické. Látku **2** jsem vytřepal v třepací baňce do diethyletheru. Poté jsem organickou fází vysušil pomocí Na₂SO₄. Obsah kádinky jsem zfiltraval. Do rozpuštěného produktu jsem ještě přidal toluen, aby se tak azeotropně odstranili i případné poslední zbytky vody. Ve vakuové odparce jsem nakonec produkt odpařil do sucha.

5.3.2. Příprava [2,3,11,12,20,21,29,30-oktakis(diethylaminoethylsulfanyl)tetra[6,7]chinoxalinoporfyrinato] zinečnatého komplexu (**3**)



Rozpustil jsem bezvodý octan zinečnatý (46 mg; 0,25 mmol), látku **2** (21 mg; 0,05 mmol) v dimethylformamidu (1 ml). Reakční směs jsem nechal zahřívát na olejové lázni při teplotě 130 °C. Reakce však neproběhla, proto byla ukončena. Tento postup nepřinesl požadovaný výsledek.

5.3.3. Příprava [2,3,11,12,20,21,29,30- oktakis(diethylaminoethylsulfanyl)tetra[6,7]chinoxalin oporfyrazinato] hořečnatého komplexu (**4**)



V čerstvě predestilovaném suchém butanolu (20 ml) jsem nechal 3 hodiny reagovat hořčík (228 mg; 9 mmol) za přídavku malého krystalku jódu. Reakce probíhala při 130 °C pod zpětným chladičem opatřeným sušící rourkou. Po vytvoření butanolátu hořečnatého jsem k reakční směsi přidal látku **2** (401 mg; 0,9 mmol). Za stejných podmínek jsem směs nechal reagovat dalších 24 hodin. Po ukončení reakce jsem odpařil butanol, produkt byl extrahován pomocí THF. Po odpaření THF byl produkt promyt horkým methanolem.

Výtěžek: 158 mg (39 %)

Popis: tmavě modré krystalky

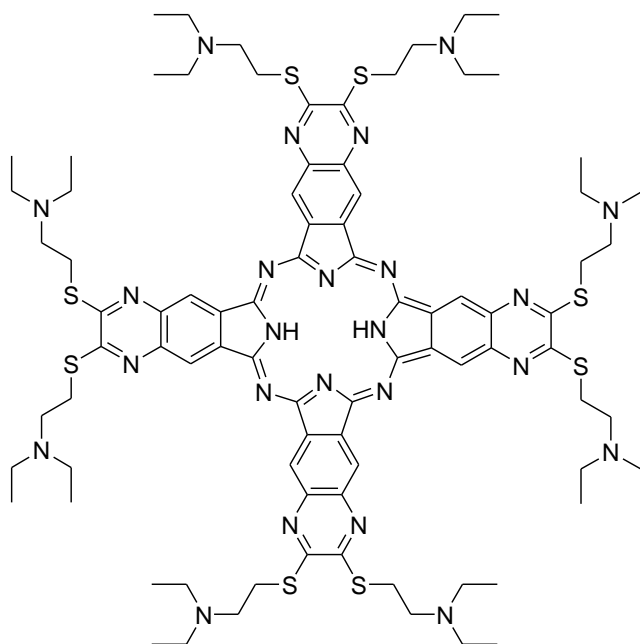
^1H NMR ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) δ (ppm) 9,59 (8H, s, aromH); 4,25-3,95 (broad, 16H, S- CH_2); 3,32 (16H, t, $J=6\text{Hz}$, N- CH_2); 2,95 (32H, q, $J=7\text{Hz}$, N- CH_2); 1,37 (48H, t, $J=7\text{Hz}$ CH_3).

^{13}C NMR ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) δ (ppm) 12,6; 29,9; 47,4; 52,0; 120,7; 137,4; 140,0; 152,6; 156,0.

Sledování kinetiky reakce

Smíchal jsem 17 mg hořčičku se 4 ml butanolu. Po vytvoření butanolátu hořečnatého jsem do reakce přidal 30 mg látky **2**. Pravidelně jsem po 15 minutách odebíral 20 μl z reakční směsi a rozpustil je v 5 ml THF. Absorpci jsem měřil při 742 nm v prostředí THF. Pro kontrolu jsem odebíral po dvou vzorcích od každého měření. Od 165 minuty jsem intervaly měření prodloužil na 30 minut. Po 10 hodinách jsem reakci nechal ještě probíhat dalších 10 hodin a pak jsem naměřil tři poslední dvojice vzorků. Grafy kinetiky jsou v diskuzi.

5.3.4. Příprava 2,3,11,12,20,21,29,30- oktakis(diethylaminoethylsulfanyl)tetra[6,7]chinoxalin oporfyrazinu (**5**)

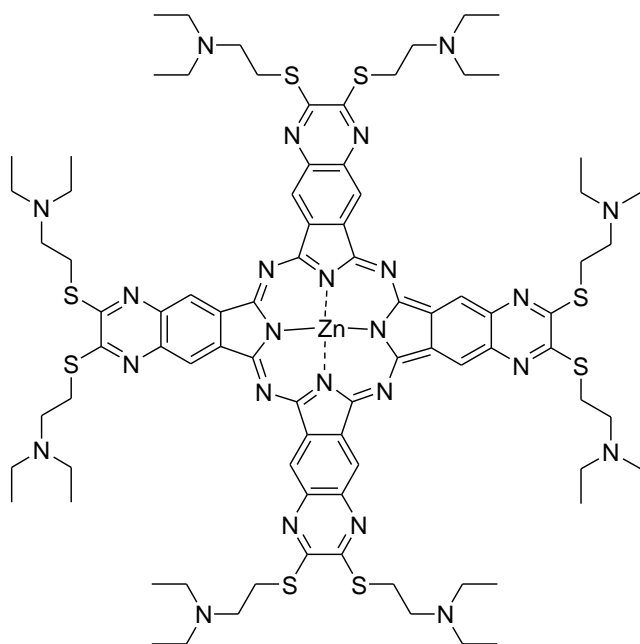


Látku **4** (75 mg; 0,04 mmol) jsem rozpustil ve 2% roztoku HCl (20 ml) za použití ultrazvuku a nechal míchat jednu hodinu při pokojové teplotě. Reakce byla monitorována pomocí TLC pyridin:THF (1:3). Poté byla reakce ukončena a roztok zneutralizován potřebným množstvím koncentrovaného NaHCO₃ a změněn na zásaditý pomocí pár kapek NaOH. Zelený precipitát jsem odfiltroval, promyl vodou a horkým methanolem.

Produkt nebyl dále čištěn, ale použit do další reakce

Výtěžek: 69 mg (93 %)

5.3.5. Příprava [2,3,11,12,20,21,29,30- oktakis(diethylaminoethylsulfanyl)tetra[6,7]chinoxalin o-porfyrinátu] zinečnatého komplexu (**3**)



Látku **5** (38 mg; 0,02 mmol) jsem rozpustil v pyridinu (10 ml). Následně jsem do reakce přidal bezvodý octan zinečnatý (360 mg, 2 mmol) a směs jsem nechal reagovat při teplotě 130 °C. Reakce byla ukončena po 45 minutách. Odpařil jsem pyridin a směs promyl vodou. Zelená pevná látka byla poté rozpuštěna ve 2% roztoku HCl, přefiltrována. Přefiltrovaný roztok jsem zneutralizoval pomocí NaOH. Zelený produkt, vzniklý vysrážením, jsem sesbíral, promyl vodou a horkým methanolem.

Výtěžek: 35 mg (95 %)

^1H NMR ($\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$) δ (ppm) 9,81 (8H, s, aromH); 4,54-3,83 (broad 16H, S- CH_2); 3,44-3,26 (broad 16H, N- CH_2); 2,95 (32H, q, $J=7$ Hz, N- CH_2); 1,37 (48H, t, $J=7$ Hz, CH_3).

^{13}C NMR ($\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$) δ (ppm) 156,6; 152,5; 140,3; 136,9; 121,3; 52,1; 47,4; 30,0; 12,6.

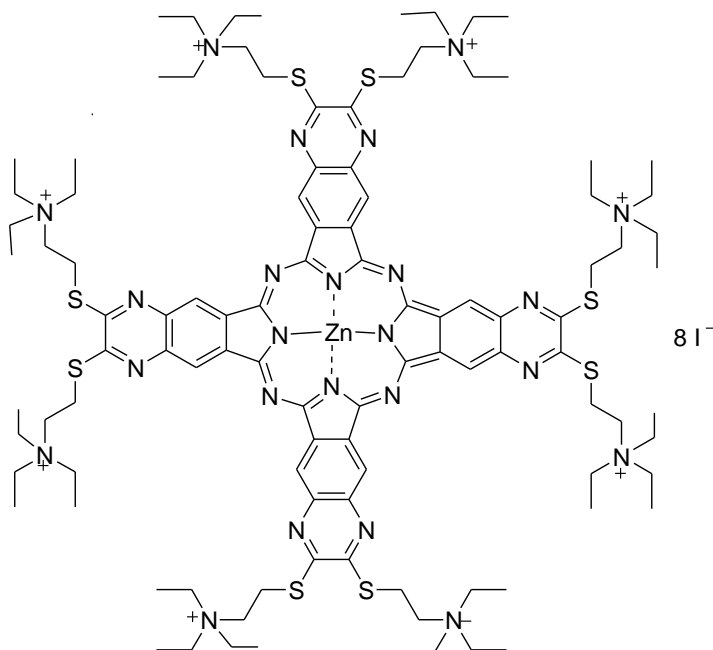
IČ (KBr) ν (cm^{-1}) 2996; 2800; 1633; 1568; 1515; 1452; 1384; 1340; 1309; 1255; 1131; 1022.

MS (MALDI-TOF) m/z 1832 [M] $^+$

UV-vis (pyridin) λ (ϵ) 752 (164000), 693 (87000), 382 (150000).

Elementární analýza vypočítáno pro $\text{C}_{88}\text{H}_{120}\text{N}_{24}\text{S}_8\text{Zn}+3\text{H}_2\text{O}$: C 55,92; H 6,72; N 17,79; nalezeno: C 55,82; H 6,49; N 17,83.

5.3.6. Příprava oktajodidu 2,3,11,12,20,21,29,30- oktakis(triethylammonioethylsulfanyl)tetra- [6,7]chinoxalinoporfyrizinato zinečnatého komplexu (6)



Látka **5** (10 mg; 0,005 mmol) byla rozpuštěna ve 3 ml ethyljodidu a za laboratorní teploty se nechalo míchat dva dny. Poté se do reakce k zelenému precipitátu přidal *N*-methylpyrrolidinon (2 ml). Reakční směs se míchala ještě dalších pět dní při pokojové

teplotě. Následně byla zelená směs přelita do diethyletheru a precipitát byl sesbírán, promyt acetonem a diethyletherem. Poté byl produkt rozpuštěn v methanolu, přefiltrován a odpařen.

Výtěžek: 15 mg (90 %)

Popis: tmavě zelené krystalky

^1H NMR ($\text{D}_2\text{O}-\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$) δ (ppm) 10,0 (8H, s, aromH); 5,08-4,85 (broad 16H, , S- CH_2); 4,16-3,57 (64H, m, N- CH_2); 1,77-1,46 (72H, m, CH_3).

^{13}C NMR ($\text{D}_2\text{O}-\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$) δ (ppm) 153,8; 151,8; 140,0; 121,4; 55,5; 53,4; 30,2; 7,5.

IČ (KBr) ν (cm^{-1}) 2974; 1630; 1452; 1384; 1339; 1255; 1131; 1022.

UV-vis (DMF) λ (ϵ) 748 (372000), 712 (43000), 669 (43000), 389 (154000).

Elementární analýza vypočítáno pro $\text{C}_{104}\text{H}_{160}\text{I}_8\text{N}_{24}\text{S}_8\text{Zn}+4\text{H}_2\text{O}$: C 39,58; H 5,37; N 10,65; nalezeno: C 39,19; H 5,28; N 10,50.

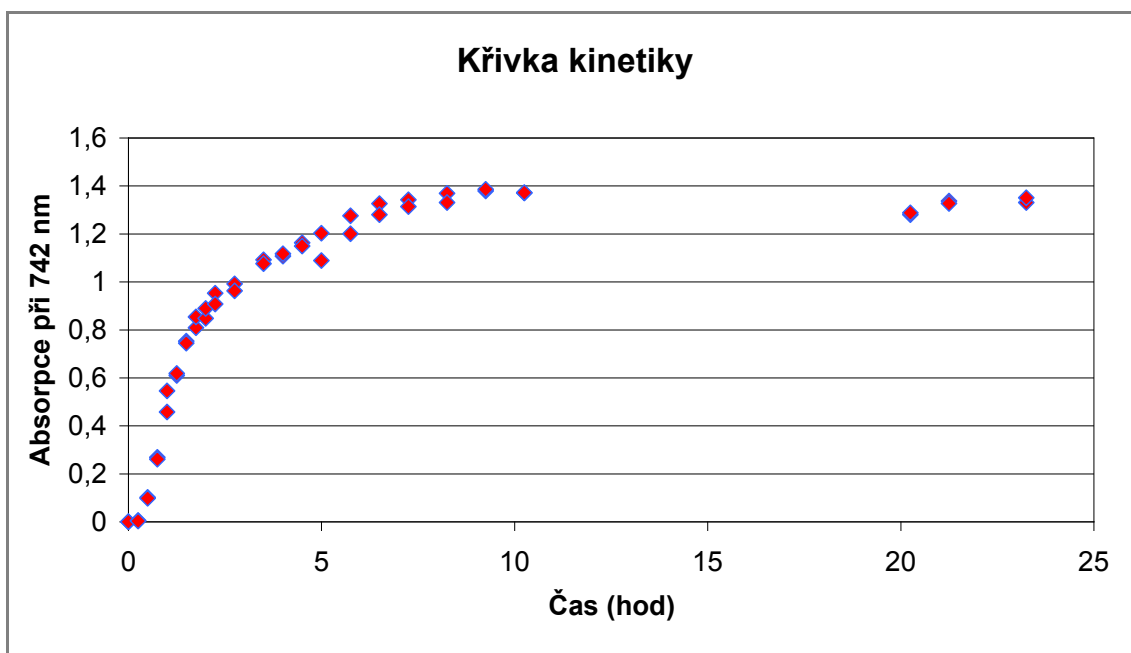
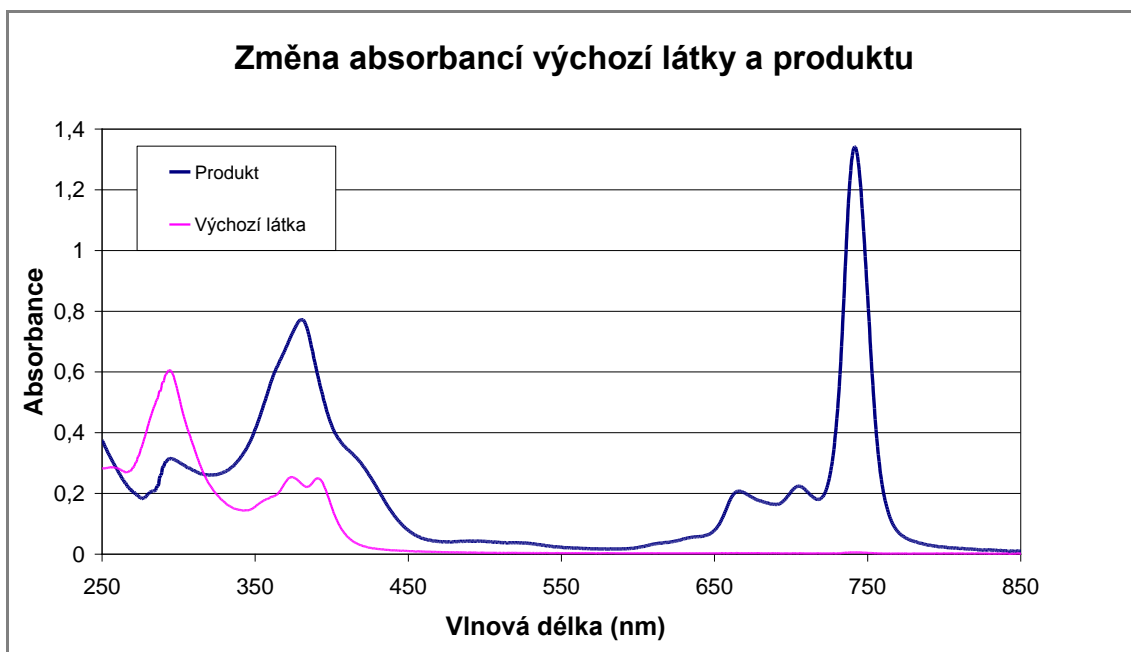
6. Diskuse

Konečný produkt TQP jsem připravil cyklizací prekurzoru 2,3-bis[2-(diethylamino)ethylsulfanyl]chinoxalin-6,7-dikarbonitrilu. Použil jsem právě tento prekurzor, neboť má vlastnosti potřebné pro aplikaci TQP v PDT, které se odrážejí v samotném konečném produktu. Jednak je to objemná diethylamino skupina (viz dále) a alkylsulfanyl skupina, která má pozitivní vliv na produkci singletového kyslíku.

Výchozí prekurzor, 2,3-bis[2-(diethylamino)ethylsulfanyl]chinoxalin-6,7-dikarbonitril, jsem připravil nukleofilní substitucí atomů chlóru 2,3-dichlorchinoxalin-6,7-dikarbonitrilu (**1**) reakcí s diethylaminoethanthiolátem. Uhlíky v poloze 2 a 3 látky **1** jsou silně elektrondeficitní kvůli silnému zápornému indukčnímu efektu atomů dusíku v chinoxalinovém jádře a periferním atomům chlóru. Díky těmto podmínkám se vytváří možnost pro nukleofilní atak thiolátem. Reakce probíhala jednu hodinu za pokojové teploty.

Připravený prekurzor 2,3-bis[2-(diethylamino)ethylsulfanyl]chinoxalin-6,7-dikarbonitril je poměrně nestabilní látka a špatně by se uchovávala. Abych předešel danému problému, převedl jsem látku snadno a kvantitativně na sůl. Přímo před cyklizační reakcí jsem pak látku uvolnil do formy volné baze. Homolog prekurzoru, tedy 5,6-bis(2-diethylaminoethylsulfanyl)pyrazin-2,3-dikarbonitril, byl připravený podobnou metodou, ale s lepším výtěžkem (84 %)⁵⁵.

Pro vlastní cyklizaci prekurzoru jsem použil nejprve postup pomocí octanu zinečnatého v dimethylformamidu, tato reakce vůbec neproběhla. Proto jsem si zvolil druhý postup pomocí butanolátu hořečnatého. Reakce se zdařila, avšak vyžadovala dlouhý čas. Proto jsme pro zjištění doby potřebné k zreagování veškerého prekurzoru provedl kinetiku reakce. Kinetiku reakce jsem sledoval spektrofotometricky v Q – pásu, protože produkt narozdíl od výchozí látky zde velmi intenzivně absorbuje. Křivka kinetiky jasně ukazuje, že reakce je po 12 až 13 hodinách ukončena.



Následně jsem hořčnatý komplex odkovil pomocí kyseliny chlorovodíkové. Reakce proběhla kvantitativně.

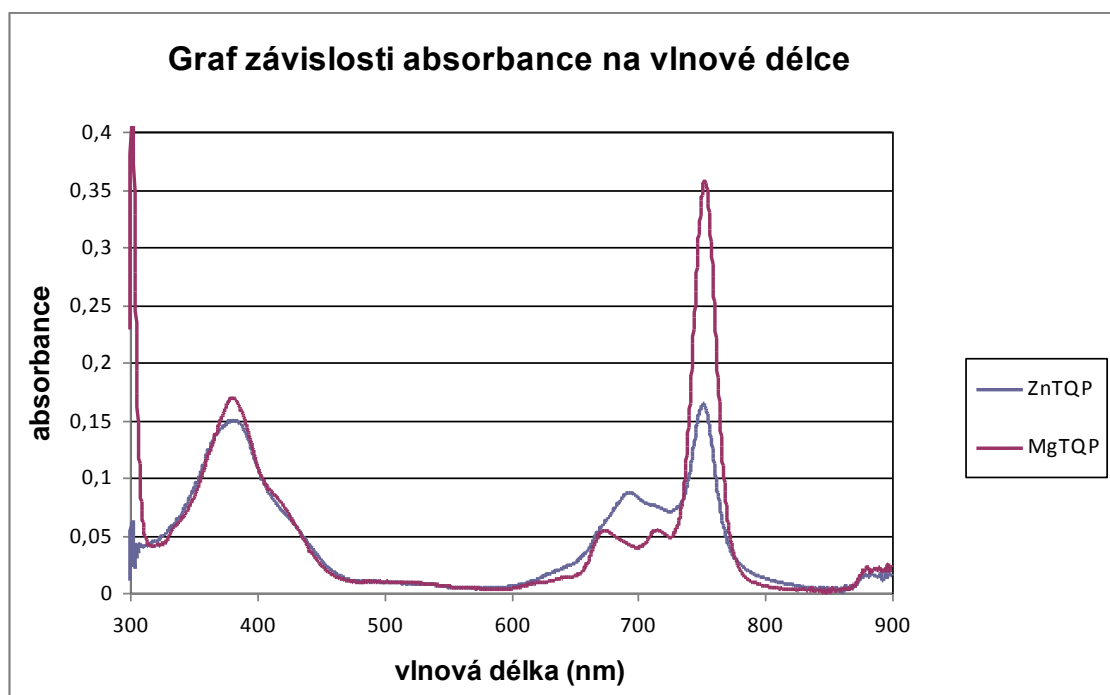
Konečně reakcí bezkovového TQP s octanem zinečnatým v prostředí pyridinu vznikl požadovaný zinečnatý komplex. Reakce probíhala 45 minut. ZnTQP má lepší

vlastnosti, téměř dvojnásobnou produkci singletového kyslíku než hořečnatý komplex, proto byl zvolen jako finální produkt.

Purifikace komplexů pomocí sloupcové chromatografie se neosvědčila a byla i shledána nepotřebnou. Vzniklý produkt TQP jsem přečistil promytím vodou a horkým methanolem.

Jelikož jsou molekuly TQP planární struktury, mají jednu nevýhodnou vlastnost-agregaci. Důsledkem toho je špatná rozpustnost, a následně i problém s čištěním, izolací a charakterizací syntetizovaných produktů. Zavedením periferních řetězců s objemnými substituenty, v mém případě diethylamino skupin, by mělo zajistit monomerizaci plochých molekul. Vypozoroval jsem však, že jak zinečnaté (i v pyridinu) tak hořečnaté komplexy agregovaly (ty méně).

Agregaci lze pozorovat v UV-VIS absorpčních spektrech (viz graf). Je známo, že u agregovaných derivátů dochází k výraznému poklesu extinkčního koeficientu Q-pásu a k objevení se nového maxima při nižších vlnových délkách (v mém případě v oblasti cca 690 nm).



Z grafu je patrný monomerní stav MgTQP **4** a výrazný pokles absorpance v oblasti Q pásu způsobený agregací zinečnatého komplexu **3**.

Kvarternizací pomocí ethyljodidu jsme připravili ve vodě rozpustný TQP, přičemž nabitě skupiny odpuzují elektrostaticky molekuly TQP navzájem od sebe a tím snižují agregaci ve vodném prostředí.

Rozpustný TQP byl testován na fotodynamickou účinnost na buňkách karcinomu děložního čípku (Human Negroid cervix carcinoma) Hep2. Bylo zjištěno, že nemá detekovatelnou toxicitu ve tmě až do koncentrace $c = 200 \text{ mmol}$ (maximální použitá v testech). Po ozáření světlem vlnové délky $> 640 \text{ nm}$ byla zjištěna $IC_{50} = 25 \text{ nmol}$. IC_{50} je definována jako koncentrace, při níž zahyne právě polovina testovaných buněk. Z těchto údajů vyplývá, že by tato látka mohla být velice perspektivní pro PDT.

7. Závěr

V rámci mé diplomové práce jsem připravil:

1. prekurzor:

2,3-bis[2-(diethylamino)ethylsulfanyl]chinoxalin-6,7-dikarbonitril

2. cyklizací prekurzoru 2:

- [2,3,11,12,20,21,29,30-oktakis(diethylaminoethylsulfanyl)tetra[6,7]chinoxalino-porfyrazinato] hořečnatý komplex
- 2,3,11,12,20,21,29,30-oktakis(diethylaminoethylsulfanyl)tetra[6,7]chinoxalinoporfyrazin
- [2,3,11,12,20,21,29,30-oktakis(diethylaminoethylsulfanyl)tetra[6,7]chinoxalinoporfyrazinato] zinečnatý komplex

3. Kvarternizací periferních aminoskupin zinečnatého komplexu pomocí ethyljodu byl připraven:

- oktajodid 2,3,11,12,20,21,29,30-oktakis(triethylammonioethylsulfanyl)tetra[6,7]chinoxalinoporfyrazinato zinečnatého komplexu

8. Literatura

-
- ¹ Wojtyk J.T.C., Goyan R., Gudgin-Dickson E., Pottier R: *Medical Laser Application* 21, 225 (2006).
- ² Detty M.R.,Merkel P.B.: *J. Am. Chem. Soc.* 112, 3845 (1990).
- ³ Fotodynamická terapie maligních nádorů [online]. 1995 [cit. 2009-04-01]. Dostupné z: <http://www.vesmir.cz/clanek/fotodynamicka-terapie-malignich-nadoru>
- ⁴ Zimčík P., Miletín M.: *Čes. Slov. Farm.* 53, 219 (2004).
- ⁵ Von Tappeiner H.: *Münch. Med. Wochenschr.* 44, 5 (1900).
- ⁶ Hausman W.: *Biochem. Zeitschr.* 30, 276 (1911).
- ⁷ Meyer-Betz F.: *Dtsch. Arch. Klin. Med.* 112, 476 (1913).
- ⁸ Kennedy J.C., Pottier J.H.: *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 14, 275 (1992).
- ⁹ Resl V.: *Dermatovenerologie* 49, 28 (2007).
- ¹⁰ Henderson B. W., Dougherty T. J.: *Photochem. Photobiol.* 55, 145 (1992).
- ¹¹ Sharman W. M., Allen C. M., Van Lier J. E.: *Methods Enzymol.* 319, 376 (2000).
- ¹² Jory D., Spikes J. D.: *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 6, 93 (1990).
- ¹³ Sternberg E. D., Dolphin D., Bruckner Ch.: *Tetrahedron.* 54, 4151 (1998).
- ¹⁴ Foote C. S.: *Photochem. Photobiol.* 54, 659 (1991).
- ¹⁵ Patterson M. S., Madsen S. J., Wilson B. C.: *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 5, 69 (1990).
- ¹⁶ Castano A. P., Demidova T. N., Hamblin M. R.: *Photodiagn. Photodyn. Ther.* 1, 279 (2004).
- ¹⁷ Moan J., Berg K.: *Photochem. Photobiol.* 53, 549 (1991).
- ¹⁸ Dolmans D., Dai Fukumura, Rakesh K. J.: *Nat. Rev. Cancer* 3, 380 (2003).
- ¹⁹ Allison R.R., Downie G.H.: *Photodiag. Photodynam. Ther.* 1, 27 (2004).
- ²⁰ Detty M.R., Gibson S.L., Wagner S.J.: *J. Med. Chem.* 47, 3897 (2004).
- ²¹ Kolářová H., v knize: *Klinická radiobiologie* (Kuna P., Navrátil L.), Praha, 2005.
- ²² Zimčík P., Miletín M.: *Čes. Slov. Farm.* 53, 271 (2004).
- ²³ Nyman E. S., Hynninen P. H., *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 73, 1 (2004).
- ²⁴ Jirásková M., Jirásek L.: *Dermatologie pro praxi* 1, 107 (2007).

-
- ²⁵ Zdeňka Kolářková: Bakalářská práce, Studium fotodynamického jevu na buněčných liniích melanomu, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zdravotně sociální fakulta, 2008.
- ²⁶ Stewart F., Baas P., Star W.: *Radiother. Oncol.* **48**, 233 (1998).
- ²⁷ Pharmacyclics [online]. 2006 [cit. 2009-04-05]. Dostupné z: <http://www.pharmacyclics.com>
- ²⁸ Macdonald I. J., Dougherty T. J.: *J. Porphyrins Phtalocyanines* **5**, 105 (2001).
- ²⁹ Miravant Medical Technologies [online]. 2006 [cit. 2009-03-05]. Dostupné z: <http://www.miravant.com>
- ³⁰ Říhová Ambrožová J., Bezděková E., Loučková P., Nekovářová J., Karásková M., Rakušan J., Černý J., Kořínková R.: *Chemické listy* **101**, 315 (2007)
- ³¹ Triesscheijn M., Baas P., Schellens J. H. M., Stewart F. A.: *The Oncologist* **11**, 1034 (2006).
- ³² Cernak A., Cernak M., Trnavec B.: *Medicina pro praxi* **6**, 81 (2009).
- ³³ Kolar P., Vizdova D., Vlkova E.: *Cas. lek. ces.* **145**, 795 (2006).
- ³⁴ Česká vitreoretinální společnost [online]. 2006 [cit. 2009-04-04]. Dostupné z: <http://www.cvrs.cz/vpmd-sekce02.php>
- ³⁵ Meisel M., Kocher T.: *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **79**, 159 (2005).
- ³⁶ Ettlér K.: *Čas. Lék. čes.* **145**, 184 (2006).
- ³⁷ Cresscenzi E., Chiaviello A., Canti G., Reddi E., Veneziani B. M., Palumbo G.: *Mol. Cancer Ther.* **5**, 776 (2006).
- ³⁸ Cresscenzi E., Varriale L., Lovino M., Chiaviello A., Veneziani B. M., Palumbo G.: *Mol. Cancer Ther.* **3**, 537 (2004).
- ³⁹ Corti L., Toniolo L.: *Lasers Surg. Med.* **39**, 394 (2007).
- ⁴⁰ Yeung C. Y., Shek S. Y.: *Lasers Surg. Med.* **39**, 1 (2007).
- ⁴¹ Lu Q. B., *J. Med. Chem.* **50**, 2601 (2007).
- ⁴² Uehara M., Inokuchi T., Ikeda H.: *J. Oral Maxillofac. Surg.* **64**, 390 (2006).
- ⁴³ Stewart F., Baas P., Star W.: *Radiother. Oncol.* **48**, 233 (1998).
- ⁴⁴ Dumoulin F. L., Horst E., Sauerbruch T., Gerhardt T.: *Zentralbl. Chir.* **132**, 336 (2007).
- ⁴⁵ Juzeniene A., Moan J.: *Photodiag. Photodyn. Ther.* **4**, 80 (2007).
- ⁴⁶ Mitzel F., FitzGerald S., Beeby A., Faust R.: *Chem. Commun.* **2001**, 2596.
- ⁴⁷ Haas M., Shi-Xia Liu, Neels A., Decurtins S.: *Eur. J. Org. Chem.* **2006**, 5467.

-
- ⁴⁸ Musil Z., Zimčik P., Miletin M., Kopecký K., Lenco J.: *Eur. J. Org. Chem.* *2007*, 4535.
- ⁴⁹ Zimčik P., Miletin M., Kostka M.: *J. Porphyrins Phtalocyanines.* *21*, 163 (2004).
- ⁵⁰ Zimčik P., Miletin M., Kostka M., Schwarz J., Musil Z., Kopecký K.: *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* *163*, 21 (2004).
- ⁵¹ Freyer W.: *J. Prakt. Chem.* *336*, 693 (1994).
- ⁵² Ohta, K., Watanabe, T., Hasebe, H.: *Mol. Cryst. Liq. Cryst.* *13*, 196 (1991).
- ⁵³ Freyer, W.: *J. Prakt. Chem.* *336*, 690 (1994).
- ⁵⁴ Faust R., Weber Ch.: *J. Org. Chem.* *64*, 2571 (1999).
- ⁵⁵ Zimcik P., Miletin M., Musil Z., Kopecky K., Kubza L., Brault D.: *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* *183*, 59 (2006).