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

RIGORÓZNÍ PRÁCE

Syntéza prekurzorů dusíkatých analogů ftalocyaninů

Hradec Králové; 2010 Mgr. Vendula Stará

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

Rigorózní práce vznikla za podpory grantu SVV-2010-261-001.

V ....., dne..... Podpis:

Na tomto místě bych chtěla poděkovat Katedře farmaceutické chemie a kontroly chemických léčiv a především mému trpělivému školiteli PharmDr. Petru Zimčíkovi, Ph.D.

OBSAH

1. SEZNAM ZKRATEK 6

2. CÍL PRÁCE 7

3. TEORETICKÁ ČÁST 8

3.1. Fotodynamická terapie 8

3.2. Princip PDT a poškození nádorových buněk kyslíkem 9

3.3. Vliv lokalizace PS na buněčném poškození 10

3.4. Vliv lokalizace PS na úrovni cytoskeletu 12

3.5. Princip vaskulárního poškození nádoru 13

3.6. Klinické použití PDT 14

3.7. Aplikace PDT v praxi 15

3.7.1. Karcinom hlavy a oblasti krku 16

3.7.2. Léčba rakoviny jícnu 16

3.7.3. Barretův jícen 17

3.7.4. Karcinom průdušek 18

3.7.5. Karcinom močového měchýře 18

3.7.6. Použití PDT v dermatologii 19

4. METODICKÁ ČÁST 26

4.1. Příprava α-diketonů z oxalylchloridu 26

4.2. Využití α-diketonů pro přípravu PS oktaalkynyltetra[6,7]chinoxalinoporfyrazinu 27

4.3. Využití diketonů pro příprava tetrapyrazinoporfyrazinů (tetraPyPor) 29

4.3.1. Odvození struktrury tetraPyPor 29

4.3.2. Syntéza Si tetraPyPor 30

4.3.3. OktaalkynyltetraPyPor 32

4.3.4. OktakarboxytetraPyPor 34

5. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST 36

5.1. Obecné schéma 37

5.2. Reakce 39

5.2.1. Příprava 5,6-diaminopyrazin-2,3-dikarbonitrilu 39

5.2.2. Příprava dibutylesteru kyseliny vinné 39

5.2.3. Příprava dibutylesteru dioxovinné kyseliny 40

5.2.4. Příprava 1,2-dineopentylethan-1,2-dionu 40

5.2.5. Příprava 2,3-di-neopentylpyrazin-5,6-dikarbonitrilu 41

METODA A 41

METODA B 42

5.2.6. 1.5 Příprava 6,7-dineopentylpyrazino[2,3-b]pyrazin-2,3-dikarbonitrilu 42

METODA A 42

METODA B 42

METODA C 43

5.2.7. Příprava dibutylesteru 6,7-dikyanpyrazino[2,3-b]pyrazin-2,3-dikarboxylové kyseliny 43

5.2.8. Příprava 2,3,11,12,20,21,29,30-oktakis(butoxykarbonyl)tetra(pyrazino[2.3-b]pyrazino)porfyrazináto hořečnatého komplexu 44

5.2.9. Syntéza a izolace nesymetrických azaftalocyaninů 45

6. VÝSLEDKY A DISKUSE 46

7. ZÁVĚR 48

8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY 51

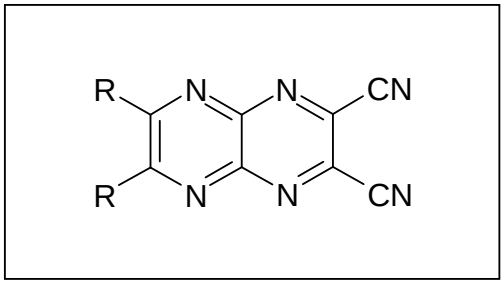
1. SEZNAM ZKRATEK

AKs	aktinická keratóza
ALA	kyselina 5-aminolevulová
AzaPc	azaftalocyanin
AlPc	hlinitý ftalocyanin
ARMD	na věku závislá makulární degenerace oka
BCC	bazocelulární karcinom (bazaliom)
BPD	benzoporfyrinové deriváty
COX	cyklooxygenasa
DAMN	diaminomaleonitril
DMF	dimethylformamid
HpD	hematoporfyrin
IL	interleukin
MAL	methylester kyseliny aminolevulové
MF	mikrofilamenta
MT	mikrotubuly
mTHPC	tetrahydroxyfenylporfyrin
Nd:YAG	neodymium-doped yttrium aluminium garnet laser
NMSCs	nemelanomové kožní nádory
$^1O_2$	singletový kyslík
Pc	ftalocyanin
PDT	fotodynamická terapie
Pp	protoporfyrin
PS	fotosenzitizér
ROS	reaktivní formy kyslíku
SiPc	křemičitý ftalocyanin
SCC	spinocelulární karcinom (spinaliom)
tetraPyPor	tetrapyrazinoporfyrazin
THF	tetrahydrofuran
TNF	tumor nekrotizující faktor
YLC	laserové centrum v Yorkshire
ZnPc	zinečnatý ftalocyanin

2. CÍL PRÁCE

Na Katedře farmaceutické chemie a kontroly léčiv se již delší dobu provádí výzkum nových fotodynamicky aktivních látek typu azaftalocyaninů. Zajímavými látkami se zdají být deriváty s rozšířeným makrocyklickým systémem, které potenciálně mohou absorbovat při vyšších vlnových délkách, což je ve fotodynamické terapii výhodou.

Cílem mé rigorózní práce proto byla syntéza prekurzorů na bázi pyrazino[2,3-b]pyrazinů pro tyto rozšířené makrocyklické systémy a pokusy o syntézu vlastních rozšířených azaftalocyaninů.



Obr. 1: Obecná struktura připravovaných derivátů

3. TEORETICKÁ ČÁST

3.1. Fotodynamická terapie

Fotodynamická terapie (PDT) je minimálně invazivní terapeutická metoda, jež se osvědčila pro klinickou léčbu některých typů rakoviny a neonkologických onemocnění. Principem této metody je selektivní akumulace sloučeniny s fotosenzitivními vlastnostmi ve zhoubné tkáni. Tato sloučenina se nazývá fotosenzitizér (PS). Aktivací PS viditelným světlem dojde k tvorbě reaktivních forem kyslíku, zejména singletového kyslíku, jež je zodpovědný za cytotoxicitu nádorových buněk. Výsledky PDT jsou různé. U rozvinutých nádorů může dojít ke zpomalení jeho růstu a tím se může zlepšit délka a kvalita života pacientů nebo může dojít až ke kompletní regresi tumoru[1].

Hlavní výhody PDT oproti jiným běžným metodám léčby rakoviny jsou:

- Nízká systémová toxicita (vzhledem ke skutečnosti, že PS jsou aktivovány pouze za přítomnosti světla), takže lze terapii v krátkém čase mnohonásobně opakovat.
- Nejvýznamnější výhodou je to, že se řadí mezi neinvazivní metody.
- Schopnost zabíjet nádory selektivně (PDT ničí pouze nádorové buňky a okolní zdravé buňky zůstávají neporušeny).
- PDT může být aplikována buď samostatně nebo také v kombinaci s ostatními léčebnými postupy jako chemoterapie, radioterapie, imunoterapie či chirurgie.
- V závislosti na typu nádoru či na jeho lokalizaci lze PS aplikovat systémově či topicky.

3.2. Princip PDT a poškození nádorových buněk kyslíkem

PDT je založena na indukci buněčné smrti kombinací viditelného světla, sloučeniny s fotosenzitivními vlastnostmi (PS) a kyslíku. Léčba se skládá z aplikace PS, jež se selektivně kumuluje v nádorové tkáni. Následuje expozice světlem vhodné vlnové délky. Přednostně se používají vlnové délky v červené oblasti viditelného spektra nad 600 nm, kdy jsou tkáně více propustné pro světlo. Světlem indukovaná excitace PS má za následek přenos absorbované energie na kyslík O_2, čímž dojde ke vzniku singletového kyslíku ($^1O_2$) a jiných vysoce reaktivních forem kyslíku. Tyto cytotoxické fotoprodukty vznikají z PS při ozáření světlem a startují kaskádu biochemických pochodů, které vyvolávají poškození a smrt nádorových buněk[2].

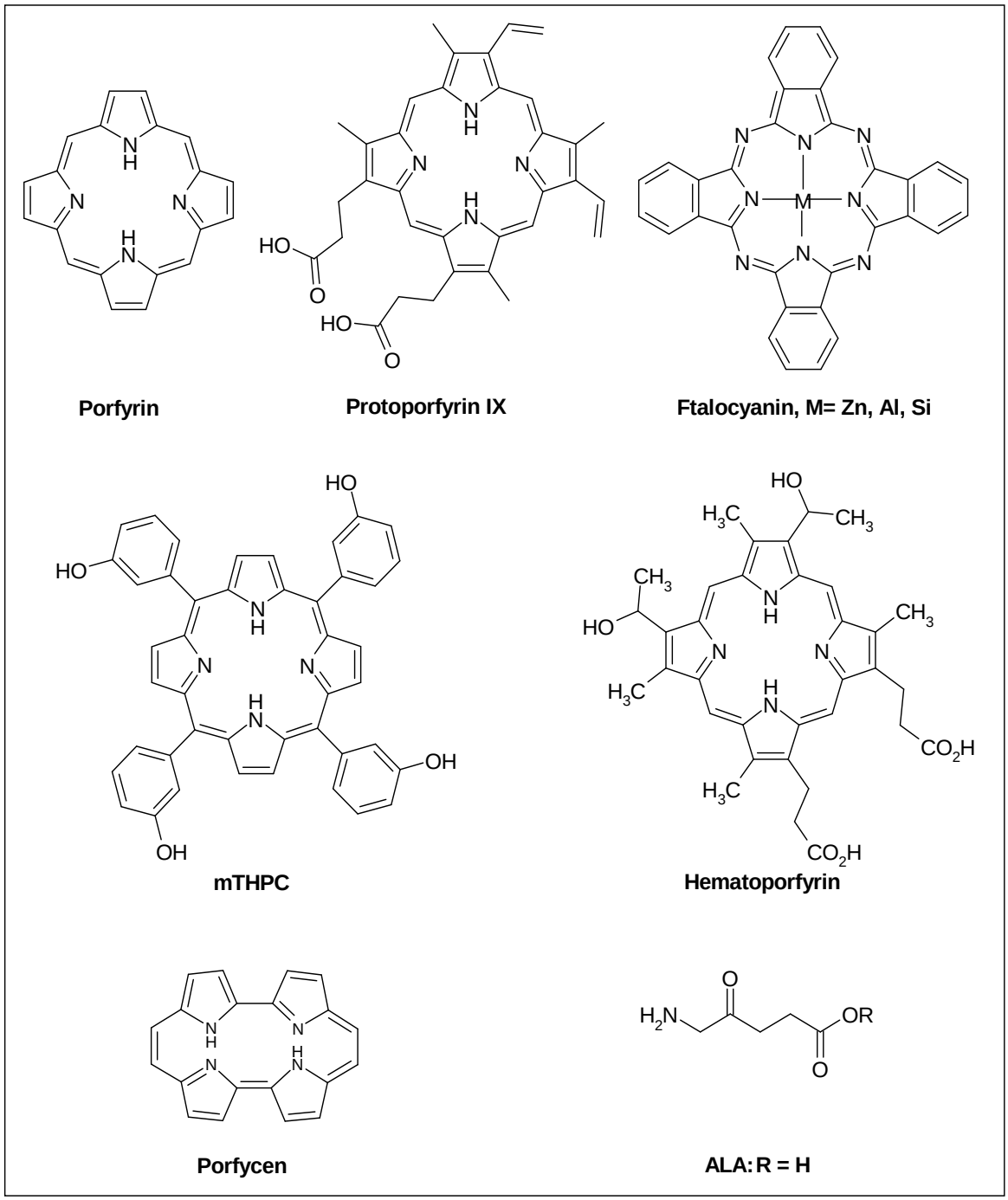
Singletový kyslík vytvořený fotochemickou reakcí může přímo usmrtit buňky nádoru indukcí apoptózy a nekrózy[3] tím, že napadá okolní biomolekuly (zejména molekuly obsažené v membránách, cholesterol, nenasycené mastné kyseliny a aminokyseliny, tryptofan, methionin, histidin a DNA), které potom přestávají plnit své biologické funkce a tak dochází k poškození či smrti buňky[4]. Je vysoce reaktivní a může pronikat jen do hloubky 0,01-0,02 µm, proto by měl být PS lokalizován v době ozařování blízko jeho cíle. Doba jeho života je různá a liší se v závislosti na prostředí, ve kterém se nachází (voda 2-4 µs, lipidy 50-100 µs, organická rozpouštědla 10-100 µs a okolo 0,6-0,004 µs v biologickém prostředí). Protože není schopen penetrovat hlouběji než je přibližně šířka lipidové buněčné membrány, je zaručeno, že přímým účinkem PDT budou usmrceny pouze buňky obsahující PS.

Buňky nádoru nemusí být vždy přímým cílem, ale mohou být nepřímo usmrceny následkem poškození jiných buněčných typů, například cévních endoteliálních buněk[5] nebo díky cytokinům a dalším mediátorům zánětu uvolněných z napadených buněk v důsledku aktivace imunitního systému. Obecně lze říci, že hydrofóbní PS působí spíše přímým efektem na buňky a hydrofilní PS spíše poškozují cévy a brání tak přísunu živin[6].

3.3. Vliv lokalizace PS na buněčném poškození

Chemické a fyzikálně-chemické vlastnosti PS, jeho způsob podání a koncentrace, inkubační doba, dávka světla a typ nádorové buňky jsou důležitými faktory, jež ovlivňují lokalizaci PS v buňce a buněčné poškození působením reaktivních forem kyslíku (ROS). Ukázalo se, že použitím PDT mohou být poškozeny rozdílné organely jako plazmatická membrána, lysosomy, mitochondrie, Golgiho aparát, endoplazmatické retikulum, jádro a také cytoskelet a komponenty buněčné adheze.

Byly popsány tři hlavní morfologie programované smrti buňky (apoptóza, nekróza a autofagie), jež jsou spojené s lokalizací PS. Induktory apoptózy jsou PS, jež se lokalizují v mitochondriích či endoplazmatickém retikulu, naproti tomu PS lokalizované v Golgiho aparátu, v lysosomech, v cytoplazmatické membráně, nebo jež zůstávají difúzně distribuovány v cytosolu jsou více spojeny s nekrózou. Bylo také popsáno, že po PDT s některými PS se vyskytuje v buněčných kulturách autofagie. Do mitochondrií se cíleně lokalizují hlinité (AlPc) a křemičité ftalocyaniny (SiPc), protoporfyrin IX (PpIX), kyselina 5-aminolevulová (ALA), tetrahydroxyfenylporfyrin (mTHPC), benzoporfyrinové deriváty (BPD) a porfyceny. Naproti tomu lysosomální lokalizace byla pozorována u fenantroperylenochinonhypericinu, zatímco zinečnaté ftalocyaniny (ZnPc) se akumulují zejména v Golgiho aparátu. Lokalizace PpIX byla popsána také v cytosolu a v buněčných membránách a Photofrin® se lokalizuje v Golgiho aparátu a v plazmatické membráně[7, 8, 10].



Obr. 2: Příklady fotosenzitizérů[9, 16]

3.4. Vliv lokalizace PS na úrovni cytoskeletu

Lokalizace PS v cytosolu je namířena na cytoskeletové komponenty a komplexy buněčné adheze. Cytoskelet hraje významnou roli ve většině buněčných procesů, jež souvisejí s nádorovým růstem (např. buněčná pohyblivost, dělení a transport vezikul), proto je cílení na cytoskelet důležitým cílem protirakovinové PDT. Bylo zjištěno, že po použití PDT s porfyriny (Photofrin®, BPD), ftalocyaniny (ZnPc, AlPc) a porfyceny byly změněny mikrotubuly. Tyto výsledky ukázaly závislost dávky PS a času na mikrotubulárních změnách u rakovinových buněk. K modifikaci mezifázové mikrotubulární sítě docházelo při vystavení buněk dávkám indukujících buněčnou úmrtnost okolo 40-60 %. Kromě toho byla PDT schopna vyvolat zablokování buněčného cyklu v přechodu metafáze-anafáze, což vedlo ke smrti buněk apoptózou[10].

Mikrotubuly (MT) a mikrofilamenta (MF) jsou velmi citlivé na sloučeniny, jež ovlivňují jejich polymerizační-depolymerizační dynamiku, jako např. faloidin (toxický alkaloid obsažený v muchomůrce zelené[52]) a cytochalasin. Vystavení keratinocytů a fibroblastů fotosenzitizaci Photofrinem®, BPD, ALA nebo ZnPc vyvolává perturbaci MF, která je doprovázena ztrátou buněčné adheze, jež může být důsledkem depolymerizace MF, stejně tak jako poklesem exprese aktinem asociovaných adhezních proteinů α-aktininu nebo β-kateninu[11, 12]. Specifické mechanismy, podle kterých jsou MF a MT poškozeny jsou nejasné. PS nacházející se v cytosolu by mohl poškodit MT nebo MF přímo produkcí singletového kyslíku. V případě lokalizace PS uvnitř organel vyvolává poškození nepřímé. V každém případě je u těchto cytoskeletálních komponentů efekt PDT zřejmý[8].

3.5. Princip vaskulárního poškození nádoru

Rakovinové buňky se šíří do vzdálených orgánů cévním uspořádáním nádoru a pro jejich životaschopnost je nezbytný přísun živin a molekulárního kyslíku. Z toho důvodu se považuje zaměřování cévního zásobení nádoru za slibný přístup v léčbě rakoviny. Bylo zjištěno, že k vaskulárnímu poškození přispívají PS jako je HpD, Photofrin®, BPD. Tyto PS vyvolávají vazokonstrikci a vznik trombotických uzávěrů a tím omezují zásobení nádorových buněk kyslíkem, což je spojeno s inhibicí nebo zpomalením růstu tumoru[13, 14].

Poškozením endoteliálních buněk v léčeném nádoru se aktivuje kaskáda událostí, jež vede k dilataci cév, k agregaci krevních destiček, k místnímu zánětu a má také modulační efekt na imunitní systém[11, 15]. Následné akutní cévní poškození je zodpovědné za smrt neoplastických buněk. V důsledku akutní zánětlivé odpovědi se spouští infiltrace granulocytů a makrofágů, jež jsou schopny rychle zlikvidovat nekrotické a apoptické buňky. Mrtvé buňky mohou také stimulovat mikroprostředí nádorů a přispět tak k aktivaci faktorů jako je: cévní endoteliální růstový faktor, cyklooxygenasa (COX-2), prostaglandiny, tumor nekrotizující faktor α (TNF-α), matrixové metaloproteinasy a cytokiny (IL1β, Il6 a IL8).

Zatímco rakovinové terapie jako je chemoterapie a ionizující záření jsou imunosupresivní a jsou toxické ke kostní dřeni (jako zdroji všech buněk imunitního systému), může PDT společně s jinými lokálními rakovinovými terapiemi (kryoterapie a hypertermie) spouštět imunitní systém[1].

3.6. Klinické použití PDT

PDT je užívána pro léčbu endoskopicky přístupných nádorů plic, močového měchýře, gastrointestinálního traktu a gynekologických nádorů a také v dermatologii pro léčbu nemelanomních rakovin kůže (karcinom bazálních buněk) a prekancerózních stavů (keratóza z ozaření)[1]. Pro léčbu četných rakovin byly vyvinuty za posledních 30 let klinické protokoly. Velmi vysoké procento pacientů má na PDT dokonalou odpověď (citlivost) a četnost recidiv není větší, než bylo zaznamenáno u jiných léčebných metod. Byly také zkoumány procedury *ex vivo* pro léčbu pacientů s leukémií kostní dřeně a transplantací kmenových buněk.

PDT je také používána pro léčbu nekancerózních stavů jako je psoriáza a na věku závislá makulární degenerace oka (ARMD). Donedávna byl jedinou reálnou možností pro snížení rizika ztráty zraku u ARMD fotokoagulační laser, ale ten se hodil jen pro asi 15 % pacientů. Bylo zjištěno, že PDT je mnohem více tolerovaná léčba, jež stabilizuje či zpomalí ztrátu zrakové ostrosti u dospělých pacientů a je vhodnou léčbou pro 30-40 % ze všech případů ARMD.

PDT je také úspěšná v léčbě arteriosklerózy či arteriálních plátů. Kombinace PS a cévních katetrů k doručení světla se nazývá fotoangioplastika, jež je bezpečná s minimálním poškozením cév v ošetřovaných oblastech a je velmi dobře tolerovaná[16].

Navíc je PDT středem zájmu nových rozvojů v oblastech jako genová terapie a sterilizace krve. PDT je také účinná proti lokálním virovým nemocím jako herpesy[17] a byla také použita pro odstranění virových a bakteriálních patogenů z krve a krevních produktů[18].

3.7. Aplikace PDT v praxi

PDT je spíše místní než systémové ošetření, proto je vhodná pouze pro lokalizované onemocnění. Světlo vlnových délek použité k excitaci běžných PS může podnítit fotochemickou indukcí nekrosu tkáně až do maxima 10 mm[19]. To znamená, že by měla být primárně indikována pro povrchové ozařování malých, dostupných nádorů. Může být rovněž použita v kombinaci s chirurgickým zmenšením (odstraněním) nádoru pro paliativní léčbu větších nádorů[20].

PDT je léčba zahrnující jednorázové injekce látky, které jsou následovány po jistém časovém intervalu jednorázovým ozářením. Toto je velmi často vykonáno ambulantně. Naopak v porovnání s jinými léčebnými režimy můžeme říci, že radioterapie zahrnuje každodenní ozařování po dobu 6-7 týdnů (opět ambulantně), rozvrhy chemoterapie se různí, ale typicky trvají po dobu několika měsíců a operace vyžaduje na druhou stranu celkovou anestézii a hospitalizaci po jeden až několik týdnů[21, 22].

Velkou výhodou je omezená penetrace světla, jež má za následek ochranu normální zdravé tkáně v blízkosti nádoru před fototoxicitou. Moderní technologie používající optická vlákna usnadňuje doručení světla požadované vlnové délky přímo k nádorům lokalizovaných prakticky kdekoliv v těle. Toto lokalizované ozařování společně se stíněním citlivých tkání v okrajových oblastech umožňuje specifické ošetření nádoru. Naproti tomu operace a radioterapie nádorů může být velmi poškozující a může vézt ke ztrátě tkáňové funkce. PDT má výhodu minimální fibrózy tkáně, jež má za následek funkční zotavení bez zjizvení. Šetří strukturu tkáně, protože není poškozen subepiteliální kolagen a elastin a jsou zachovány nebuněčné podpůrné elementy jako matrice pro regeneraci normální tkáně[12, 23].

3.7.1. Karcinom hlavy a oblasti krku

Počáteční stádia karcinomů v oblasti hlavy a krku jsou normálně léčena operativně nebo radioterapií, zatímco pro pokročilé onemocnění je standardním ošetřením chemoradiace. Prognóza vyléčení je dobrá zejména pro časná stádia nemoci, ale může být spojena s vysokou morbiditou. Chirurgická resekce může být příčinou funkčního poškození přiléhajících struktur a má také za následek vznik nežádoucích účinků jako jsou polykací potíže a porucha řeči. Radioterapie je také spojená s rizikem suchosti úst, vznikem křečí žvýkacích svalů a dokonce osteonekrózou. PDT je stejně účinná jako kurativní operace či radioterapie pro malé povrchové nádory či paliativní léčbu recidivujících onemocnění, ale má výhodu zachování tkáně pod nádorem a vynikající dlouhodobé funkční a kosmetické výsledky.

Počáteční PDT studie zaměřené na pacienty s karcinomem hlavy a krku používaly jako PS deriváty hematoporfyrinu (HpD) či porfimer sodný a dávky světla 100-200 J/cm^2, ale dnes je více používaným PS v této aplikaci mTHPC v kombinaci s 10-20 J/cm^2 [24, 25].

U pacientů s nádory hlavy a krku je při radikální léčbě primárního nádoru celoživotní riziko 20-30 % rozvoje sekundárních či mnohonásobných rakovin. Opakovaná operace je obtížná kvůli progresivní ztrátě tkáně a opakované ozařování bývá spojeno s tolerancí tkáně. Ve srovnání s tím se po PDT nevyskytuje žádná kumulativní tkáňová toxicita, která může vzniknout po radioterapii či operaci[26, 27]. PDT může být také efektivní jako záchranná léčba opakujících se rakovin hlavy a krku u pacientů, kde selhala konvenční terapie[18, 28, 29].

3.7.2. Léčba rakoviny jícnu

Standardní léčbou karcinomu jícnu byla ektomie jícnu, jež je ale spojená s vysokou morbiditou a mortalitou. To vedlo k vývoji méně invazivních procedur, jako endoskopická mukózní resekce, koagulace a PDT. Pro PDT se při ozařování používají flexibilní cylindrické rozptylovače, které se prostřednictvím endoskopu zavedou do blízkosti nádoru. PDT je účinná jako kurativní léčba malých povrchových nádorů jícnu[30] a jako paliativní léčba obstrukčních nádorů[31]. Ve skupině se 123 pacienty léčených porfimerem sodným jako PS[32] bylo dosaženo

z 87 % celkové odpovědi na léčbu po 6-ti měsících a celkového přežití po pěti letech z 25 %. Srovnatelné výsledky byly také získané použitím mTHPC jako PS[33].

Vedlejší účinky léčby tohoto tenkostěnného dutého orgánu mohou být navzdory účinnosti PDT v léčbě karcinomu jícnu nepříznivé. Až u 57 % pacientů léčených PDT s použitím červeného světla se k přechodné fotosenzitivitě kůže může připojit stenóza, fistule a perforace[25, 33, 34]. Nicméně bylo zjištěno, že při použití mTHPC v kombinaci s méně pronikajícím zeleným světlem nebyly pozorovány žádné fistule či perforace, přičemž nebyla oslabena účinnost[25].

3.7.3. Barretův jícen

Barretův jícen je prekancerózní stav vznikající v důsledku dlouhotrvajícího gastroezofageálního refluxu, při němž dochází ke změnám na sliznici jícnu (jde o typ metaplazie, kdy je normální epitel nahrazován epitelem obdobného charakteru jako v žaludku). V této oblasti je zvýšené riziko vzniku krvácejícího vředu či zhoubného nádoru. Tato metaplastická tkáň se může vyvinout z podřadného stavu až k vysokému stupni dysplazie (označení histologických změn, jež mohou předcházet vzniku nádoru) a nakonec invazivnímu adenokarcinomu (zhoubný nádor ze žlázového epitelu). Z Barretova jícnu se vyvíjí kolem 50 % všech karcinomů jícnu s velmi špatnou prognózou, proto má efektivní léčba Barrettova jícnu majoritní význam. PDT je zvláště vhodná pro léčbu premaligních stavů Barretova jícnu[35, 52].

Světové randomizované kontrolované studie demonstrovaly, že porfimer sodný může odstranit v 77-96 % případech Barrettův jícen s vysokým stupněm dysplazie, ve srovnání s 39 % případů po terapii samotným omeprazolem[36]. Tyto studie doložily významné snížení rizika karcinomu jícnu u pacientů léčených s porfimerem sodným.

U 58 % pacientů, kteří prodělali pečlivou endoskopickou kontrolu, byly objeveny oblasti trvalé Barrettovy mukózy[37, 38]. V klinické praxi jsou tyto oblasti trvalé Barrettovy glandulární mukózy zničeny použitím Nd:YAG (neodymium-doped yttrium aluminium garnet) laseru nebo koagulačního paprsku tak, aby se předcházelo opětovnému rozvoji dysplazií anebo karcinomů[39]. Ukázalo se, že kombinace PDT s endoskopickou mukózní resekcí byla téměř tak efektivní jako ektomie jícnu, ale s mnohem menší morbiditou[40].

3.7.4. Karcinom průdušek

Již mnoho publikací poukázalo na terapeutickou prospěšnost PDT v různých stupních onemocnění průdušek. Paliativní léčba obstruktivní rakoviny s použitím HpD či porfimeru sodného jako PS byla bezpečná a měla za následek úlevu od příznaků téměř u všech pacientů. Vedlejší účinky zahrnují kromě kožní fotosenzitivity také kašel, vykašlávání nekrotické tkáně a dušnost po dobu několika dnů po PDT. Příležitostně bylo hlášeno vážné či dokonce fatální krvácení, jež se ale také může samovolně vyskytovat u tohoto onemocnění a proto se toto krvácení nedá přisuzovat PDT.

PDT byla také použita jako kurativní léčba časných stádií rakoviny plic. Léčbu pacientů s rozsáhlým centrálním karcinomem plic začalo v roce 1990 laserové centrum Yorkshire laser centre (YLC) v Goolu v Anglii[41].

3.7.5. Karcinom močového měchýře

Pro léčbu recidivující rakoviny močového měchýře byla již v roce1975 použita metoda PDT s využitím HpD jako PS[42] a o pár let později byl jako PS pro léčbu karcinomu močového měchýře poprvé použit porfimer sodný. V roce 1980 několik klinických studií prokázalo, že PDT s použitím HpD či porfimeru sodného byla účinná pro povrchové, recidivující rakoviny močového měchýře[43, 44, 45]. Ve srovnání s odpověďmi po transuretrální resekci či léčbě s použitím bakterií Calmette-Guerin byly počáteční odpovědi na léčbu velmi vysoké (70-100 % ve třech měsících) s dlouhodobou odpovědní reakcí 30-60 %. Avšak pro celý močový měchýř znamenala PDT velmi vysoký výskyt vedlejší účinků (opakované močení, bolesti a trvale snížená kapacita močového měchýře). Tyto komplikace byly v časných studiích spojené s nadměrnými světelnými dávkami a nerovnoměrným dodáváním světla. Nseyo U. O. ukázal, že při použití nižších dávek léčiv a světla[46] by mohla být odpovědní reakce nádoru dosažena bez transmurálního poranění močového měchýře či morbidity související s léčbou[47]. V novější době může být použita pro opakující se povrchové rakoviny močového měchýře ALA. PDT s použitím ALA, či v kombinaci s mitomycinem C měla za následek 40-52 % kompletní odpověď v 18-24 měsících bez trvalého snížení kapacity močového měchýře[48, 49, 50].

3.7.6. Použití PDT v dermatologii

PDT už byla úspěšně použita pro léčbu:

- **Aktinické dermatitidy**:[1] onemocnění kůže vzniklé v důsledku ozáření[52].
- **Bowenovy dermatózy**:[1] nádorové onemocnění kůže, při němž nádorové buňky zůstávají ohraničeny na pokožku, někdy však mohou přecházet ve spinaliom[52].
- **Keratoakantomu**:[1] kožní vyvýšený, rychle rostoucí nádorek, jež dosahuje velikosti někdy až několika centimetrů, může připomínat spinaliom, po období rychlého růstu do několika měsíců sám ustupuje se zanecháním jizvičky, odstraňuje se při pochybnosti o jeho původu či z kosmetických důvodů[52].
- **Aktinického zánětu rtu**[1]
- **Lymfomu**[1] jde o zhoubné onemocnění lymfatické tkáně vycházející obvykle z lymfocytů, může vycházet obvykle z T nebo častěji B buněk a maligní buňkou může být lymfocyt v různém stádiu vývoje[52].
- **Extramamární Pagetovy nemoci**:[1] rakovinné onemocnění kůže prsu a prsní bradavky, vzhledem připomíná ekzém, který se pomalu rozšiřuje[52].
- **Kaposiho sarkomu**:[1] dříve vzácné kožní onemocnění nádorového charakteru s poměrně benigním průběhem, dnes se vyskytuje v mnohem zhoubnější podobě u nemocných s AIDS. Projevuje se červenofialovými kožními uzly, které se šíří na kůži celého těla, postiženy bývají i vnitřní orgány[52].
- **Gorlinova syndromu**:[1] dědičné či novou mutací vzniklé onemocnění charakterizované mnohočetným výskytem bazaliomů na kůži a změnami na dalších orgánech[52].
- **Bazaliomu uzlíkového a povrchového podtypu**[1]

Nejrozšířenější a celosvětově uznávané použití PDT v léčbě rakoviny je v klinické dermatologii pro léčbu **nemelanomových kožních nádorů (NMSCs)**[1], **aktinické keratózy**, **akné vulgaris**, **fotorejuvenaci** a **hnisavé hydradenitidy**[51] (hnisavý zánět potních žláz[52]).

V Evropské unii je pro PDT registrovaný jako PS methylester kyseliny 5-aminolevulové. Jeho indikace je pro léčbu nehyperkeratotické aktinické keratózy (AKs) obličeje a pokožky hlavy, bazocelulárního karcinomu a Bowenovy choroby. Ve Spojených státech je schválený pouze jeden PS a to 20 % kyselina-5-aminolevulová, jež je schválená organizací Food and Drug Administration pro léčbu AKs[43].

NEMELANOMOVÉ KOŽNÍ NÁDORY (NMSCs)

NMSCs jsou nejčastější kožní nádory vycházející z keratinocytů[44]. Vyskytují se u bílé populace v Evropě, USA, Austrálii a Kanadě a jejich výskyt se celosvětově stabilně zvyšuje v měřítku o 3-8 % ročně od roku 1960[53]. Ze zhoubných nádorů k nim patří:

- **Bazocelulární karcinom (bazaliom) (BCC):** nádor vycházející ze základní-bazální vrstvy pokožky. Jde o nejčastější kožní nádor postihující především starší osoby. Bývá zejména na obličeji, hlavě a horních partiích trupu, ale může být prakticky kdekoliv. Mívá různý vzhled, projevuje se např. jako nehojící a šířící se vřed, někdy s mokváním a hnisáním, jindy jako nehojící se uzlík[52].

- **Spinocelulární karcinom (SCC)**: je dlaždicový karcinom, zhoubný nádor vycházející z epitelové tkáně. Bývá v různých oblastech těla, především v kůži (zde se označuje jako spinaliom), v plicích, jícnu či na děložním čípku. Nazývá se též epidermoidní karcinom, jež vychází v pokožce z buněk spinální vrstvy, která je nad bazální vrstvou[52].

Nejrozšířenější podtypy jsou uzlinatý a povrchový BCC s patogenezí, jež je podmíněná faktory jako je: vystavení UV světlu, mutace regulačních genů a změny v imunitním systému[54].

Ačkoliv pro BCC zůstává zlatým standardem chirurgická léčba, je PDT také považována za efektivní a spolehlivou terapii pro rozsáhlé, mnohonásobné nebo extenzivní léze a pro léze u imunosupremovaných pacientů[46].

Pro léčbu NMSCs metodou PDT mohou být použity dva různé topické PS: kyselina 5-aminolevulová (ALA) a její methylester Metvix® (MAL). PS je lokálně aplikován tak, aby se dostatečně kumuloval v cytoplasmě zmutovaných keratinocytů a poté se na léze aplikuje světlo[55]. Pro pacienty pouze s několika málo lokalizovanými lézemi není vhodné použití

systémového PS z důvodu prodloužené doby indukované fotosenzitivity. ALA může být aplikována lokálně několik hodin před ozářením nádoru[56]. Následkem selhání penetrace ALA nádorem může být vznik recidiv. Použití slabého roztoku dimethylsulfoxidu či desferoxaminu aplikovaného před ALA zvyšuje penetraci a účinnost léčiva[57, 58]. Nevýhodou použití ALA je, že prvních několik málo minut ozařování může být velmi bolestivé. Pro zmírnění tohoto problému může být použita místní anestézie či studený vzduch. Pro léčbu velkých ploch s četnými malými lézemi je více vhodné použití systémových PS (porfimer sodný či mTHPC)[59].

PSORIÁZA (PSORIASIS VULGARIS)

Psoriáza-lupénka je chronické kožní onemocnění s poruchou keratinizace povrchových vrstev kůže. Příčina jejího vzniku není známa, značný význam má dědičnost a imunitní procesy v kůži. Projevuje se svědivým výsevem drobných červených pupínků, které později splývají ve větší ložiska pokrytá stříbřitými šupinkami. Tyto projevy mívají často různou velikost či tvar. Psoriázu nelze úplně vyléčit, ale řada postupů ji může načas zklidnit. Jednou z léčebných metod je využití kombinace psoralenů (látky zvyšující citlivost kůže k UV záření) a působení UVA záření[52].

Léčbu lupénky metodou PDT popisuje velké množství literatury, jež se částečně týká výsledků a částečně toho, zdali je PDT použitelnou či efektivní alternativní metodou pro léčbu. Bissonette R.[60] podal psoriatickým pacientům ALA perorální cestou a zjistil, že fluorescence protoporfyrinu IX (PpIX) je stejná u poškozené i normální kůže stejně tak, jako u zánětlivých buněk. Boehncke W. H. zjistil[61], že PDT terapie s použitím červeného světla a psoralenu s UVA zářením způsobují u psoriatických pacientů pokles v cytokinových sekretech (interleukin [IL]-6, [IL]-1b, TNF-α) jednojaderných buněk. Nakonec autoři[62] zjistili, že systémová PDT vyvolává apoptózu u postižených T lymfocytů psoriatického povlaku.

Rozdíl mezi topickým a systémovým podáním PS je evidentní. Kromě toho je téměř nemožné podávat ALA perorálně v každodenní praxi z důvodu obav týkajících se clearence ALA, fotoexpozice, perzistentní fluorescence a následné dlouhotrvající fotosenzitizace. Tudíž byly zahájeny klinické testy, jež ukázaly velké zlepšení u psoriatických povlaků[63, 64], nicméně

bolest a diskomfort během léčby vedly často k přerušení léčby, proto závěrem těchto testů bylo, že PDT není praktickou metodou pro léčbu psoriázy. Závěrem lze říci, že PDT není prvořadá terapie pro léčbu psoriázy, ale že existují dobré důkazy o výhodnější absorpci PS u psoriatických povlaků a že během PDT probíhají specifické antipsoriatické změny[43].

SKLERODERMA A LIŠEJNÍKOVÁ SKLERÓZA

Jde o systémové onemocnění postihující častěji ženy. Projevuje se tuhnutím kůže (např. v obličeji kolem rtů, na prstech rukou, aj.). Podstatou jsou změny vaziva, které narušují stavbu kůže. Onemocnění se řadí k revmatickým chorobám s autoimunitním původem[52].

Lokalizovaná skleroderma odolná UVA záření dobře reaguje na léčbu PDT. Zdá se, že kultivované keratinocyty vystavené vlivu PDT produkují zvýšené hladiny [IL]-1, TNF-α, matrixové metaloproteinasy 1 a 3[65]. Tento vliv by mohl být zodpovědný za zjištěný antisklerotický efekt PDT. Někteří autoři vypozorovali v neoficiálních testech, že tyto mechanismy mohou být také zodpovědné za zlepšení lézí lišejníkové sklerózy[66, 67]. Další studie objevily, že PDT způsobuje redukci kolagenové hustoty bez poškození keratinocytů, což může být prospěšné jako pomocná léčba keloidů[68] (zbytnělá tuhá jizva nepravidelného tvaru, jež vzniká u některých disponovaných jedinců po poranění, popálení či operacích[52]).

Obr. 3: Keloidní jizva

VIROVÉ INFEKCE

Pomocí PDT mohou být léčeny s dobrými výsledky bradavice nebo kondylomata[69] (kožní výrůstek podobný bradavici[52]), molluscum contagiosum[70] (kožní virové onemocnění, jež se může objevovat na různých částech těla jako drobné vyvýšeniny s vkleslým středem, obsahující bílou vytlačitelnou hmotu[52]) a herpes simplex[71] (onemocnění způsobené herpetickými viry, jež se projevuje jako místní zánět kůže, sliznice či rohovky se svědivými či palčivými puchýřky, které postupně praskají a zasychají[52]). PDT může být také úspěšně použita k inaktivaci patogenů z krevních produktů před jejich podáním pacientovi[72].

Léčba bradavic bývá často zrazující jak pro pacienta tak pro lékaře. Terapeutické možnosti těchto klinických obtíží se obvykle zaměřují na fyzikální destrukci léze (tj. buňky infikované viry) a zahrnují: kryoterapii, kyretáž, resekci, laserovou ablaci CO_2, pulzní laserovou terapii, elektrochirurgii a topickou aplikaci kyselin. Nicméně některé bradavice zůstávají těmto terapiím odolné.

Výskyt kožních virových infekcí se uvádí až z 5 % u dětí a z 5-18 % u jedinců s oslabenou imunitou a HIV. Léčebné možnosti pro kožní infekce jsou podobné metodám popsaných u bradavic. U HIV pozitivních jedinců byly popsány jako užitečné metody antiretrovirová terapie a injekce streptokové protilátky OK-432. Navzdory těmto možnostem se často vyskytují nepoddajné léze[73]. V léčbě nepoddajných bradavičnatých lézí a kožních lézí se deset let uplatňuje s dobrými výsledky PDT s použitím emulze olej ve vodě obsahující PS, jež je ještě obohacena aditivy jako je 2 % kyselina ethylendiamintetraoctová a 2 % dimethylsulfoxid[43].

STÁRNUTÍ A FOTOREJUVENACE

Stárnutí je komplex multifaktoriálních procesů, jež nastává u všech jedinců v různém měřítku ovlivněném genetickými a hormonálními faktory a faktory prostředí, které vedou k funkčním a estetickým změnám na kůži[74], jež může být stejně tak před sluncem chráněna či sluncem exponována. Fotostárnutí je způsobeno chronickým slunečním poškozením skutečně zastárlé kůže, jež se projevuje klinicky jako obyčejná vrásčitost, nerovnost, vysušení, ochablost, pigmentové skvrny a v některých případech preneoplastické či neoplastické změny[75]. Jako konečné stádium procesu stárnutí kůže může být považována aktinická keratóza, která je již po léta úspěšně léčena pomocí PDT, a proto byla také doporučena pro použití u omlazování kůže (fotorejuvenace). Toto takzvané ,,fotodynamické omlazení,, bylo v literatuře poprvé uvedeno v roce 2002, kdy Ruiz-Rodriguez léčil 17 pacientů s aktinickou keratózou[76].

V roce 2008 léčil Buggiani G. 25 pacientů ženského pohlaví (věkové rozmezí 37-69 let), s různými znaky fotostárnutí jako jsou vrásky, kožní a svalová ochablost, sluneční skvrny, povrchové změny a aktinická keratóza podle následujícího protokolu:

1) předléčba peelingovou maskou obsahující 70 % kyselinu glykolovou

2) oplach po třech minutách

3) aplikace 5 % kyseliny 5-aminolevulové

4) zakrytí použitím polyethylenového filmu

5) celkové působení tři hodiny

6) ozařování po dobu osmi minut lampou, jež vydává záření vlnových délek 636 nm

Pacientky byly léčeny na druhém sezení, které se konalo čtyři týdny od prvního sezení a třetí sezení se konalo po čtyřech týdnech od druhého sezení. Celkové trvání léčby bylo tedy dvanáct týdnů. Zhodnocení výsledků bylo získáno klinicky s použitím optické tomografie, což je neinvazivní diagnostická metoda, která poskytuje histomorfologické zhodnocení kůže a umožňuje vyvarovat se biopsii.

Po dvou léčbách aktinické keratózy byla zjištěna úplná odezva na léčbu u 85 % a částečná odezva pouze u 15 % případů. Během poslední kontroly po třech sezeních (tj. tři měsíce po začátku léčby) byla zjištěna kompletní odezva u 63 %, částečná odezva u 17 % pacientů a žádná odezva u 20 % pacientů. Při poslední kontrole byl podstatně zlepšen povrch kůže s nápadným zlepšením v 70 %, částečným zlepšením v 13 % a se žádným efektem v 17 % případů. Závěrem lze říci, že topická aplikace kyseliny 5-aminolevulové následovaná dobře tolerovaným světelným zdrojem může být pokládána za novou neinvazivní metodu pro léčbu stárnoucí kůže s minimálními vedlejšími účinky[51].

4. METODICKÁ ČÁST

4.1. Příprava α-diketonů z oxalylchloridu

α-diketony jsou sloučeniny s velmi užitečnými funkčními skupinami s možností rozsáhlých chemických přeměn. První experiment týkající se přípravy těchto sloučenin byl uskutečněný s Grignardovým činidlem v přítomnosti Ni, Pd nebo Fe komplexů jako katalyzátorů a organicky vázané mědi, ale neposkytl očekávanou substituci v jakémkoli významném rozsahu[77]. Lepší přeměna byla získána s organicky vázaným Cu činidlem tvořeným Grignardovým činidlem a CuI, ale α-diketony byly izolovány v nízkém výtěžku[77]. Pro optimalizaci těchto výsledků byly pro přípravu činidel organicky vázané mědi zkoušeny různé soli mědi (např. CuBr, CuBr-Me_2S, CuCN). Nakonec bylo zjištěno, že jednoduchou a přímou metodou syntézy symetrických α-dionů s velmi dobrými výsledky je metoda „cross-coupling“ z oxalylchloridu reakcí s činidly organicky vázané mědi, jež jsou odvozené od Grignardových činidel, CuBr a LiBr. Grignardovo činidlo je transformováno do látky organicky vázané mědi, jež za přítomnosti LiBr umožňuje předpokládanou „cross-coupling“ reakci v přijatelném stupni[77].

Rozhodující je použití LiBr, jeho nepřítomnost vede k velmi nízkým přeměnám dávajících směs α-diketonů, ketonů a velkého množství produktů „homocouplingu“. Bylo zjištěno, že nejvhodnější podmínky pro vznik α-dionů ve vysokém výtěžku je použití sloučenin organické mědi připravených z ekvivalentního množství Grignardova činidla, CuBr a 2 ekvivalentů LiBr (viz. Schéma 1).

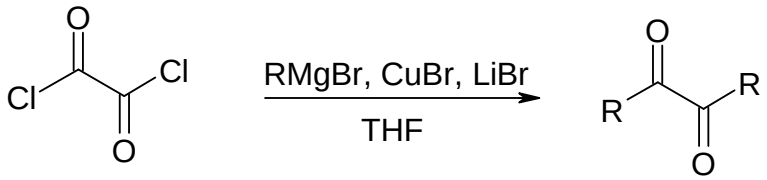


Schéma 1: Příprava α-diketonu z oxalylchloridu[77]

Reakce je velmi jednoduchá a široce použitelná. Účinně může být použito alifatické, aromatické, alicyklické a heterocyklické činidlo organicky vázané mědi. „Cross-coupling“ reakce vede v zásadě k čistým symetrickým α-dionům, jež jsou znečištěny pouze malým množstvím produktů „homocouplingu“[77].

4.2. Využití α-diketonů pro přípravu PS oktaalkynyltetra[6,7]chinoxalinoporfyrazinu

Protože oktaalkynyltetra[6,7]chinoxalinoporfyraziny vykazují intenzivní absorpci v blízkém IR spektru, mají fotooxidační vlastnosti a dají se připravit krátkou a dobře přizpůsobivou syntézou, lze tyto sloučeniny zařadit mezi potenciálně využitelné PS v PDT[78].

Tetra[6,7]chinoxalinoporfyrazin substituovaný acetylenem lze získat ve dvou krocích z dialkynyl-1,2-dionu a 4,5-diaminobenzen-1,2-dikarbonitrilu, jež byl připraven z 4,5-dibrombenzen-1,2-diaminu v prostředí DMF a za přítomnosti katalyzátoru CuCN. Klíčovým krokem v přípravě nových nenasycených chromoforů je kondenzace s dialkynyl-1,2-dionem v přítomnosti kyseliny octové, jež je následovaná cyklotetramerizací vzniklého substituovaného chinoxalin-6,7-dikarbonitrilu na systém porfyrazinu. Vzniklé chromofory jsou sytě modré (**1**, **4**) nebo zelené (**2**, **3**), dobře rozpustné v běžných organických rozpouštědlech (CH_2Cl_2, THF)[78]. Syntéza tetra[6,7]chinoxalinoporfyrazinu viz. Schéma 2.

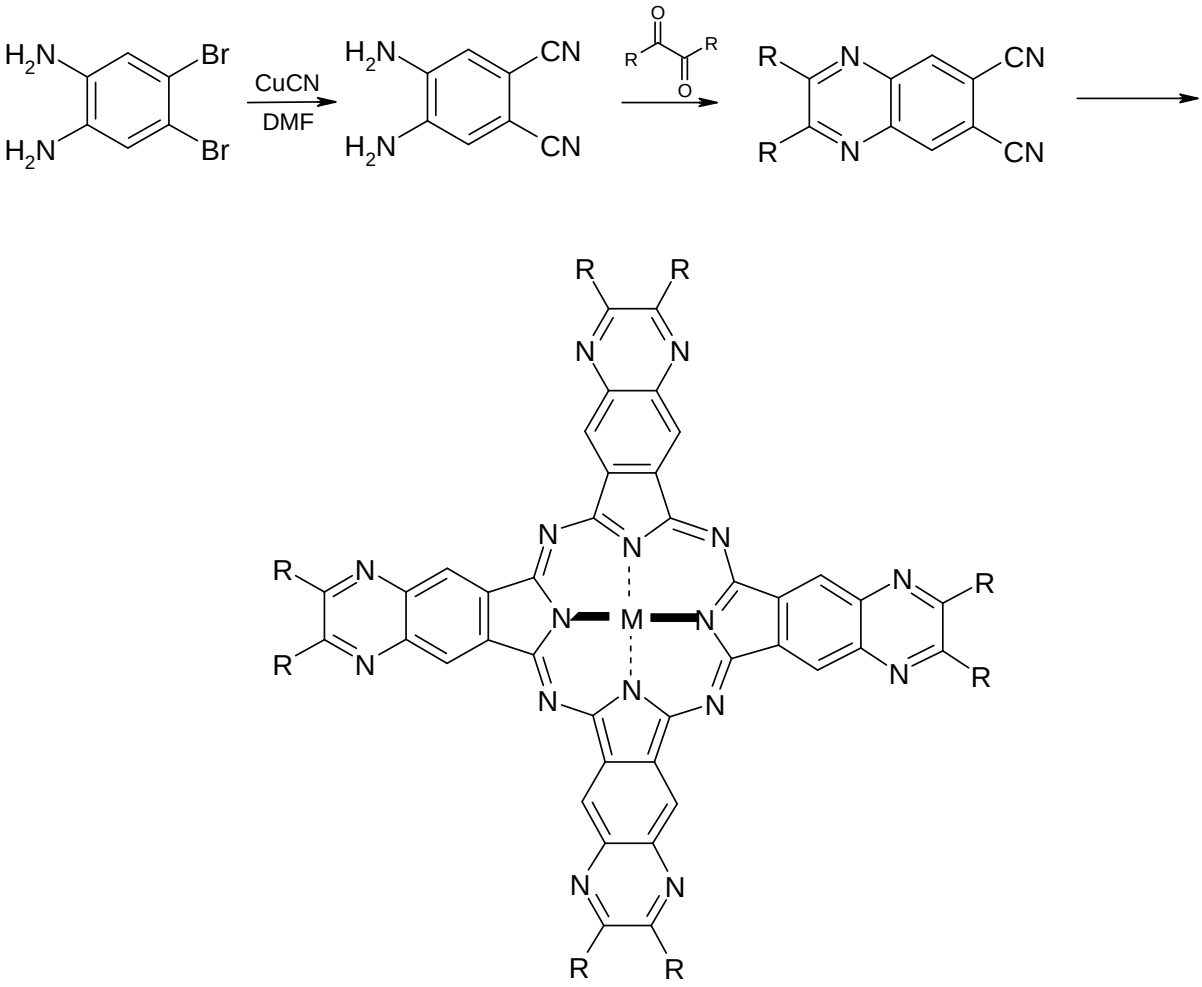
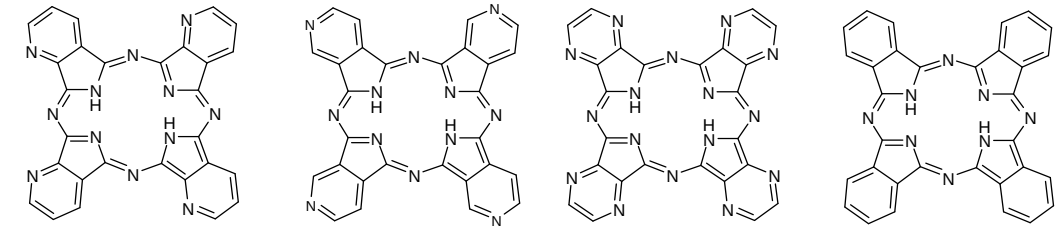


Schéma 2: Syntéza tetra[6,7]chinoxalinoporfyrazinu[78]

4.3. Využití diketonů pro příprava tetrapyrazinoporfyrazinů (tetraPyPor)

4.3.1. Odvození struktrury tetraPyPor

Strukturu azaftalocyaninu (AzaPc) (Obr. 4(a-c)) lze odvodit substitucí CH skupin atomem dusíku uvnitř čtyř benzenových jednotek struktury ftalocyninu (Pc) (Obr. 4(d)). Substitucí pouze jedním dusíkovým atomem na všech čtyřech benzenových jádrech vznikají tetrapyridoporfyraziny, jež jsou zobrazeny na Obr. 4(a) a 4(b). Zavedením dvou dusíků do pozic 1,4 na benzenovém kruhu Pc vede k tetrapyrazinoporfyrazinu viz. Obr. 4(c).



a) izomer tetra(2,3-pyrido)porfyrazin b) izomer tetra(3,4-pyrido)porfyrazin c) tetrapyrazinoporfyrazin d) ftalocynanin

Obr. 4: Struktury azaftalocyaninů a), b), c) a ftalocyaninu d)[79]

TetraPyPor mohou být substituovány na periferních pozicích v polohách 2,3 pyrazinových jader. Tím mohou vznikat tetraPyPor (a jejich kovové komplexy), jež jsou rozpustnější v organických rozpouštědlech. Jako substituenty mohou být použity např. alkylové, alkoxykarbonylové a alkylthio skupiny.

4.3.2. Syntéza Si tetraPyPor

Kleinwächter J. připravil dva typy oktaalkylsubstituovaných tetraPyPor s centrálním atomem Si (viz Schéma 4). Syntéza je odvozena od syntézy příslušných SiPc. Výchozí sloučeninou je 1,3-dihydro-1,3-diiminoisoindol (2,3-dialkyl-6-amino-8-imino-pyrrolo [3,4-b]pyrazin). Syntéza pro přípravu isoindolu **5** a **6** viz Schéma 3. Reakcí příslušných 1,2-diketonů **11** a **12** s diaminomaleonitrilem (DAMN) v kyselině octové byly připraveny výchozí 5,6-dialkylpyraziny **13** a **14**, jejichž reakcí s amoniakem v methanolu vznikly diiminoisoindoly **5** a **6**. Pokusy s přeměnou pyrazinů **5**, **6**, **13** a **14** na příslušné oktaalkyl Si-tetraPyPor sloučeniny **7** a **8** zahříváním s $SiCl_4$ vede k neidentifikovatelným vedlejším produktům. Nicméně, při zahřívání **5** a **6** s $SiCl_4$ v pyridinu a při hydrolýze meziproduktů **7** a **8** s vodou, se získají deriváty **9** a **10** každý v asi 5-22% výtěžku.

Je zajímavé si povšimnout, že snadno hydrolyzovatelné meziprodukty Si tetraPyPor **7** a **8** (neizolované) jsou tvořeny za mírnějších podmínek (120-130 °C) než SiPc, které požadují vyšší teploty (~220-240 °C). Výtěžek Si tetraPyPor závisí na použitém rozpouštědle, jak bylo pozorováno u SiPc. Užití $SiBr_4$ a SiI_4 poskytuje pouze malé výtěžky produktů[79].

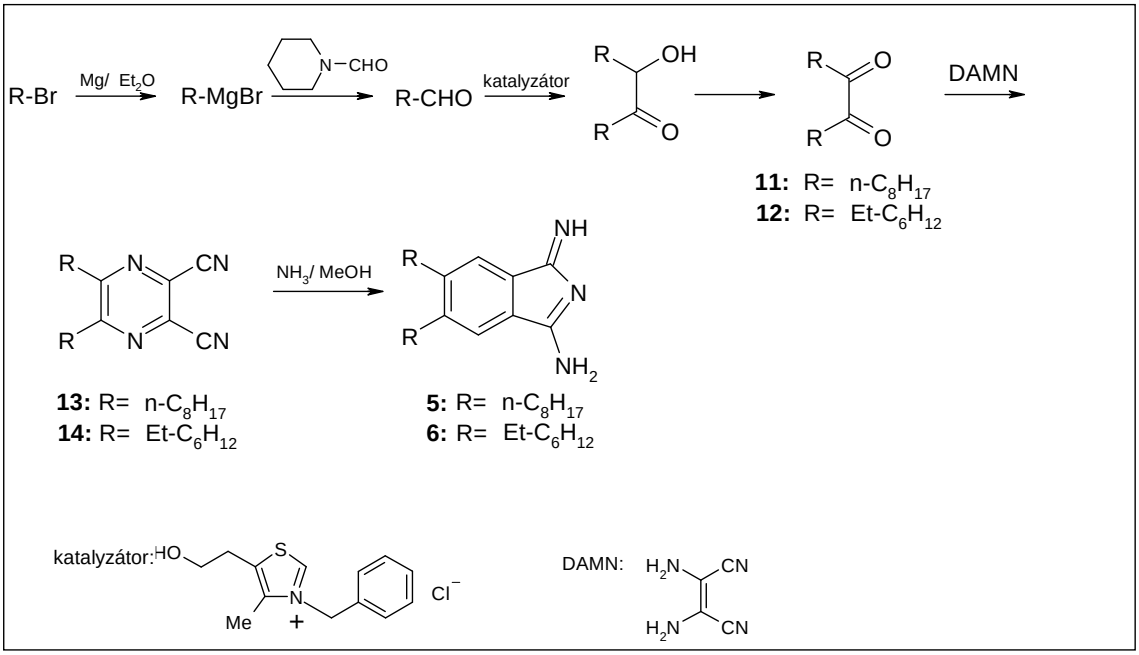


Schéma 3: Příprava výchozích diiminoisoindolů[79]

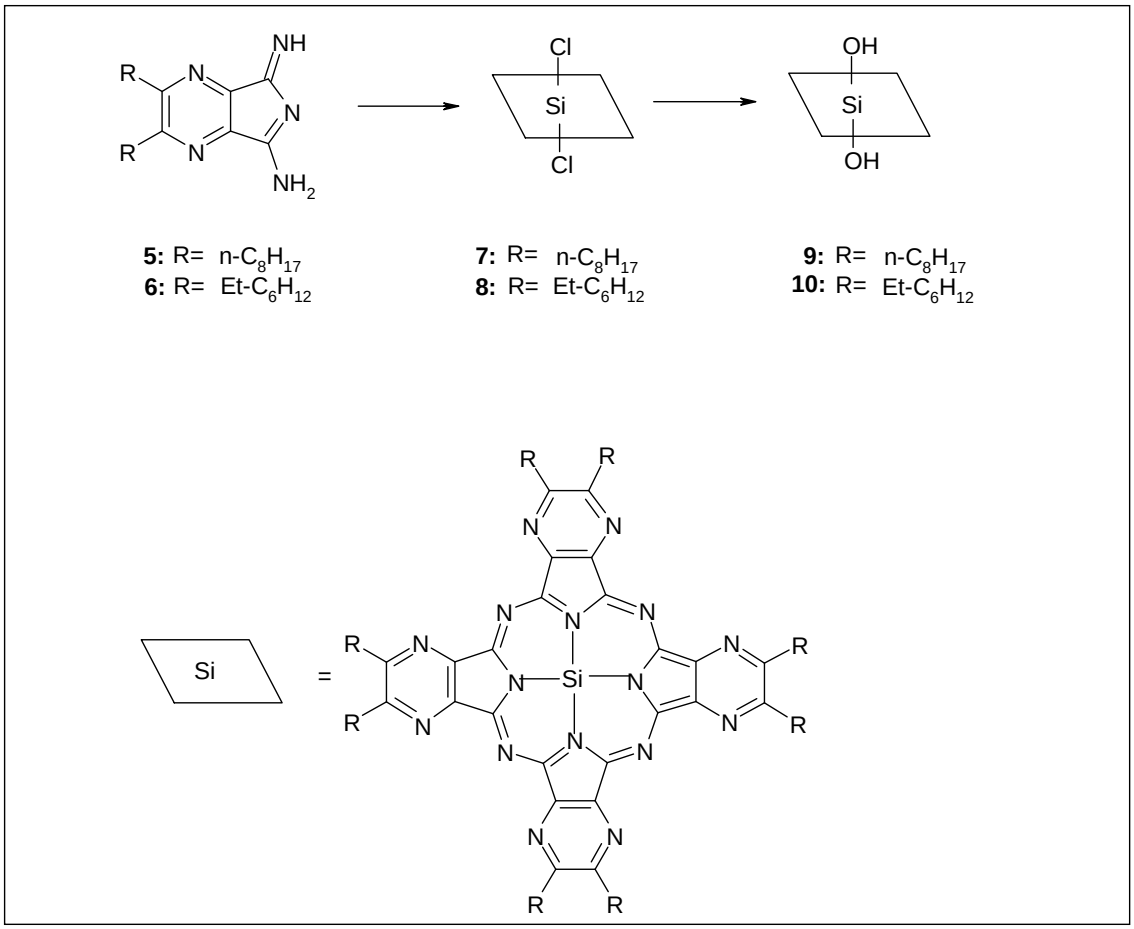


Schéma 4: Syntéza tetrapyrazinoporfyrazinu s centrálním atomem Si[79]

4.3.3. OktaalkynyltetraPyPor

Oktaalkynyltetrapyrazinoporfyraziny lze zařadit jako PS pro použití v PDT díky jejich dobré rozpustnosti a lepším optickým vlastnostem a také pro jejich snadnou tříkrokovou syntézu z oxalylchloridu[80].

Periferní alkynylová substituce se stává stále více oblíbenou strukturní modifikací chromoforů (mezi něž patří porfyriny a Pc) hlavně ze dvou důvodů. První je, že nenasycené jednotky rozšířené o π systémy chromoforů vyvolávají bathochromní posun v absorpci elektronů a emisních spekter. Za druhé, koncové alkynylové skupiny mohou sloužit jako kovalentní spojovací články pro tvorbu delokalizovaných multichromoforových řetězců nebo dvourozměrných sítí polymerů. Alkynylová substituce daného chromoforu je často komplikovaná složitou přípravou vhodných prekurzorů a nižší stupeň alkynylové substituce má často za následek tvorbu směsi izomerů. Proto byla pro rychlý vznik alkynylovaných chromoforů prozkoumána možnost použití nenasycených stavebních prvků[80].

Klíčový meziprodukt pro přípravu periferních alkynylovaných tetraPyPor z oxalylchloridu je triisopropylsylil-hexa-1,5-diyn-3,4-dion, jež byl připraven alkynylací z oxalylchloridu za přítomnosti LiBr, CuBr při teplotě 0 °C (viz. Schéma 5). Reakce tohoto meziproduktu s diaminomaleonitrilem v prostředí kyseliny octové poskytne 2,3-dialkynylpyrazin-2,3-dikarbonitril v 81% výtěžku. Cyklotetramerizací použitím buď $Mg(OBu)_2$ v butanolu nebo zahříváním s roztokem chinolinu, $Zn(OAc)_2$ nebo $NiCl_2$ a močoviny při teplotě 140 °C po dobu 5 minut poskytne příslušný kovový tetraPyPor **15** a **16** ve výtěžku 30 %. Použitím vhodných kovových solí lze snadno získat v prostředí močovina/chinolin jiný kovový tetraPyPor. Bezkovový tetraPyPor reakcí pentanolátu lithného v pentanolu se nepodařilo vyrobit pravděpodobně následkem odštěpení alkynylu a následným rozložením materiálu. Nicméně, Mg derivát **16** může být lehce odkoven použitím nadbytku kyseliny *p*-toluensulfonové v THF při pokojové teplotě po dobu 5 minut za vzniku tetraPyPor **18** ve výtěžku 70 %[80].

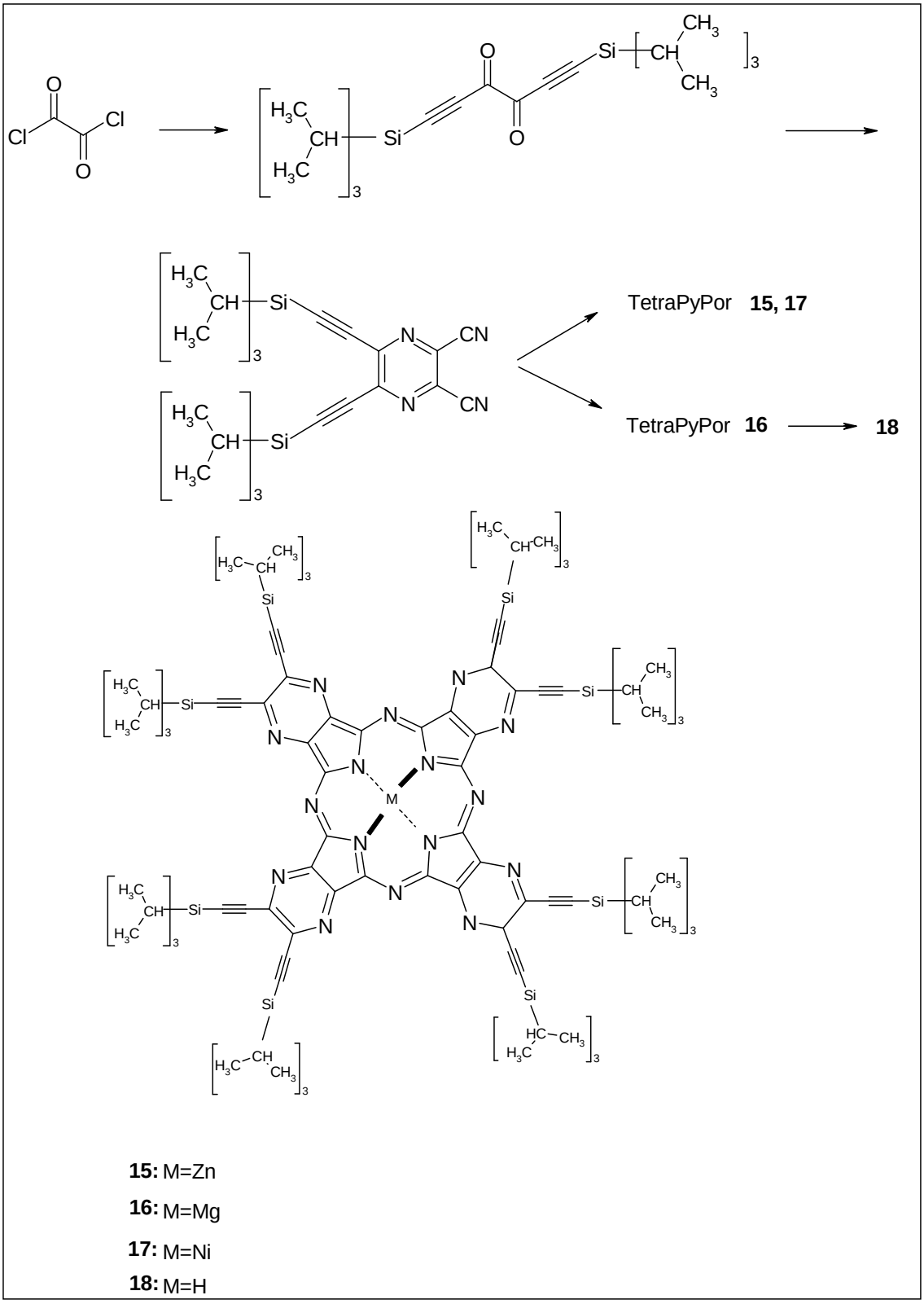


Schéma 5: Příprava oktaalkynyltetrapyrazinoporfyrazinu[80]

4.3.4. OktakarboxytetraPyPor

Syntéza nové třídy ve vodě rozpustných PS, jež mají na makrocyklu vázané karboxylové substituenty, je založena na kondenzaci 5,6-diethoxykarbonylpyrazin-2,3-dikarbonitrilu se solí kovu a poskytuje tetra[2,3-(5,6-diethoxykarbonylpyrazino)]porfyrazin, jehož mírnou hydrolýzou vznikají ve vodě rozpustné komplexy tetra-[2,3-(5,6-dikarboxypyrazino)]porfyrazinů (viz. Schéma 6). Tyto oktaazaanalogy Pc mají možnost použití v oblasti PDT rakoviny.

5,6-diethoxykarbonylpyrazin-2,3-dikarbonitril byl připraven kondenzací diaminomaleodinitrilu s diethyldioxosukcinátem v přítomnosti kyseliny octové. Diethyl-dioxosukcinát byl připraven z dihydroxyvínanu disodného.[83]

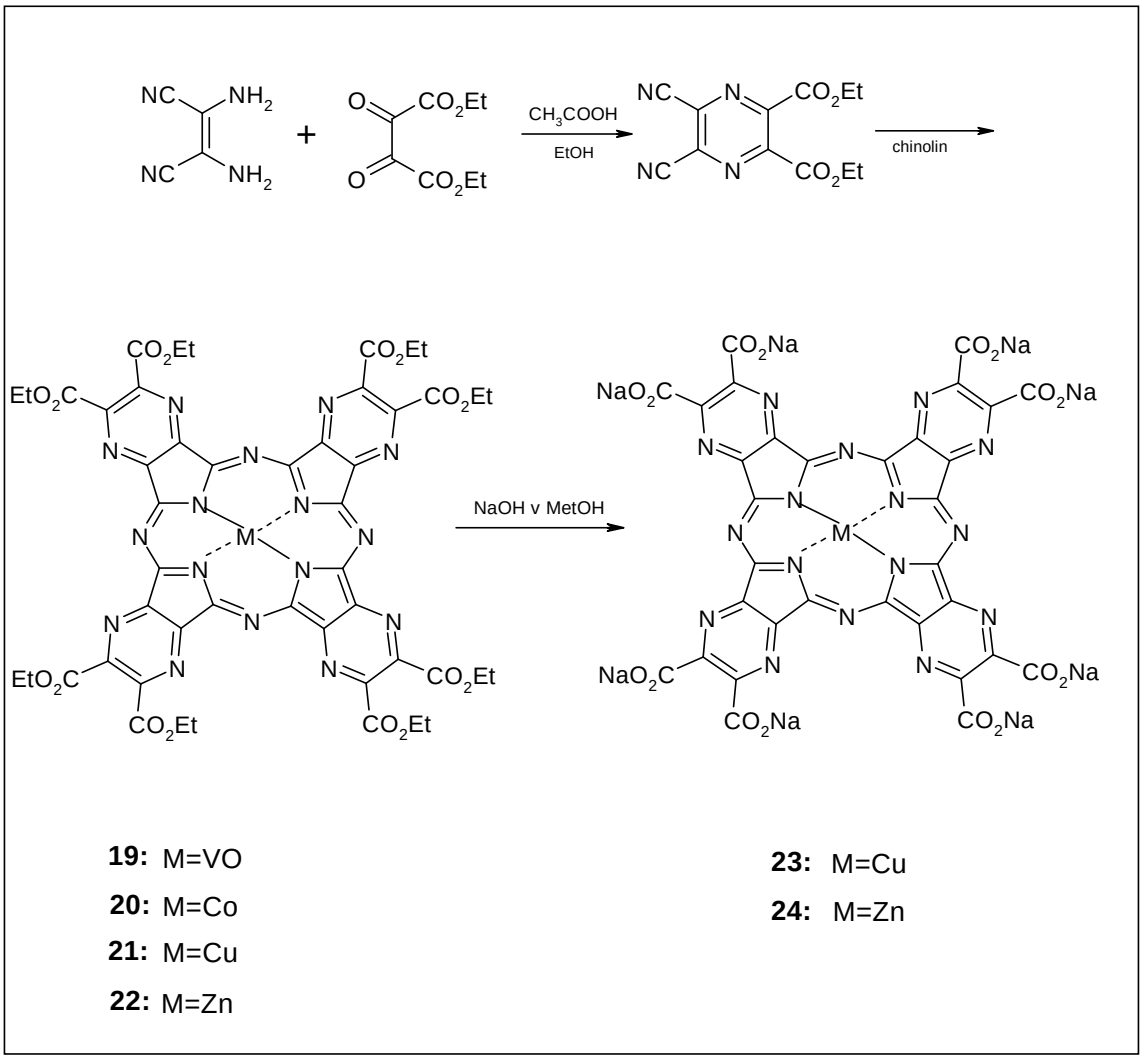


Schéma 6: Příprava oktakarboxytetrapyrazinoporfyrazinu[83]

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 meziproduktů byly kontrolovány tenkovrstvou chromatografií na deskách Merck Silikagel 60 F254. Detekce byla prováděna světlem vlnové délky 254 nm a 366 nm. Vyvíjecí soustavy jsou uvedeny u jednotlivých reakcí. Sloupcová chromatografie byla prováděna na silikagelu Merck Kieselgel 60 (0,040-0,063 mm). Infračervená spektra (IČ) byla měřena IČ spektrofotometrem NICOLET IMPACT 400 na KAOCH FaF UK v Hradci Králové. Vlnočty jsou uvedeny v cm^{-1}. NMR spektra byla měřena na přístroji VARIAN MERCURY VxBB 300 na KAOCH FaF UK v Hradci Králové. Měření bylo prováděno při frekvenci 299,95 MHz (^{1}H NMR) a 75,43 MHz (^{13}C NMR). Posuny jsou vztaženy k vnitřnímu standardu $Si(CH_3)_4$. Spektrum ve viditelné oblasti bylo změřeno na přístroji SHIMADZU UV 2401 PC: UV-VIS recording spectrophotometer. Elementární analýza byla provedena na přístroji Automatic Microanalyser EA1110CE (Fisons Instruments S.p.A., Milano, Italy) na KFCHKL.
Výchozí látky a rozpouštědla pro syntézy a čištění byly zakoupeny u firem Sigma-Aldrich, TCI Europe, Acros, Lach-Ner nebo Penta.

6,7-dichlorpyrazino[2,3-b]pyrazin-2,3-dikarbonitril jako výchozí látka byl připraven již dříve na katedře (dosud nepublikováno).

2,3-dineopentylchinoxalin-6,7-dikarbonitril byl také připraven již dříve na katedře[81].

5.1. Obecné schéma

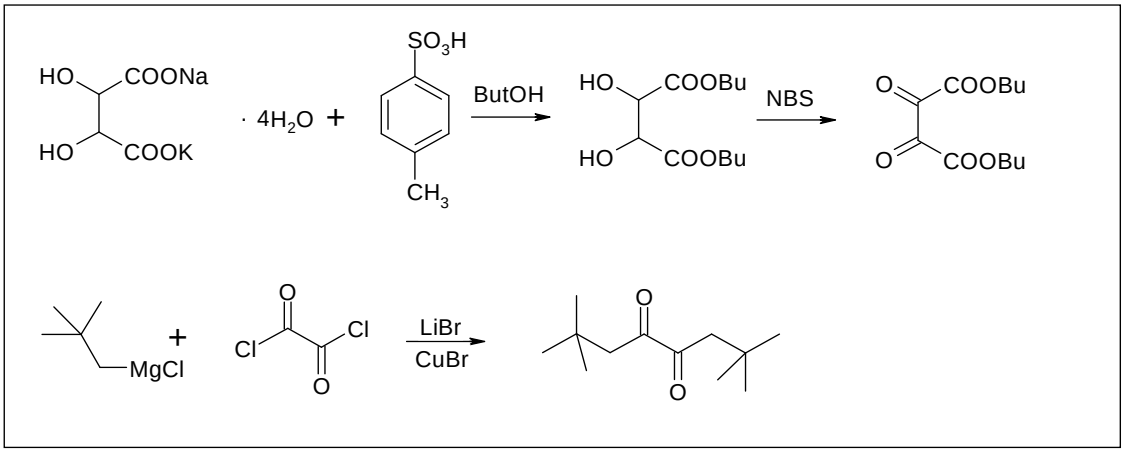


Schéma 7: Příprava diketonů

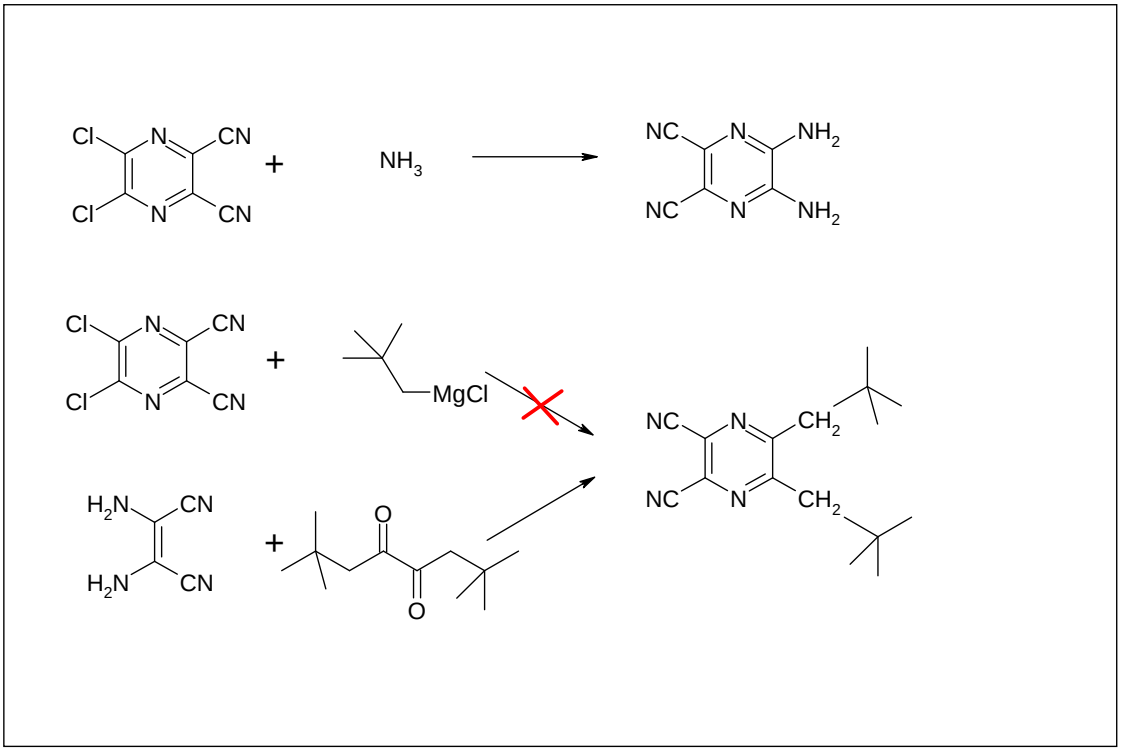


Schéma 8: Příprava pyrazinů

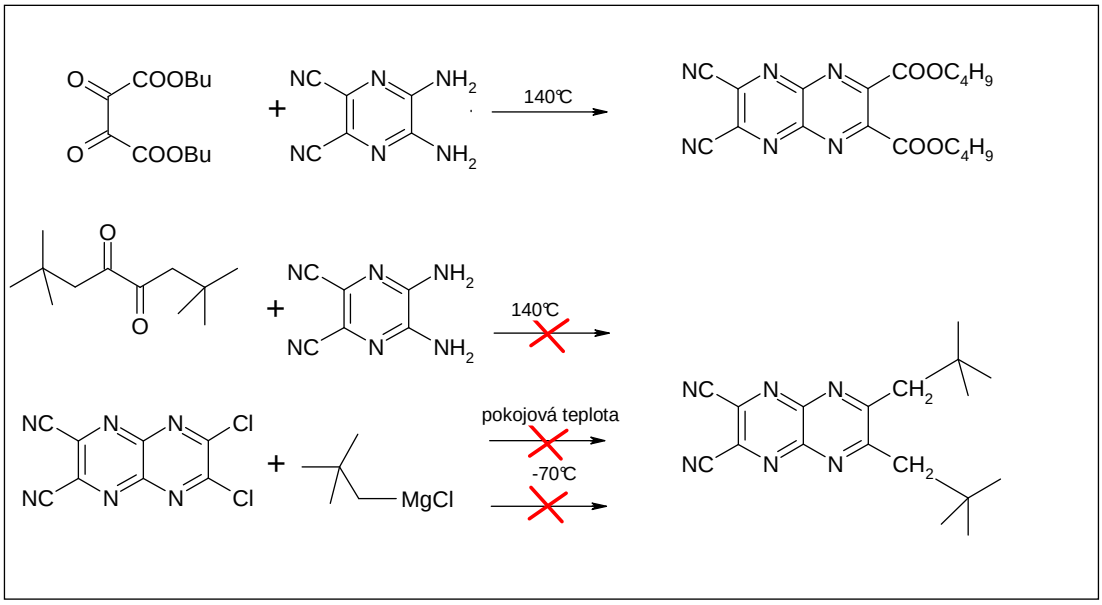


Schéma 9: Příprava pyrazinopyrazinů

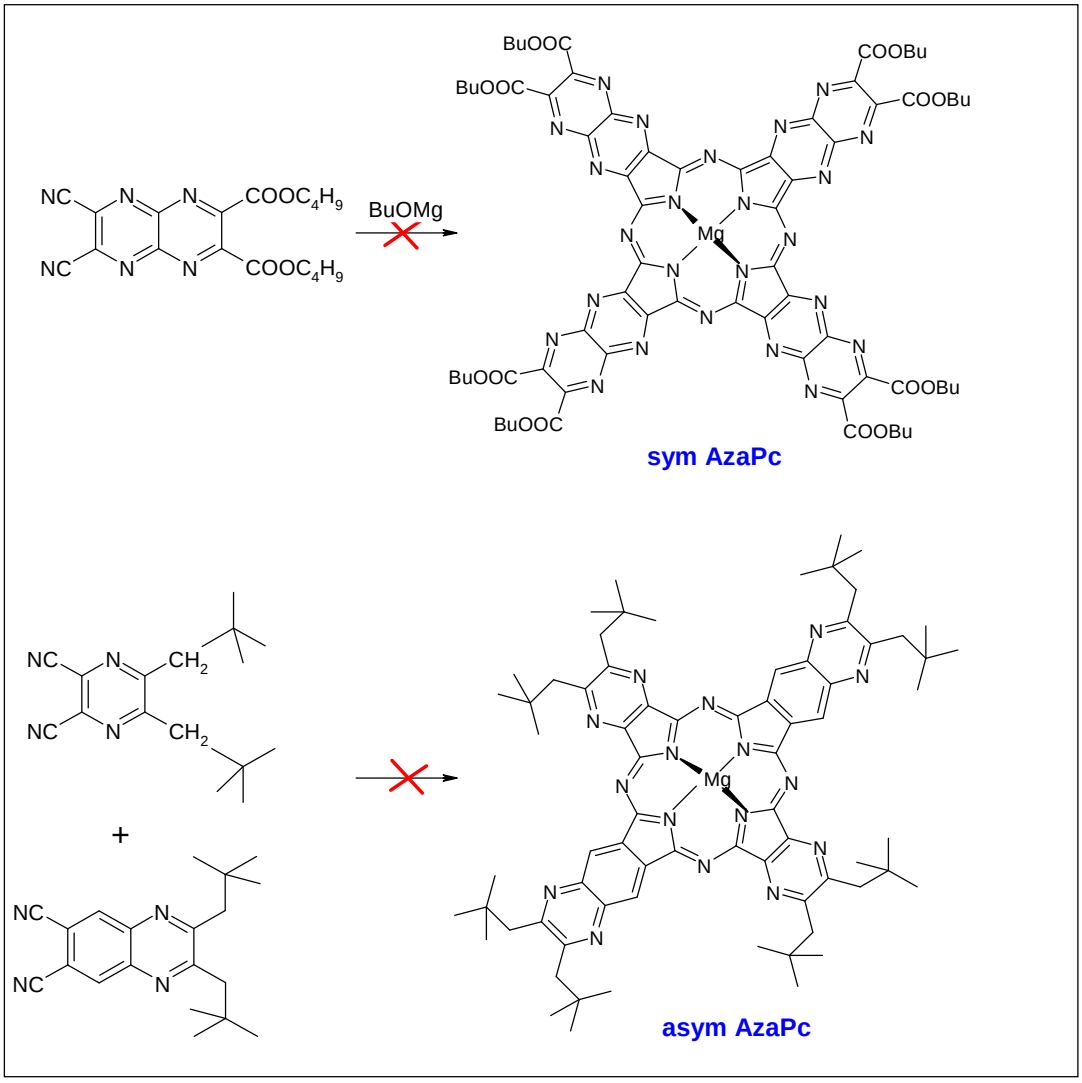
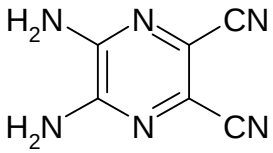


Schéma 10: Příprava azaftalocyaninů (AzaPc)

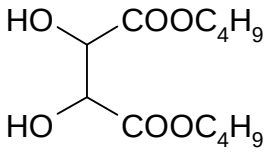
5.2. Reakce

5.2.1. Příprava 5,6-diaminopyrazin-2,3-dikarbonitrilu



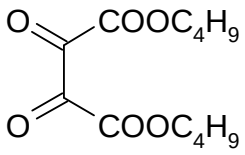
5,6-dichlorpyrazin-2,3-dikarbonitril (3,2 g, 16,1 mmol) se rozpustil ve 150 ml dimethylformamidu (DMF) a za stálého míchání se nechal probublávat amoniakem. Reakce probíhala při pokojové teplotě asi 1,5 hodiny. Odfiltroval se precipitát (NH_4Cl) a z filtrátu se odpařil DMF za sníženého tlaku. Vzniklý produkt se promyl vodou, přefiltroval přes fritu a nechal několikrát překrystalizovat z acetonitrilu. Výtěžek 5,6-diaminopyrazin-2,3-dikarbonitrilu byl 472,3 mg bílých krystalů, tj. 15 % teoretického výtěžku. Látka byla připravena dle publikovaného postupu[82] a porovnána na TLC (aceton/chloroform 2:1) se standardem připraveným dříve v laboratoři.

5.2.2. Příprava dibutylesteru kyseliny vinné



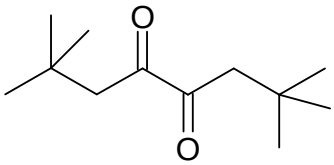
Tetrahydrát vinanu sodno-draselného (7 g, 24,8 mmol) se nechal reagovat s kyselinou *p*-toluensulfonovou (14,1 g, 74,4 mmol) pod zpětným chladičem asi 3 hodiny při teplotě 140 °C v prostředí bezvodého butanolu (60 ml). Po ukončení reakce se butanol odpařil na vakuové odparce. Odparek se vytřepal 100 ml chloroformu a 100 ml vody a spodní chloroformová vrstva se následně vytřepala dvakrát vodou, vysušila a odpařila. Výtěžek dibutylesteru kyseliny vinné byl 5,7 g, tj. 82 % teoretického výtěžku. Látky byla připravena analogicky publikovanému postupu[83] (pro diethylester) a použita hned do další reakce.

5.2.3. Příprava dibutylesteru dioxovinné kyseliny



Dibutylester kyseliny vinné (5,7 g, 0,02 mol) se smíchal s *N*-bromsukcinimidem (10,6 g, 0,06 mol) a nechal se zahřívat v bezvodém tetrachlormethanu (250 ml) pod zpětným chladičem při teplotě 108 °C. Po zčervenání reakční směsi se nechal zahřívat ještě 2,5 hodiny. Po ukončení reakce a zchladnutí se reakční produkt přefiltroval a filtrační papír se promyl éterem. Odpařila se rozpouštědla a produkt (žlutý olej) se vytřepal chloroformem a vodou. Chloroformová vrstva se vysušila Na_2SO_4 a přefiltrovala. Po odpaření rozpouštědel se produkt rozpustil v minimálním množství étheru, nechal ochladit na -20 °C, sraženina se odfiltrovala a éter z filtrátu odpařil. Výtěžek byl 2,95 g světle žlutého oleje dibutylesteru dioxovinné kyseliny, tj. 56,7 % teoretického výtěžku. Látka byla připravena dle publikovaného postupu[84] a porovnána na TLC (chloroform) se standardem připraveným na katedře již dříve.

5.2.4. Příprava 1,2-dineopentylethan-1,2-dionu



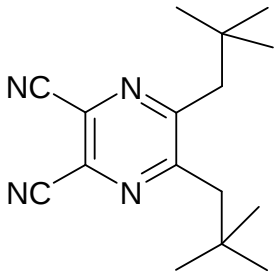
Nejprve se připravil komplex katalyzátoru LiBr-CuBr tak, že se LiBr (7,0 g, 80 mmol) rozpustil v bezvodém THF (140 ml) pod argonem a za laboratorní teploty se přidal k suspenzi CuBr (5,8 g, 40 mmol) v bezvodém THF (140 ml) pod argonem. Tato směs se míchala do té doby, dokud se teplota nesnížila na teplotu -70 °C (asi 30-40 min.). Ke katalyzátoru se poté přidal 1M roztok neopentylmagnesiumchloridu v diethylétheru (40 ml, 40 mmol) a postupně se přikapával oxalylchlorid (1,68 ml, 20 mmol) v bezvodém THF (60 ml). Reakční směs se míchala při reakční teplotě -70 °C asi 30 min. a poté se postupně nechala ohřívat až na laboratorní teplotu. Poté se přidal nasycený roztok NH_4Cl ve vodě a oddělila se organická fáze. Vodná fáze se poté vytřepala s ethyl-acetátem, organické fáze se spojily a vysušily

Na_2SO_4. Výsledný produkt se přečistil sloupcovou chromatografií s mobilní fází benzín/ethyl-acetát (30:1). Výtěžek byl 1,4 g žlutého oleje 1,2-dineopentylethan-1,2-dionu tj. 65 % teoretického výtěžku.

^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ 0.99 (s, 18 H, CH_3), 2.63 (s, 4 H, CH_2) ppm.

^{13}C NMR ($CDCl_3$) δ 29,6; 31,2; 46,8; 200,2 ppm.

5.2.5. Příprava 2,3-di-neopentylpyrazin-5,6-dikarbonitrilu



METODA A

1,2-dineopentylethan-1,2-dion (857,9 mg, 4,5 mmol,) se rozpustil v kyselině octové (15 ml) a při reakční teplotě 140 °C se k němu za stálého míchání postupně přikapával diaminomaleonitril (324 mg, 3 mmol). Reakce probíhala pod zpětným chladičem asi 10 hodin. Po ukončení reakce se odpařila rozpouštědla. Produkt se přečistil sloupcovou chromatografií s mobilní fází toluen/benzín (1:1). Výtěžek produktu byl 147,6 mg bílé krystalické látky, tj. 18,2 % teoretického výtěžku. Teplota tání byla 96-97 °C.

^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ 1,01 (s, 18 H, CH_3), 3,09 (s, 4 H, CH_2) ppm.

^{13}C NMR ($CDCl_3$) δ 159,79; 129,51; 113,31; 46,89; 34,08; 29,69 ppm.

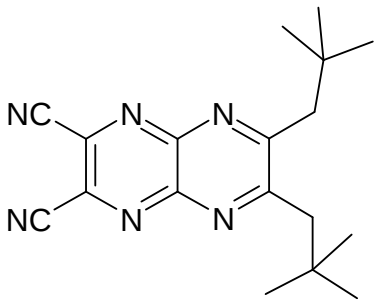
IČ (KBr) 3478, 2961, 2904, 2869, 2241, 1524, 1472, 1430, 1396, 1378, 1320, 1229, 1199, 1129, 851, 670 cm^{-1}.

Elementární analýza: vypočítáno C 71,08; H 8,20; N 20,72; nalezeno C 71,03; H 8,64; N 20,51.

METODA B

5,6-dichlorpyrazin-2,3-dikarbonitril (39,8 mg, 0,2 mmol) se rozpustil v bezvodém THF (10 ml) pod argonem a smíchal se s 1M roztokem neopentylmagnesiumchloridu v diethylétheru (0,45 ml, 0,45 mmol). Reakce probíhala při pokojové teplotě za stálého míchání pod argonem. Při monitorování na TLC (toluen, toluen/benzín 1:1) jsem zjistila, že reakce neproběhla.

5.2.6. 1.5 Příprava 6,7-dineopentylpyrazino[2,3-b]pyrazin-2,3-dikarbonitrilu



METODA A

2,3-dineopentylethandion (162 mg, 1,5 mmol) se rozpustil v kyselině octové (5 ml) a zahřál se za stálého míchání na reakční teplotu 140 °C. Postupně se k němu přikapával 5,6-diaminopyrazin-2,3-dikarbonitril (160 mg, 1 mmol) a výchozí látky se nechaly při reakční teplotě reagovat po dobu asi 9 hodin. Monitorováním reakce na TLC (toluen) jsem zjistila, že reakce neproběhla.

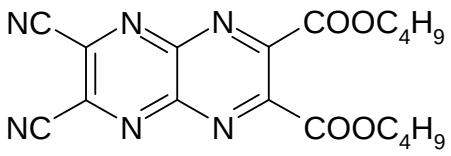
METODA B

6,7-dichlorpyrazino[2,3-b]pyrazin-2,3-dikarbonitril (50 mg, 0,2 mmol,) se smíchal s 1M roztokem neopentylmagnesiumchloridu v diethylétheru (0,45 ml, 0,45 mmol). Reakce probíhala při pokojové teplotě za stálého míchání asi 40 minut pod argonem. Monitorováním reakce na TLC (toluen) jsem zjistila, že reakce neproběhla.

METODA C

6,7-dichlorpyrazino[2,3-b]pyrazin-2,3-dikarbonitril (50 mg, 0,2 mmol) se rozpustil v bezvodém THF (10 ml) pod argonem a po ochlazení na -20 °C se smíchal 1M roztok neopentylmagnesiumchloridu v diethylétheru (0,45 ml, 0,45 mmol). Reakce probíhala při teplotě -20 °C za stálého míchání asi 30 minut pod argonem. Monitorováním reakce na TLC (toluen) jsem zjistila, že reakce neproběhla.

5.2.7. Příprava dibutylesteru 6,7-dikyanpyrazino[2,3-b]pyrazin-2,3-dikarboxylové kyseliny

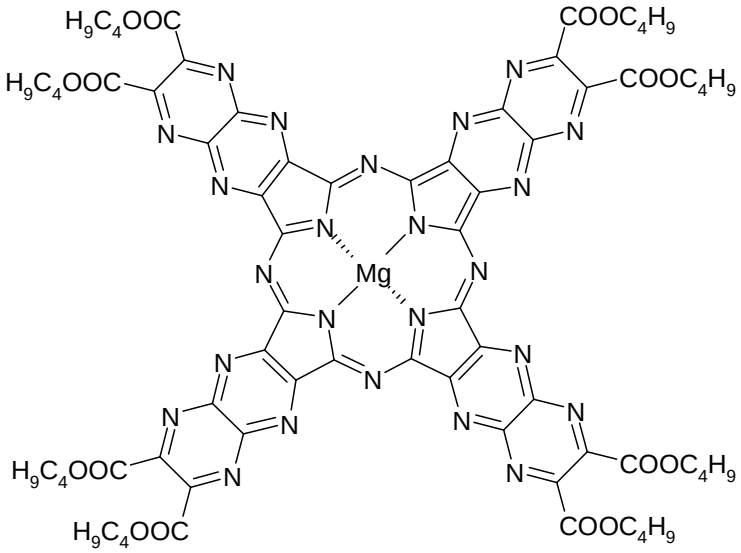


Dibutylester dioxovinné kyseliny (1162 mg, 4,5 mmol) se rozpustil v kyselině octové (10 ml) a dal zahřát na reakční teplotu 140 °C pod zpětným chladičem. 5,6-diaminopyrazin-2,3-dikarbonitril (480 mg, 3 mmol) se rozpustil v kyselině octové (10 ml) a pomalu se přikapával do reakce. Reakce probíhala asi 10 hodin při teplotě 140 °C za stálého míchání pod zpětným chladičem. Detekce produktu byla provedena na TLC s mobilní fází benzin/ethyl-acetát (4:1). Po ukončení reakce se odpařila rozpouštědla a produkt se rozpustil v chloroformu a vytřepal vodou. Organická fáze se oddělila, vysušila (Na_2SO_4), přefiltrovala a chloroform se odpařil. Produkt se přečistil sloupcovou chromatografií s mobilní fází benzin/ethyl-acetát (4:1). Výtěžek byl 378 mg dibutylesteru-6,7-dikyanpyrazino[2,3-b]-pyrazin-2,3-dikarboxylové kyseliny jako červený prášek. Teplota tání produktu byla 202,3-204,9 °C.

^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ 4,17 (t, 4H, J=7 Hz, O-CH_2), 1,62 (p, 4H, J=7 Hz, CH_2), 1,35 (sext, 4H, J=7 Hz, CH_2), 0,93 (t, 6H, J=7 Hz, CH_3).

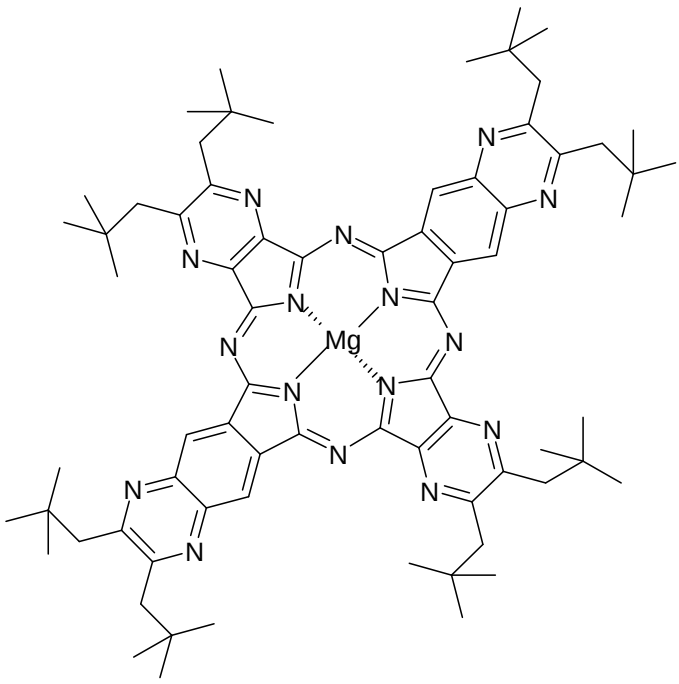
^{13}C NMR ($CDCl_3$) δ 159,5; 148,5; 125,6; 120,7; 113,4; 67,0; 30,2; 18,9; 13,6.

5.2.8. Příprava 2,3,11,12,20,21,29,30-oktakis(butoxykarbonyl)tetra(pyrazino[2.3-b]pyrazino)porfyrazináto hořečnatého komplexu



Nejprve se připravil butanolát hořečnatý reakcí hořčíku (30 mg, 1,2 mmol) a bezvodého butanolu (5 ml). Reakce probíhala při teplotě 138 °C asi 2 hodiny. Po ukončení reakce se k butanolátu hořečnatému přidal butylester-6,7-dikyanpyrazino[2,3-b]pyrazin-2,3-dikarboxylové kyseliny. V reakční směsi se na chvilku po přidání objevilo nazelenalé zbarvení, ale poté reakční směs ihned zhnědla. Na UV-vis spektrech ze vzorku z reakce nebyl indikován žádný absorpční pás v očekávané oblasti (okolo 700 nm).

5.2.9. Syntéza a izolace nesymetrických azaftalocyaninů



(příklad jedné látky ze směsi)

Nejprve se připravil butanolát hořečnatý reakcí hořčíku (266 mg, 11 mmol) a butanolu (40 ml). Reakce probíhala při teplotě 138 °C asi 2 hodiny pod zpětným chladičem. Po ukončení reakce se k němu přidal 2,3-dineopentylpyrazin-5,6-dikarbonitril (140 mg, 0,52 mmol) a 2,3-dineopentylchinoxalin-6,7-dikarbonitril (260 mg, 0,81 mmol). Po ukončení reakce se odpařila rozpouštědla. Dále se z meziproduktu odstranil centrální kov reakcí s kyselinou *p*-toluensulfonovou. Kyselina *p*-toluensulfonová (632 mg, 3,3 mmol) se rozpustila v THF (8 ml) pod ultrazvukem a přidal se k ní zmíněný roztok směsi AzaPc v chloroformu a THF (1:1). Tato reakční směs se míchala při pokojové teplotě asi 2 hodiny. Po ukončení míchání se rozpouštědla odpařila, produkt promyl vodou a přefiltroval. Filtrační papír se nechal vyschnout a suchý produkt jsem se pokoušela přečistit sloupcovou chromatografií s mobilní fází toluen/pyridin/THF (50:1:1). Bohužel, nedošlo k oddělení jednotlivých frakcí a ani po dalším testování jiných mobilních fází na TLC jsme nedospěli k lepším výsledkům.

6. VÝSLEDKY A DISKUSE

V této práci jsem se zaměřila na syntézu prekurzorů AzaPc s periferními substituenty vázanými přes uhlík. Zavedením dlouhého alkylového řetězce nebo objemného substituentu na periferii se sníží jejich agregace, která je nežádoucím dějem, jenž snižuje rozpustnost Pc a ztěžuje jejich separaci a čištění na chromatografické koloně. Kvůli rozšíření systému π konjugovaných vazeb jsem použila strukturu pyrazino[2,3-b]pyrazinu s navázanou skupinou neopentylovou či butoxykarbonylovou. Reakce vycházely z kondenzace diaminopyrazinu s diketony, které jsem musela nejprve připravit.

Příprava diketonů

1,2-dineopentylethan-1,2-dion jsem připravila reakcí Grignardova činidla (neopentylmagnesiumchloridu) a oxalylchloridu za využití katalýzy měďnými kationty.

Druhý diketon **dibutylester kyseliny dioxovinné** jsem připravila oxidací hydroxyskupin v esterifikované kyselině vinné. Přípravy obou dvou diketonů probíhaly bez problémů a s dobrými výtěžky.

Příprava pyrazinů

5,6-diaminopyrazin-2,3-dikarbonitril jsem připravila nukleofilní substitucí typu aminodehalogenace z 5,6-dichlorpyrazin-2,3-dikarbonitrilu pomocí amoniaku. Tato reakce probíhala bez problémů.

2,3-dineopentylpyrazin-5,6-dikarbonitril jsem připravila nejprve kondenzací diaminomaleonitrilu a 1,2-dineopentylethan-1,2-dionu. Jako alternativní metodu pro přípravu toohoto pyrazinu jsem zkusila také nukleofilní substituci 5,6-dichlorpyrazin-2,3-dikarbonitrilu Grignardovým činidlem. Tato reakce však neproběhla, takže z toho vyplývá, že nukleofilní substituce Grignardovým činidlem na chlorpyrazinech nejspíše fungovat nebude.

Příprava pyrazinopyrazinů

Dibutylester 6,7-dikyanpyrazino[2,3-b]pyrazin-2,3-dikarboxylové kyseliny jsem připravila reakcí dibutylesteru dioxovinné kyseliny a 5,6-diaminopyrazin-2,3-dikarbonitrilu.

Tento pyrazinopyrazin se podařilo připravit, proto jsem ho použila do cyklizace na přípravu AzaPc.

6,7-dineopentylpyrazino[2,3-b]pyrazin-dikarbonitril jsem připravovala celkem třemi reakcemi. Ani jedna z reakcí však neproběhla. Kondenzace 1,2-dineopentylethan-1,2-dionu s 5,6-diaminopyrazin-2,3-dikarbonitrilem v prostředí kyseliny octové (analogicky přípravě neopentylem substituovanému pyrazinu) neproběhla. Bohužel ani využití Grignardova činidla v reakci s 6,7-dichlorpyrazino[2,3-b]pyrazin-2,3-dikarbonitrilem nevedlo k očekávané reakci. Tyto produkty jsem nechala reagovat jak při pokojové teplotě tak i při -70 °C. Rozdíl v přípravě nebyl žádný, reakce probíhaly naprosto shodně za vzniku černé reakční směsi. Na TLC v toluenu jako mobilní fázi bylo vidět, že vzniká směs minimálně 6-7 produktů, ze kterých bylo ale těžko odhadnutelné, zda produkt vznikl a pokud ano, tak by očekávané výtěžky byly velice nízké. Tzn., že tyto kroky nevedou ke vzniku požadovaného produktu.

Syntéza AzaPc

K cyklizaci jsem tedy použila dibutylester 6,7-dikyanpyrazino[2,3-b]pyrazin-2,3-dikarboxylové kyseliny, ale symetrický AzaPc se nepodařilo z tohoto prekurzoru připravit. Po jeho přidání k butanolátu hořečnatému se okamžitě vytvořila zelená barvička, která však byla nestabilní a ihned se v reakci rozložila. Podobné chování bylo již dříve pozorováno u některých jiných derivátů pyrazino[2,3-b]pyrazinu, což může vést k domněnce, že tyto systémy budou silně nestabilní[82].

Vzhledem k neúspěchu předchozích reakcí jsme zkusili statistickou kondenzaci ze dvou různých prekurzorů, abychom získali směs AzaPc s různým počtem pyrazinů a chinoxalinových jader. I zde by byl posun absorpce k vyšším vlnovým délkám. První prekurzor 2,3-dineopentylpyrazin-5,6-dikarbonitril jsem připravila již zmíněnou reakcí a druhý 2,3-dineopentylchinoxalin-6,7-dikarbonitril byl již připravený na katedře. Vznikla však směs šesti komplexů, která se ovšem nedala dělit. Nepodařilo se oddělit jak hořečnaté komplexy (dle TLC bylo pozorováno silné chvostování jednotlivých látek a jejich vzájemný překryv), tak ani bezkovové, které se někdy chovají lépe a lépe separují od sebe.

7. ZÁVĚR

V rámci mé rigorózní práce jsem se snažila připravit deriváty pyrazino[2,3-b]pyrazinu kondenzačními reakcemi z diaminopyrazinu a diketonu.

Nejprve jsem připravila výchozí látky pro přípravu pyrazino[2,3-b]pyrazinů:

- 5,7 g dibutylesteru dihydroxy kyseliny vinné a z něj oxidací hydroxyskupin 2,95 g dibutylesteru dioxovinné kyseliny.
- Reakcí Grignardova činidla (neopentylmagnesiumchloridu) s oxalylchloridem jsem připravila 1,4 g 1,2-dineopentylethan-1,2-dionu, který jsem použila pro přípravu 147,6 mg 2,3-dineopentylpyrazin-5,6-dikarbonitrilu kondenzací s diaminomaleonitrilem.
- Připravit 2,3-dineopentylpyrazin-5,6-dikarbonitril reakcí Grignardova činidla s 5,6-dichlorpyrazin-2,3-dikarbonitrilem se nepodařilo.
- Substituční reakcí jsem připravila 472,3 mg 5,6-diaminopyrazin-2,3-dikarbonitrilu z 5,6-dichlorpyrazin-2,3-dikarbonitrilu.

Podařilo se mi připravit 378 mg dibutylesteru 6,7-dikyanpyrazino[2,3-b]pyrazin-2,3-dikarboxylové kyseliny kondenzační reakcí dibutylesteru dioxovinné kyseliny a 5,6-diaminopyrazin-2,3-dikarbonitrilu. Tento dibutylester jsem dále podrobila cyklizaci, ale symetrický AzaPc se nepodařilo připravit, i když jsem to zkoušela několikrát. Dále jsem se pokoušela o syntézu 6,7-dineopentylpyrazino[2,3-b]pyrazin-dikarbonitrilu reakcí 1,2-dineopentylethan-1,2-dionu a 5,6-diaminopyrazin-2,3-dikarbonitrilu a dále využitím Grignardova činidla v reakci s 6,7-dichlorpyrazino[2,3-b]pyrazin-2,3-dikarbonitrilem. Tento pyrazinopyrazin se mi nepodařilo připravit ani jednou reakcí. V závěru lze shrnout, že i když se podařilo připravit pouze jeden pyrazinopyrazin, nakonec se z něj nepovedla cyklizace na symetrický AzaPc, proto se pro jejich syntézu budou muset hledat jiné postupy.

ABSTRAKT

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

Kandidát: Mgr. Vendula Stará

Konzultant: PharmDr. Petr Zimčík, PhD.

Název rigorózní práce: Syntéza prekurzorů dusíkatých analogů ftalocyaninů

Fotodynamická terapie (PDT) je významná metoda pro léčbu řady nemocí, především však rakoviny. Kombinací světla, kyslíku a fotosenzitizéru (PS) dochází k poškození nádorové tkáně. Důležitým krokem výzkumu PDT je hledání nových PS, zlepšení jejich fotofyzikálních a optických vlastností, a především také možnosti jejich syntézy a syntézy jejich prekurzorů.

V mé rigorózní práci jsem se zaměřila na syntézu prekurzorů typu pyrazino[2,3-b]pyrazinu kondenzací diaminopyrazinu s diketony. Zavedením neopentylové či butoxykarbonylové skupiny na strukturu pyrazinopyrazinu by mohly vzniknout vhodné výchozí látky pro syntézu nových PS. Kondenzační reakcí dibutylesteru dioxovinné kyseliny a 5,6-diaminopyrazin-2,3-dikarbonitrilu jsem připravila dibutylester 6,7-dikyanpyrazino[2,3-b]pyrazin-2,3-dikarboxylové kyseliny, jež jsem dále podrobila cyklizaci na symetrický AzaPc, která ovšem nevedla k požadovanému produktu. Dále jsem se pokoušela o syntézu 6,7-dineopentylpyrazino[2,3-b]pyrazin-dikarbonitrilu reakcí 1,2-dineopentylethan-1,2-dionu a 5,6-diaminopyrazin-2,3-dikarbonitrilu a dále využitím Grignardova činidla v reakci s 6,7-dichlorpyrazino[2,3-b]pyrazin-2,3-dikarbonitrilem.

ABSTRACT

CHARLES UNIVERSITY IN PRAGUE
FACULTY OF PHARMACY IN HRADEC KRÁLOVÉ
DEPARTMENT OF PHARMACEUTICAL CHEMISTRY AND DRUG CONTROL

Candidate: Mgr. Vendula Stará

Consultant: PharmDr. Petr Zimčík, PhD.

Title of thesis: **The synthesis of aza-analogues of phthalocyanines precursors**

Photodynamic therapy (PDT) is a new significant treatment modality for several diseases, particularly cancer. Light, oxygen and photosensitizing drug (PS) are combined to produce a selective therapeutic effect. An important breakthrough in PDT is searching for a new PS, modification of their photophysical and optical properties and modification of their synthesis and synthesis of their precursors.

I focused on the synthesis of precursors of type pyrazino[2,3-b]pyrazine by condensation of diaminopyrazine with diketones in my thesis. I prepared dibutylester of 6,7-dicyanopyrazino[2,3-b]pyrazin-2,3-dicarboxylic acid by condensation reaction of dibutylester dioxotartaric acid and 5,6-diaminopyrazin-2,3-dicarbonitril. Prepared precursor was subsequently used in cyclization reaction toenlarged azaphthalocyanine but the reaction failed. Further, I tried to prepare 6,7-dineopentylpyrazino[2,3-b]pyrazin-2,3-dicarbonitril by reactions of 1,2-dineopentylethan-1,2-dione and 5,6-diaminopyrazin-2,3-dicarbonitril and using Grignard reagents in the reaction with 6,7-dichloropyrazino[2,3-b]pyrazin-2,3-dicarbonitril either.

8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

[1] Juarranz A., Jaén P., Rodriguez F. S., Cuevas J., Gonzales S.: Photodynamic therapy of cancer: Basic principles and applications, Clin. Transl. Oncol *10*, 148-154 (2008).

[2] Juzeniene A., Peng Q., Monn J.: Milestones in the development of photodynamic therapy and fluorescence diagnosis, Photochem. Photobiol. Sci. *6*, 1234-1245 (2007).

[3] Henderson B. W., Gollnick S. O., Snyder J.W.: Choice of oxygen-conserving treatment regimen determines the inflammatory response and outcome of photodynamic therapy of tumors, Cancer Res. *64*, 2120-2126 (2004).

[4] Zimčík P., Miletín M.:Fotodynamická terapie jako nová perspektivní metoda léčby nádorových onemocnění I. Historie, základní princip, Ceska Slov. Farm. *53 (5)*, 219 (2004).

[5] Triesscheijn M., Ruevekamp M., Aalders M.: Outcome of mTHPC mediated photodynamic therapy is primarily determined by the vascular response, Photochem. Photobiol. *81*, 1161-1167 (2005).

[6] Ochsner M., J. Photochem. Photobiol., B-Biol. *1*, 39 (1997).

[7] Oleinick N. L., Morris R. L., Belichenko I.: The role of apoptosis in response to photodynamic therapy: what, where, why, and how, Photochem. Photobiol. Sci. *1*, 1-21 (2002).

[8] Vililanueva A., Vidanin R., Stockert J. C.: Photodynamic effects on cultured tumor cells: cytoskeleton alterations and cell death mechanisms, In: Handbook of photochemistry and photobiology, vol. 4 (Ed.: HS Nalwa), American Scientific Publishers, California, USA, (2003), 79-117.

[9] Zimčík P., Miletín M.: Fotodynamická terapie jako nová perspektivní metoda léčby nádorových onemocnění II. Přehled fotosenzitizérů, Ceska Slov. Farm. *53 (5)*, 219 (2004).

[10] Buytaert B., Dewaele M., Agostinis P.: Molecular effectors of multiple cell death pathways initiated by photodynamic therapy, Biochem. Biophys. Acta *1776*, 86-107 (2007).

[11] Galaz S., Espada J., Stockert J. C.: Loss of E-cadherin mediated cell-cell adhesion as an early trigger of apoptosis induced by photodynamic treatmnet, J. Cell. Physiol. *205*, 86-96 (2005).

[12] Juarranz A., Espada J., Stockert J. C.: Photodamage induced by Zinc(II)-phthalocyanine to microtubules, actin, alpha-actinin and keratin of HeLa cells, Photochem. Photobiol. *73*, 283-289 (2001).

[13] Castano A. P., Mroz P., Hamblin M. R.: Photodynamic therapy and anti-tumour immunity, Nat. Rev. Cancer *6*, 535-545 (2006).

[14] Tozer G. M., Kanthou C. Baguley B. C.: Disrupting tumour blood vessels, Nat. Rev. Cancer *5*, 423-435 (2005).

[15] Gorner C. J., Ferrario A., Luna M: Photodynamic therapy: combined modality approaches targeting the tumor microenvironment, Lasers Surg. Med. *38*, 516-521 (2006).

[16] Detty R. M., Gibson S. L., Wagner S. J.: Current Clinical and Preclinical Photosensitizers for use in photodynamic therapy, J. Med. Chem. *47 (16)*, 3897-3915 (2004).

[17] Wainwright M.: Local treatment of viral disease using photodynamic therapy, J. Antimicrob. Agents *21*, 510-520 (2003).

[18] Margolis-Nunno H., Ben-Hur E., Gottlieb P., Robinson R., Octjen J., Horowitz B.: Inactivation by phthalocyanine photosensitization of multiple forms of human immunodeficiency virus in red cell concentrates, Transfusion *36*, 743-750 (1996).

[19] Ris H. B., Altermatt H. J., Inderbitzi R.: Photodynamic therapy with chlorins for difusse malignant mesothelioma: initial clinical results, Br. J. Cancer *64*, 1116-1120 (1991).

[20] Grant W. E., Speight P. M., Hopper C.: Photodynamic therapy: an effective, but non-selective treatment for superficial cancers of the oral cavity, Int. J. cancer *71*, 937-942 (1997).

[21] Hopper C., Niziol C., Sidhu M.: The cost-effectiveness of Foscan mediated photodynamic therapy (Foscan-PDT) compared with extensive palliative surgery and palliative chemotherapy with advanced head and neck cancer in the UK, Oral. Oncol. *40*, 372-382 (2004).

[22] Kubler A, Niziol C., Sidhu M.: Analysis of cost effectiveness of photodynamic therapy with Foscan (Foscan-PDT) in comparison with palliative chemotherapy in patients with advanced head-neck tumors in Germany, Laryngorhinootologie *84*, 725-732 (2005).

[23] Verrico A. K., Haylett A. K., Moore J. V.: In vivo expression of the collagen-related head shock protein HSP47 following hyperthermia or photodynamic therapy, Lasers Med. Sci. *16*, 192-198 (2001).

[24] Copper M. P., Tan I. B., Oppelaar H.: Meta-tetra(hydroxyphenyl)chlorin photodynamic therapy in early-stage squamous cell carcinoma of the head and neck, Arch. Otolaryngol. *129*, 709-711 (2003).

[25] Hopper C., Kubler A., Lewis H.: mTHPC-mediated photodynamic therapy for early oral aquamous cell carcinoma, Int. J. Cancer *111*, 138-146 (2004).

[26] Schuller D. E., McCaughan J. S. Jr, Rock R. P.: Photodynamic therapy in head and neck cancer, Arch. Otolaryngol. *111*, 351-355 (1985).

[27] Wile A. G., Novotny J., Mason G. R.: Photoradiation therapy of head and neck cancer, Prog. Clin. Biol. Res. *170*, 681-691 (1984).

[28] Kubler A. C., de Corrpentier J., Hopper C: Treatment of squamous cell carcinoma of the lip using Foscan-mediated photodynamic therapy, Int. J. Oral. Maxillofac. Surg. *30*, 5,4-509 (2001).

[29] Keller G. S., Doiron D. R., Fisher G. U.: Photodynamic therapy in otolaryngology-head and neck surgery, Arch. Otolaryngol. *111*, 758-761, (1985).

[30] Okunaka T., Kato H., Conaka C.: Photodynamic therapy of esophageal carcinoma, Surg. Endosc. *4*, 150-153 (1990).

[31] McCaughan J. S. Jr, Hicks W., Laufman L.: Palliation of esophageal malignancy with photoradiation therapy, Cancer *54*, 2905-2910 (1984).

[32] Sibille A., Lambert R., Souquet J. C. Long-term survival after photodynamic therapy for esophageal cancer, Gastroenterology *108*, 337-344 (1995).

[33] Grosjean P., Savary J. F., Mizeret J.: Photodynamic therapy for cancer of the upper aerodigestive tract using tetra(m-hydroxyphenyl)chlorin, J. Clin. Laser Med. Surg. *14*, 281-287 (1996).

[34] Schweitzer V. G., Bologna S., Batra S K.: Photodynamic therapy for treatment of esophageal cancer: a preliminary report, Laryngoscope *103*, 699-703 (1993).

[35] Brown L. M., Devesa S. S.: Epidemiologic trends in esophageal and gastric cancer in the United States, Surg. Oncol. Clin. N. Am. *11*, 235-256 (2002).

[36] Overholt B. F., Lightdale C. J., Wang K. K.: Photodynamic therapy with porfimer sodium for ablation of high-grade dysplasia in Barretts esophagus: international, partially blinded, randomized phase III trial, Gastrointest. Endosc. *62*, 488-498 (2005).

[37] Overholt B. F., Panjehpour M., Haydek J. M.: Photodynamic therapy for Barretts esophagus: follow-up in 100 patients, Gastrointest. Endosc. *49*, 1-7 (1999).

[38] Panjehpour M., Overholt B. F., Haydek J. M.: Results of photodynamic therapy for ablation of dysplasia and early cancer in Barretts esophagus and effect of oral steroids on stricture formation, Am. J. Gastroenterol. *95*, 2177-2184 (2000).

[39] Wolfsen H. C.: Corpe luz-seize the light: endoprevention of esophageal adenocarcinoma when using photodynamic therapy with porfimer sodium, Gastrointest. Endosc. *62*, 499-503 (2005).

[40] Pacifico R. J., Wang K. K., Wongkeesong L. M.: Combined endoscopic mucosal resection and photodynamic therapy versus esophagectomy for management of early adenocarcinoma in Barretts esophagus, Clin. Gastroenterol. Hepatal. *1*, 252-257 (2003).

[41] Moghissi K., Dixon K., Hudson E.: Photodynamic therapy for bronchial carcinoma with use of a rigid bronchoscope, Lasers Med. Sci. *7*, 381-385 (1991).

[42] Kelly J. F., Snell M. E., Berenbaum M. C.: Photodynamic destruction of human bladder carcinoma, Br. J. Cancer *31*, 237-244 (1975).

[43] Morales A.: Treatment of superficial bladder cancer, Can. Med. Assoc. J. 122, 1133-1138 (1980).

[44] Dougherty T. J.: Photodynamic therapy (PDT) of malignant tumors, Crit. Rev. Oncol. Hematol. *2*, 83-116 (1984).

[45] Rosenberg S. J., Williams R. D.: Photodynamic therapy of bladder carcinoma, Urol. Clin. North Am. *13*, 435, 444 (1986).

[46] Nseyo U. O., DeHaven J., Dougherty T. J.: Photodynamic therapy (PDT) in the treatment of patients with resistant superficial bladder cancer: a long-term experience, J. Clin. Laser Med. Surg. *16*, 61-68 (1998).

[47] Nseyo U. O.. Merrill D. C., Lundahl S. L., Green light photodynamic therapy in the human bladder, Clin. Laser Mon. *11*, 247-250 (1993).

[48] Waidelich R., Beyer W., Knuchel R., Whole bladder photodynamic therapy with 5-aminolevulinic acid using a white light source, Urology *61*, 332-337 (2003).

[49] Kriegmair M., Baumgartner R., Lumper W., Early clinical experience with 5-aminolevulinic acid for the photodynamic therapy of superficial bladder cancer, Br. J. Urol. *77*, 667-671 (1996).

[50] Skyrme R. J., French A. J., Datta S. N., A phase-1 study of sequential mitomycin C and 5-aminolevulinic acid-mediated photodynamic therapy in recurrent superficial bladder carcinoma, Br. J. Urol. *95*, 1206-1210 (2005).

[51] Buggiani G., Troiano M., Rossi R., Lotti T.: Photodynamic therapy: Off-label and alternative use in dermatological practice, Photodiagn. Photodyn. Ther. *5*, 134-138 (2008).

[52] Vokurka M., Hugo J.: Praktický slovník medicíny, MAXDORF s.r.o., Praha, 2007.

[53] Diepgen T. L., Mohler V.:The epidemiologie of skin cancer, Br. J. Dermatol. *146*, 1-6 (2002).

[54] Babilas P., Landthaler M., Szeimies R. M.: Photodynamic therapy in dermatology, Eur. J. Dermatol. *16*, 340-348 (2006).

[55] Tarstedt M., Rosdahl I., Berne B.: A randomized multicenter study to compare two treatment regiments of topical methyl aminolevulinate (Metvix)-PDT in actinic keratosis of the face and scalp, Acta Derm. Venereol. *85*, 424-428 (2005).

[56] Taub S.: Photodynamic therapy in dermatology: history and horizons, J. Drugs Dermatol. *3*, 8-25 (2004).

[57] Fijan S., Honigsmann H., Ortel B.: Photodynamic therapy of epithelial skin tumours using delta-aminolaevulinic acid and desferrioxamine, Br. J. Dermatol. *133*, 282-288 (1995).

[58] Soler A.M., Angell-Petersen E., Warloe T.: Photodynamic therapy of superficial basal cell carcinoma with 5-aminolevulinic acid with dimethylsulfoxide and ethylendiaminetetraacetic acid: a comparison of two light sources, Photochem. Photobiol. *71*, 724-729 (2000).

[59] Zeitouni N. C., Osoroff A. R.: Laser and photodynamic therapy in the management of cutaneous malignancies, Clin. Dermatol. *19*, 328-338 (2001).

[60] Bissonnette R., Zeng H., McLean D. I.: Oral aminolevulinic acid induces protoporphyrin IX fluorescence in psoriatic plaques and peripheral blood cells, Photochem. Photobiol. *74(2)*, 339-45 (2001).

[61] Boehncke W. H., Konig K., Kaufmann R.,: Photodynamic therapy in psoriasis: suppression of cytokine production in vitro and recording of fluorescence modification during treatment in vivo, Arch. Dermatol. Res. *286(6)*, 300-303 (1994).

[62] Bissonnette R., Tremblay J. F., Juzenas P.: Szstemic photodznamic therapz with aminolevulinic acid induced apoptosis in lesional T lymphocytes of psoriatic plaques, J. Invest. Dermatol. *119(1)*, 77-83 (2002).

[63] Robinson D. J., Collins P., Stringer M. R.: Improved response of plaque psoriasis after multiple treatments with topical 5-aminolaevulinic acid photodynamic therapy, Acta Derm. Venereol. *79(6)*, 451-455 (1999).

[64] Fransson J., Ros A. M.: Clinical and immunohistochemical evaluation of psoriatic plaques treated with topical 5-aminolaevulinic acid photodynamic therapy, Photodermatol. Photoimmunol. Photomed. *21(6)*, 326-332 (2005).

[65] Karrer S., Bosserhoff A. K., Weiderer P.: Keratinocyte-derived cytokines after photodynamic therapy and their paracrine induction of matrix metalloproteinases in fibroblasts, Br. J. Dermatol. *151(4)*, 776-783 (2004).

[66] Hillemanns P., Untch M., Pröve F.: Photodynamic therapy of vulvar lichen sclerosus with 5-aminolevulinic acid, Obstet: Gynecol. *93*, 71-74 (1999).

[67] Booth S., Poole D., Moghissi K.: Initial experience of the use of photodynamic therapy (PDT) in recurrent malignant and pre-malignant lesions of the vulva, Photodiagn. Photodyn. Ther. *3*, 156-161 (2006).

[68] Chiu L. L., Sun C. H., Yeh A. T.: Photodynamic therapy on keloid fibroblasts in tissue-engineered keratinocyte-fibroblast co-culture, Lasers Surg. Med. *37(3)*, 231-234 (2005).

[69] Szeimies R. M., Landthaler M., Karrer S.: Non-oncologic indications for ALA-PDT, J. Dermatolog. Treat. *13*, 513-518 (2002).

[70] Gold M. H., Boring M. M., Bridges T. M.: The successful use of ALA-PDT in the treatment of recalcitran molluscum contagiosum, J. Drugs Dermatol. *3(2)*, 187-190 (2004).

[71] Smetana Z., Ben-Hur E., Mendelson E.: Herpes simplex virus proteins are damaged following photodynamic inactivation with phthalocyanines, J. Photochem. Photobiol. B-Biol. *44*, 77-83 (1998).

[72] Jori G.: Photodynamic therapy of microbial infections: state of the art and perspectives, J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol. *25*, 505-520 (2006).

[73] Husar K., Skerlev M.: Molluscum contagiosum from infancy to maturity, Clin. Dermatol. *20*, 170-172 (2002).

[74] Ghersetich I., Troiano M., De Giorgi V., Lotti T.:Receptors and skin ageing and antiageing agents, Clin. Dermatol. *25*, 655-662 (2007).

[75] Green L. J., McCormick A., Weinstein G. D.: Photoaging and the skin: the effects of tretinoin, Clin. Dermatol. *11*, 97-105 (1993).

[76] Ruiz-Rodriguez R., Sanz-Sanchez T., Cordoba S.: Photodynamic photorejuvenation, Dermatol. Surg. *28(8)*, 742-744 (2002).

[77] Babudri F., Fiandanese V., Marchese G., Punzi A.: A direct access to α-diones from oxalyl chloride, Tetrahedron Lett. *36*, 7305-7308 (1995).

[78] Mitzel F., FitzGerald S., Beeby A., Faust R.: Octaalkynyltetra[6,7]quinoxalinoporphyrazines: a new class of photosensitisers with potential for photodynamic therapy, Chem. Commun., 2596-2597 (2001).

[79] Kleinwächter J., Subramanian L. R., Hanack M.: Synthesis of silicon tetrapyrazinoporphyrazines, J. Porphyrins Phtalocyanines *4*, 498-504 (2000).

[80] Faust R., Weber Ch.: Three-step synthesis and absorption and emission properties of peripherally peralkynylated tetrapyrazinoporphyrazines, J. Org. Chem. *64*, 2571-2573 (1998).

[81] Novakova V., Zimcik P., Miletin M., Kopecky K., Musil Z.: Tetra [6,7] quinoxalinoporphyrazines: The effect of an additional benzene ring on photophysical and photochemical properties, Eur. J. Org. Chem., 732-739 (2010).

[82] Mørkved E. H., Afseth N. K., Zimcik P.: Azaphtalocyanines with extended conjugation through heteroaryl and aryl substituens. Photochemical and photophysical properties, J. Porphyrins Phthalocyanines *11*, 130-138 (2007).

[83] Kudrevich S. V., Galpern M. G., Van Lier J. E.: Synthesis of octacarboxytetra(2,3-pyrazino)porphyrazine: Novel water soluble photosensitizers for photodynamic therapy, Synthesis, 779-781 (1993).

[84] Musil Z, Zimcik P., Miletin M., Kopecky K., Petrik P, Lenco J.: Influence of electron-withdrawing and electron-donating substituents on photophysical properties of azaphtalocyanines, J. Photochem. Photobiol. A.-Chem. *186*, 316-322 (2007).