

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



**SYNTÉZA PREKURZORŮ A STUDIE NÁSLEDNÉ „CLICK“ AZID-
ALKYN CYKLOADICE**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Vedoucí diplomové práce:

PharmDr. Petr Zimčík Ph.D.

Hradec Králové, 2010

Jana Ivincová

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

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

V Hradci Králové dne 14.5.2010

Jana Ivincová

*Děkuji PharmDr. Petru Zimčikovi, Ph.D. a Mgr. Veronice Novákové, kteří byli na mě
moc hodní a práce pod nimi byla úplně boží 😊*

Obsah

1. Seznam zkratk.....	6
2. Cíl práce.....	7
3. Teoretická část.....	8
3.1. Princip fotodynamické terapie	8
3.2. Historie fotodynamické terapie.....	8
3.2.1. Fototerapie.....	8
3.2.2. Fotochemoterapie.....	9
3.2.3. Fotodynamická terapie.....	9
3.3. Kyslík v PDT	10
3.4. Typy fotosenzitizérů.....	11
3.4.1. Fotosenzitizéry první generace.....	11
3.4.2. Fotosenzitizéry druhé generace.....	13
3.4.3. Fotosenzitizéry třetí generace.....	18
3.5. Konjugace ftalocyaninů s biomolekulami	19
3.5.1. Konjugace s glykosidy (glykokonjugace).....	19
3.5.2. Konjugace s aminokyselinami a peptidy.....	20
3.5.3. Konjugace s epidermálním růstovým faktorem.....	21
3.5.4. Konjugace s oligonukleotidy.....	21
3.5.5. Konjugace s monoklonálními protilátkami.....	21
3.5.6. Konjugace s cholesterolem.....	22
3.5.7. Konjugace s estrogeny (estradiolem).....	22
4. Metodická část.....	24
4.1. „Click chemistry“.....	24
4.1.1. Klasifikace click reakcí.....	24
4.1.2. 1,3 azid-alkyn cykloadice.....	26
4.1.3. Mechanismus cykloadice.....	29
4.1.4. Aplikace „click chemistry“ ve farmaceutických vědách.....	30

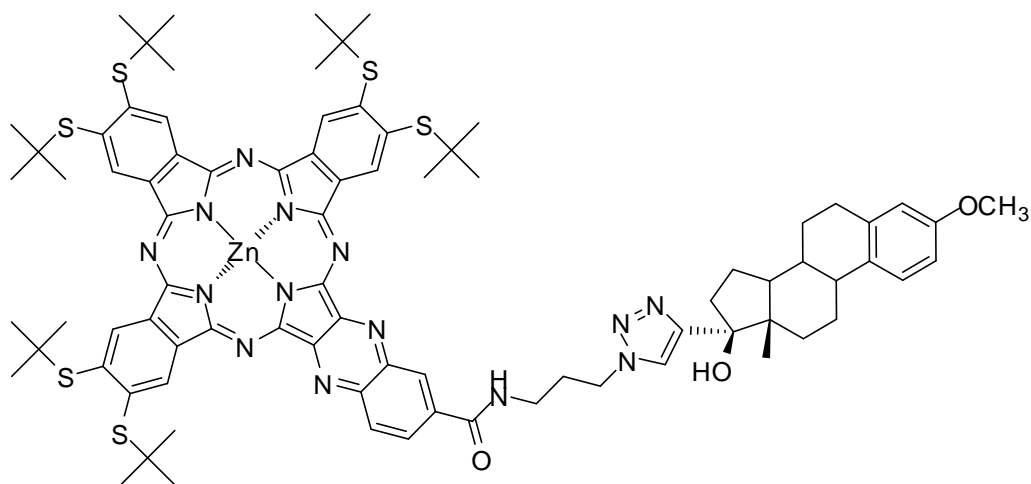
4.1.5.	Úskalí „click chemistry“.....	32
5.	Experimentální část.....	34
5.1.	Schéma prováděných reakcí	35
5.1.1.	Příprava 3-azidopropylaminu (1).....	36
5.1.2.	Příprava <i>N</i> -(3-azidopropyl)benzamidu (3).....	37
5.1.3.	Příprava <i>N</i> -[3-(4-pentyl- 1 <i>H</i> -1,2,3- triazol-1-yl)propyl] benzamidu (4)...	38
5.1.4.	Příprava ftalocyaninu (6) Metoda A	39
5.1.5.	Příprava ftalocyaninu (6). Metoda B.....	43
5.1.6.	Příprava konjugátu (10).....	46
6.	Výsledky a diskuze.....	48
7.	Závěr.....	53
8.	Použitá literatura.....	56

1. Seznam zkratek

ALA	kyselina 5-aminolevulinová
BPD	benzoporfyrinový derivát
DBU	1,8-diazabicyklo[5,4,0]undec-7-en
DIPEA	<i>N,N'</i> -diisopropylethylamin
DMF	dimethylformamid
EGF	„epidermal growth factor“; epidermální růstový faktor
HBTU	<i>O</i> -(Benzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluronium-hexafluorofosfát
HpD	hematoporfyrinový derivát
ISC	„intersystem crossing“; mezisystémový přechod
LDL	„low density lipoproteins“; lipoproteiny o nízké hustotě
MAb	monoklonální protilátky
Ncs	„naphthalocyanines“; naftalocyaniny
Pcs	„phthalocyanines“; ftalocyaniny
PDT	„photodynamic therapy“; fotodynamická terapie
ROS	„reactive oxygen species“, reaktivní formy kyslíku
TCEP	<i>tris</i> (2-karboxyethyl)fosfin
TEA	triethylamin
THF	tetrahydrofuran
THPTA	<i>tris</i> (hydroxypropyltriazolylmethyl)amin

2. Cíl práce

Cílem mé diplomové práce byla příprava fotosenzitizéru třetí generace pomocí 1,3 azid-alkyn cykloadice. K tomu bylo nejprve zapotřebí studium této metody na jednodušších sloučeninách, hledání optimálních podmínek reakce a syntéza prekurzorů, které by se v této metodě daly uplatnit. Používané prekurzory obsahující azidovou funkční skupinu jsem podrobila cykloadici s látkami, které ve své molekule obsahovaly terminální alkynovou skupinu a sledovala jsem průběh a podmínky reakce. Následně jsem využila poznatků při biokonjugaci zvoleného ftalocyaninu s optimálně modifikovanou strukturou a steroidním hormonem mestranolem, který nese terminální alkynovou skupinu. Cílem bylo připravit fotosenzitizér třetí generace, který se skládá z fotodynamicky aktivní látky, spojky (linkeru) a biomolekuly a který se vyznačuje výhodnějšími vlastnostmi oproti předchozím fotosenzitizérům.



Obr.1 Cílová molekula

3. Teoretická část

3.1. Princip fotodynamické terapie

Fotodynamická terapie (PDT) je novější metoda léčby některých nádorových onemocnění jako je rakovina průdušek, močopohlavního ústrojí, plic, jícnu, kolorektální karcinom, aj. Obdobně se využívá i k léčbě neonkologických onemocnění, zejména věkem podmíněné makulární degeneraci, akné a jiných kožních defektů a tím přispívá ke zvýšení kvality života a doby přežití. K realizaci fotodynamické terapie je zapotřebí fotosenzibilizujícího činidla (fotosenzitizéru), který je akumulován v nádorové tkáni, a jeho následná aktivace světlem specifické vlnové délky, nejčastěji laserem barvivovým či diodovým. Výsledkem je sled fotochemických a fotobiologických procesů a indukce vzniku reaktivních forem kyslíku nebo produkce singletového kyslíku, což má za následek destrukci nádorové tkáně^(1,2). Oproti ostatním terapiím zaměřeným na léčbu rakoviny (chemoterapie, radioterapie) je fotodynamická terapie vysoce selektivní, což je pozitivní vzhledem ke snížené destrukci zdravé tkáně. Na druhou stranu limitem vysoké selektivity této metody může být fakt, že pokud nenalezneme případnou metastázi, s největší pravděpodobností nastane remise onemocnění.

3.2. Historie fotodynamické terapie

3.2.1. Fototerapie

Fototerapie, neboli léčba světlem, využívá účinky viditelného, infračerveného i ultrafialového světla na organismus. Blahodárné účinky světla jsou známy již tisíce let. Starověké civilizace využívaly fototerapie k léčbě některých kožních onemocnění, ale i například rachitidy či psychických onemocnění. Podobně bylo využíváno světla ve Francii v 18. a 19. století při léčbě tehdejších velmi častých onemocnění, jako tuberkulózy, kurdějí, revmatismu a rachitidy. V roce 1903 byla udělena Nobelova cena dánskému lékaři Nielsu Ryberg Finsenovi za objev léčby kožní tuberkulózy ultrafialovým světlem^(1,3).

3.2.2. Fotochemoterapie

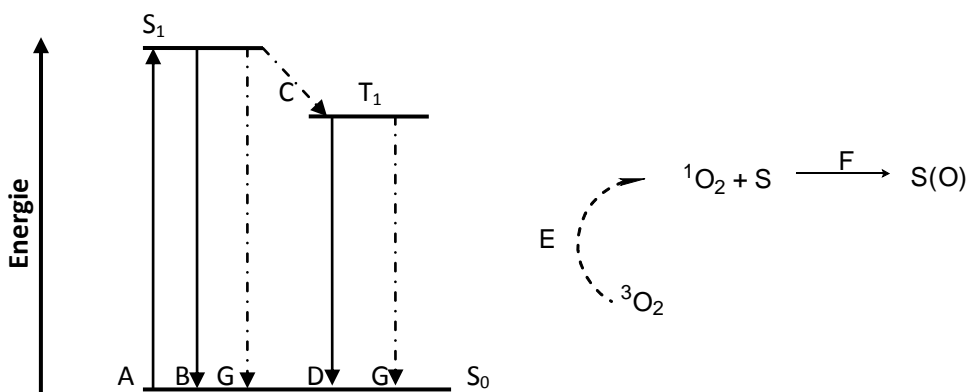
Tato metoda je založena na kombinaci léčby UV zářením za přítomnosti fotosenzitizéru (psoralen), který zcitlivuje cílovou tkáň k jeho účinku, což je hlavní princip fotochemoterapie. Základy fotochemoterapie spadají do druhého tisíciletí př.n.l., kdy Indiáni využívali přírodní fotoaktivní kumarin psoralen k léčbě vitiliga. Od sedmdesátých let dvacátého století se využívá psoralenu v kombinaci s UVA zářením k léčbě vitiliga, psoriázy a při imunoterapii ^(1,3).

3.2.3. Fotodynamická terapie

Na rozdíl od výše uvedených metod, fotodynamická terapie je založena na buněčné smrti indukované kombinací chemické látky, světla a kyslíku. V roce 1900 německý student medicíny Oscar Raab při výzkumu vlivu akridinu na protozoi způsobenou malárií objevil, že kombinace akridinové oranže a světla má letální vliv na živé organismy (*Paramecium*)^(1,3). Následně došel k závěru, že *in vitro* toxicitu způsobují produkty fluorescence a přeměna světelné energie na chemickou, ne světlo samotné. Raabův profesor Herman von Tappeiner společně s dermatologem Jesionkem využili kombinaci fluorescenční sloučeniny eosinu a světla k léčbě kožních nádorů⁽¹⁾. V roce 1907 byl pak zaveden pojem fotodynamická aktivita. Průběh celého 20. století na poli fotodynamické terapie se nesl ve výzkumu fotosenzitizérů převážně neporfyrinového typu jako léčiv pro nádorové tkáně, podobně jako využití fotosenzitizérů (zejména porfyrinů) k detekci nádorů. V druhé polovině 20. století došlo k rozvoji oboru díky vědcům Samuelu Schwartzovi a Richardu Lipsonovi. Samuel Schwartz izoloval příměsi z hematoporfyrinových přípravků, které umožnily lokalizovat nádory a pojmenoval je **hematoporfyrinový derivát (HpD)**. Richard Lipson poté využil HpD jako detekční činidlo a rozpoznal, že může být použito jako fotosenzitizér k destrukci nádorové tkáně. V sedmdesátých letech Thomas J. Dougherty po několikaletém výzkumu a identifikaci aktivní frakce HpD, izoloval čištěnou frakci **Photofrin[®]**, jež byl později oficiálně schválen k léčbě rakoviny plic a jícnu. V posledním čtvrtstoletí se PDT vyvinula do zcela samostatného oboru, s vlastním sdružením, the International Photodynamic Association ^(1,3,4). Výzkum se zaměřuje na vývoj nových typů fotosenzitizérů s výhodnějšími vlastnostmi.

3.3. Kyslík v PDT

Singletový kyslík ($^1\text{O}_2$), jako hlavní cytotoxický produkt v PDT, je generován fotochemickými reakcemi. Absorbací světla lze fotodynamická barviva převést do excitovaného stavu S_1 , z kterého se následným mezisystémovým přechodem („intersystem crossing“, ISC) mohou dostat do stavu tripletového T_1 . Při jejich návratu do základního stavu S_0 mohou pak předat svoji energii molekulovému kyslíku ($^3\text{O}_2$), který je tímto převeden na singletový kyslík ($^1\text{O}_2$). Singletový kyslík poté může tvořit adukty s různými organickými substráty za vzniku oxidovaných substrátů ($S(\text{O})$). Fotochemické reakce jsou prezentovány pomocí Jablonského diagramu (viz Obr. 2).



Obr.2 Jablonského diagram ukazující zářivé a nezářivé přechody fotoluminiscenční molekuly: (A) excitace; (B) fluorescence – přechod do nižšího elektronového stavu se stejnou multiplicitou; (C) **mezisystémový přechod (ISC)**; (D) fosforescence – přechod mezi stavy s různou multiplicitou; (E) nezářivý přenos energie tripletovému kyslíku; (F) substrátová oxidace singletovým kyslíkem; (G) vnitřní konverze⁽¹⁾.

Míra produkce singletového kyslíku je závislá na několika faktorech. Prvním z nich je intenzita ozáření (ψ). Je vhodné, aby nebyla příliš vysoká, jelikož se zásoba kyslíku ze tkání rychleji vyčerpává a tkáně poté mohou být k PDT resistantní. Dalšími faktory pak jsou celková PDT dávka (D_{PDT}), koncentrace fotosenzitizéru (C), jeho molární extinkční koeficient (ϵ) a kvantový výtěžek singletového kyslíku fotosenzitizéru (ϕ). Matematicky se produkce singletového kyslíku dá vyjádřit následující rovnicí (I), kde E_ϕ značí standardní redukční potenciál, $\frac{d[^1\text{O}_2]}{dt}$ pak značí míru produkce singletového

kyslíku. Z rovnice je dále patrná lineární závislost spotřeby molekulového kyslíku na intenzitě ozáření^(1,5).

$$\frac{d[{}^1\text{O}_2]}{dt} = \frac{\varepsilon C \psi}{E_\varphi} \varphi = \frac{D_{\text{PDT}}}{t E \varphi} \varphi = k[{}^3\text{O}_2] \quad (1)$$

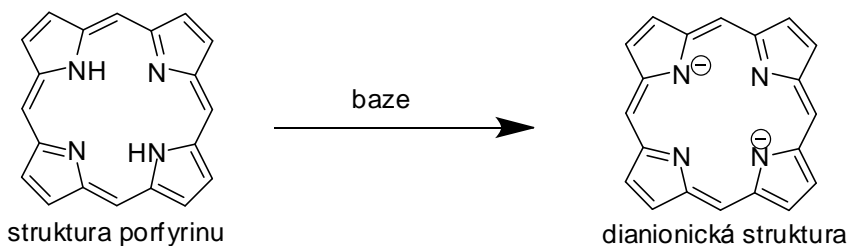
3.4. Typy fotosenzitizérů

Fotosenzitizéry jsou chemické sloučeniny, které jsou po absorpci světla určité vlnové délky schopny produkovat reaktivní sloučeniny kyslíku, což vede k buněčné smrti a destrukci tkání. Na rozdíl od zdravé tkáně, by fotosenzitizéry měly být nádorovou tkání zadržovány po delší dobu a ve větší míře. Z důvodu minimalizace škodlivých účinků na zdravou tkáň je tak důležité zajistit, aby světelná aktivace probíhala jen v případě, že množství fotosenzitizéru je větší v nádorové tkáni než ve zdravé^(1,6,7,8,9). I když mnoho různých fotosenzitizujících sloučenin (akridin, methylenová modř) mohou tvořit singletový kyslík a být používány v PDT, převážná většina fotosenzitizérů jsou cyklické deriváty tetrapyrrolo (porfyriny, chloriny, bakteriochloriny, ftalocyaniny). Důvodem je zřejmě jejich nízká toxicita při absenci světla⁽¹⁰⁾.

3.4.1. Fotosenzitizéry první generace

Fotosenzitizéry první generace jsou tvořeny deriváty porfyrinů. Porfyriny jsou látky klasifikovány jako tetrapyrolické molekuly. Jelikož obsahují konjugovaný systém dvojných vazeb, jsou intenzivně zbarvené. Svůj název dostaly podle řeckého výrazu *porphura* - fialový⁽¹¹⁾. Jsou součástí důležitých biologických pochodů, jako je fotosyntéza a využívají se např. v medicíně nebo k zobrazování pomocí fluorescence. Základem molekuly porfyrinu je heterocyklický makrocyklus porfín. Je složený ze čtyř pyrrolových jader spojených čtyřmi methynovými (-CH=) můstky. Ztrátou vodíku pomocí silné báze (alkoxidu) vzniká dianionická struktura (viz **Obr.3**). Vzniklé čtyři centrální dusíky mohou sloužit jako ligandy pro navázání kationtu kovu do centra molekuly. Nejčastějším kovem bývají kationty železa, které vazbou na porfyrin dávají vznik chromoforům nalézajících se např. v proteinech hemoglobinu nebo myoglobinu.

Sloučeniny podobné porfyriu mohou vázat i jiné kovy. Tak tedy chlorin vazbou hořčíku tvoří chlorofyl, bakteriochloriny pak bakteriochlorofyl.

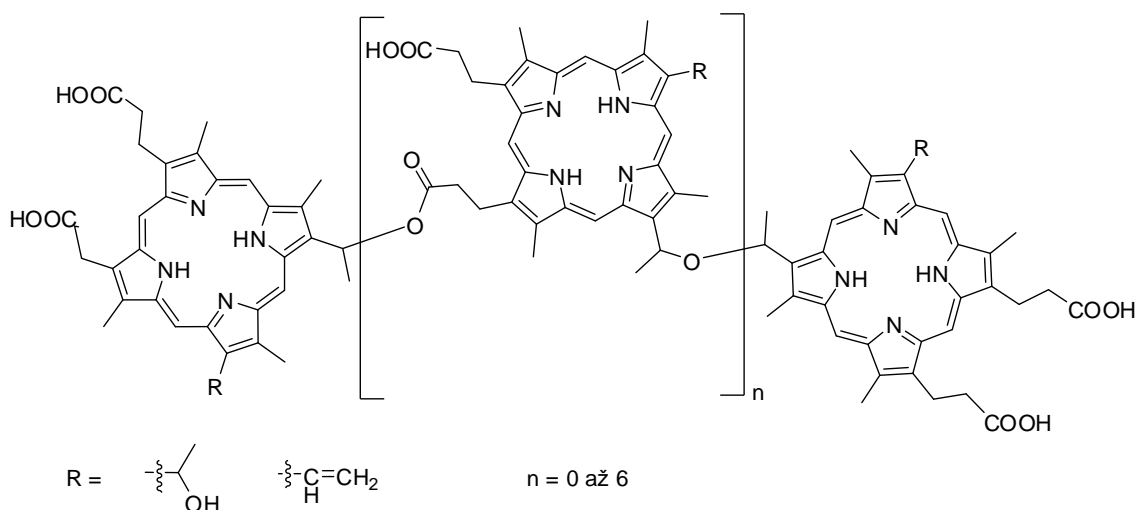


Obr.3 Schéma vzniku dianionické struktury porfyriu.

Všechny sloučeniny podobné porfyriu mají silný absorpční pás okolo vlnové délky 400 nm (tzv. Soretův pás, někdy nazývaný také jako B pás), nicméně při takovéto vlnové délce není světlo schopno pronikat dostatečně hluboko do tkání, a proto je tento absorpční pás fotosenzitizéru pro PDT nevhodný. Z tohoto důvodu se pro excitaci fotosenzitizéru používá slabší pás, tzv. Q pás. Vlnová délka tohoto pásu se pohybuje mezi 600 až 800 nm, což už je pro léčbu použitelné^(1,10).

Porfimer sodný (Photofrin[®])

Nejčastěji používaným porfyriem, využívaným hlavně k léčbě rakoviny je porfimer sodný neboli **Photofrin[®]** (viz **Obr.4**). Je to čištěná frakce HpD, složená z monomerů, dimerů, trimerů a větších oligomerů tvořících osm až devět porfyriových jednotek. Oligomery bývají spojeny éterovou či esterovou vazbou. Absorpce se pohybuje v oblasti vlnových délek okolo 630nm^(1,2). Výhodnou vlastností porfimeru sodného je to, že nevykazuje systémovou toxicitu a zároveň není mutagenní a karcinogenní v používaných dávkách. Jeho použití zahrnuje léčbu rakoviny močového měchýře, Barrettova jícnu či dysplázie těžkého stupně (HGD- high grade dysplasia).



Obr.4 Struktura fotosenzitizéru porfimeru sodného.

3.4.2. Fotosenzitizéry druhé generace

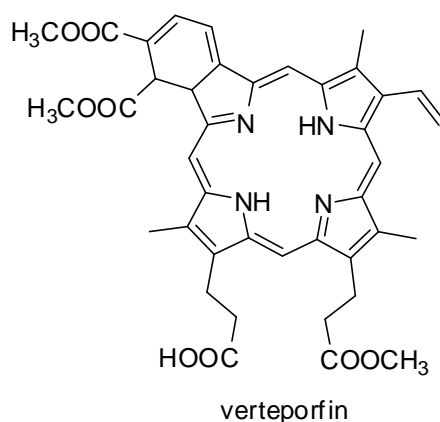
Ačkoliv jsou výše uvedené sloučeniny jako fotosenzitizéry účinné, mají několik nevýhodných vlastností. Především jde o nízkou selektivitu mezi nádorovou a zdravou tkání, o vyvolání kožní fotosenzitivity a o nedostatek chemické homogenity a stability⁽⁶⁾. Dalším limitujícím faktorem je jejich absorpce při nízkých vlnových délkách. Optimální rozsah vlnových délek je mezi 600 nm a 800 nm, tvoří tzv. terapeutické okno. Při nižších vlnových délkách absorbují endogenní chromofory (hemoglobin, myoglobin) a světlo neproniká tak hluboko do tkání, neboť je právě endogenními látkami z velké části pohlceno, naopak při vyšších vlnových délkách nemá světlo dostatek energie na aktivaci fotosenzitizéru. Zároveň by měla být vlnová délka v daném rozmezí co nejvyšší, aby byla schopna proniknout hlouběji do tkání⁽²⁾. Z těchto důvodů je ideální fotosenzitizér charakterizován následujícími kritérii:

- 1) silná absorpce při vlnových délkách 600-800 nm, umožňující hlubší průnik do tkání^(1,6,7,12)
- 2) vhodné fotofyzikální vlastnosti, zejména vysoký kvantový výtěžek singletového kyslíku, tripletového stavu fotosenzitizéru, relativně dlouhá doba života tripletového stavu a vysoká energie tripletového stavu

- 3) efektivní produkce singletového kyslíku a reaktivních forem kyslíku jednotek (ROS)
- 4) minimální toxicita ve tmě
- 5) vysoká schopnost být zadržován v nádorových tkáních, na rozdíl od tkání zdravých
- 6) vysoká clearance z těla
- 7) dobře známé a konstantní složení sloučeniny, se snadnou syntézou a vysokými výtěžky, výhodné fyzikálně-chemické vlastnosti, jako snadná rozpustnost ve vodě, umožňující přímé intravenózní podání a transport k zamýšlenému cíli, z tohoto důvodu je výhodný hydrofilní charakter sloučeniny⁽¹⁰⁾

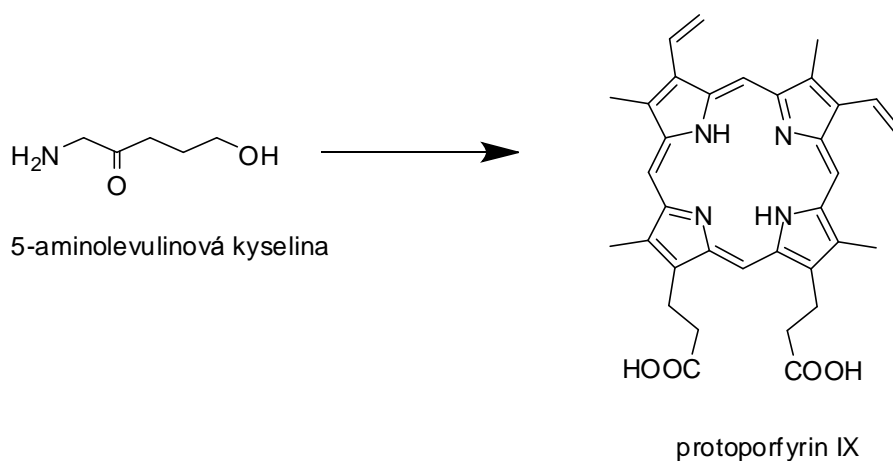
Proto byly vyvinuty sloučeniny, nazývané fotosenzitizéry druhé generace, které lépe splňují výše uvedené podmínky ve srovnání s fotosenzitizéry první generace.

Benzoporfyrinové deriváty (BPDs), (verteporfin) (viz **Obr.5**) jsou sloučeniny synteticky odvozené od protoporfyrinu IX. Absorpční maxima dosahují vlnové délky 690 nm, což umožňuje o 50 % větší průnik do tkání než u porfimeru. Dále oproti porfimeru sodnému vykazuje větší absorpci nádorovou tkání, větší clearance a minimální fotosenzitivitu pacienta. Typickým zástupcem je verteporfin (Visudyne[®]), který indukuje nekrózu tumoru po 3 hodinách po ozáření laserem a pozdržuje další růst nádoru o 14 až 28 dní. Využívá se k léčbě věkem podmíněné makulární degenerace, okulární histoplazmózy, krátkozrakosti, k léčbě pigmentových melanomů, v preklinických studiích je zkoumána léčba dětských mozkových nádorů pomocí BPD^(2,6,13,14,15).



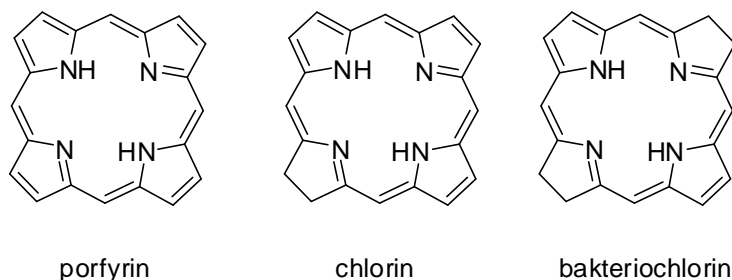
Obr.5 Struktura verteporfinu.

Kyselina 5-aminolevulinová (ALA) není přímo fotosenzitizérem, ale je prolečivem, prekurzorem pro biosyntézu fotodynamicky aktivního protoporfyrinu IX (viz **Obr.6**), ze kterého se biosynteticky tvoří hem u savců nebo chlorofyl u rostlin. Dodáváním vysokého množství ALA do organismu dochází k přesycení enzymu konvertujícího protoporfyrin IX na hem a dochází tak k akumulaci fluorescentního, fotodynamicky aktivního protoporfyrinu IX v tkáních. ALA se využívá též při vizualizaci nádorové tkáně při neurochirurgických zákrocích. Pod firemním názvem Levulan[®], je ALA vhodná jak pro intravenózní a perorální, tak topické podání a to pro léčbu některých kožních onemocnění, např. psoriáza, hirsutismus či prekancerózní léze. Stejně využití má i methyl-aminolevulinát (mALA), což je methylester ALA, který lépe proniká přes kožní bariéru a slouží tedy jako prekurzor ALA^(2,6-9,12,16,17).

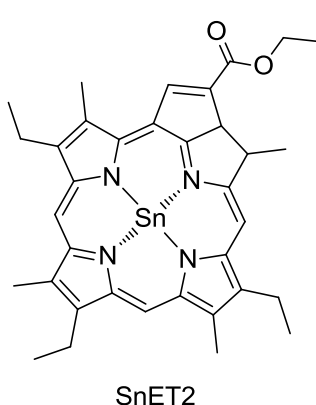


Obr.6 Schéma vzniku protoporfyrinu IX z 5-aminolevulinové kyseliny.

Chloriny a bakteriochloriny jsou sloučeniny odvozené od porfyrinů (viz **Obr.7**). Chloriny vykazují absorpční maximum okolo 660 nm, na rozdíl od porfyrinů mají jednu dvojnou vazbu redukovanou, bakteriochloriny mají redukovány dvě dvojně vazby a absorpční maximum okolo 770 nm (viz struktura). Tato jejich vlastnost je dána počtem π elektronů v aromatickém kruhu, které vzrůstají směrem od bakteriochlorinů k porfyrinům (bakteriochloriny 18 π elektronů, chloriny 20 π elektronů, porfyriny 22 π elektronů)⁽²⁾.



Obr.7 Rozdíly ve struktuře porfyrinů, chlorinů a bakteriochlorinů ⁽¹⁾.

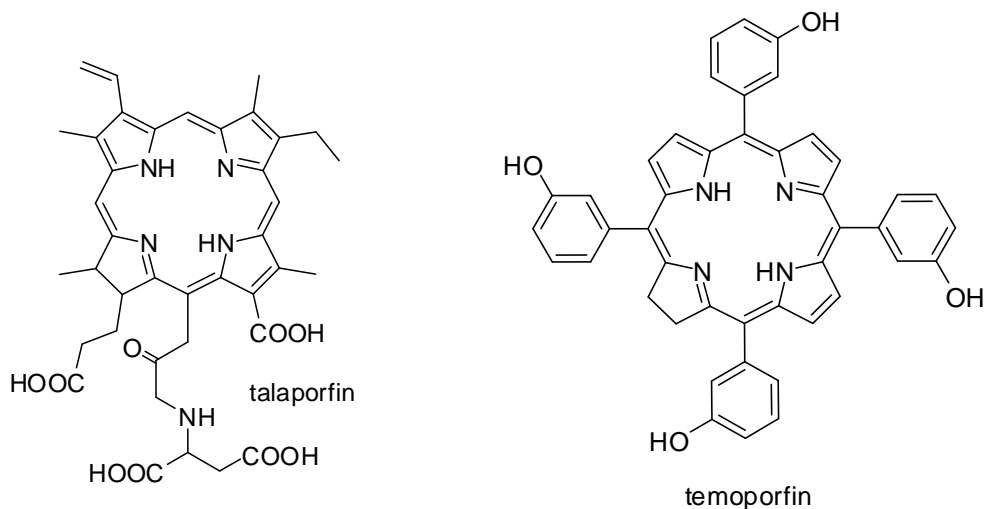


Rostaporfin (Purlytin[®]) (viz **Obr.8**), cinnatý komplex etiopurpurinu (SnEt_2), je chlorinový fotosenzitizér s absorpčními maximy v okolí 650 nm. Jde o produkt degradace chlorofylu, tzv. purpurin. Používá se při léčbě benigních forem psoriázy, dále je zkoumán v souvislosti s léčbou rakoviny prsu. Je prokázáno, že fotoreakce probíhá týden až dva po podání přípravku ^(1,6-9,11,18 19).

Obr.8 Schéma struktury rostaporfinu.

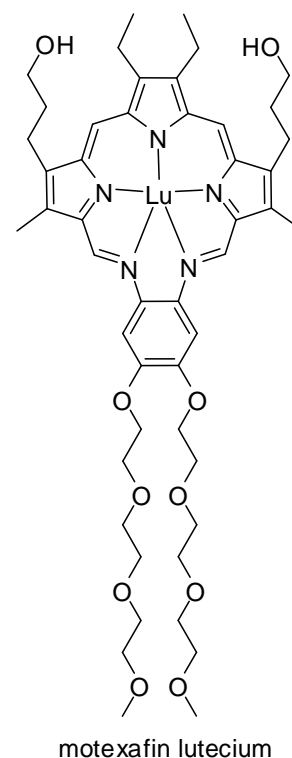
Talaporfin (mono-*L*-aspartyl chlorin e6, Npe6) (viz **Obr. 9**) se získává polosynteticky z chlorofylu a. Tento fotosenzitizér s hlavním absorpčním pásem při 664 nm ($\epsilon=40000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) je ve formě sodné soli možno podávat intravenózně bez nutnosti dalších solubilizérů. Výhodou je nízká kožní fotosenzitivita (pouze 3-7 dní). Používá se v Japonsku k léčbě počátečních stádií rakoviny plic. Je testována i k léčbě rakoviny jater, kolorektálního karcinomu a gliomu. Všechny studie ukazují, že se jedná o účinný a bezpečný fotosenzitizér ²⁰.

Temoporfin (Foscan[®]) je název pro tetra(*m*-hydroxyfenyl)chlorin (*m*THPC) (viz **Obr.9**). Na rozdíl od porfimeru sodného je temoporfin asi 100 krát více fotoaktivní, a tudíž vyžaduje mnohem menší množství léčiva a světelné dávky k vyvolání stejného efektu. Nižší dávky léčiva by tak mohly být řešením nevýhodné vlastnosti temoporfinu, čímž je fototoxicita sloučeniny ^(1,6,8,11). Využití temoporfinu je v klinické studii pro léčbu rakoviny žaludku, pankreatu, krku a hlavy, hyperplasii a eradikaci bakterií resistantních na ATB ^(6,11,16).



Obr.9 Struktura temoporfinu a talaporfinu.

Lutecitý motexafin (Lutex[®]) (viz **Obr.10**) je ve vodě rozpustná sloučenina patřící do skupiny rozšířených metaloporfyrinů – metalotexafyrinů. Je to sloučenina vysoce selektivní k nádorovým tkáním s absorpčním maximem asi 732 nm, což umožňuje hlubší průnik aktivujícího světla do tkání⁽¹⁾. Látka byla zkoumána ve druhé fázi klinických studií pro využití k léčbě rakoviny prsu a maligních melanomů. Pod firemními názvy **Antrin[®]** a **Optrin[®]** byl motexafin zkoumán a také testován pro léčbu restenózy cév po angioplastice (Antrin[®]) a pro věkem podmíněnou makulární degeneraci (Optrin[®])⁽⁶⁾.

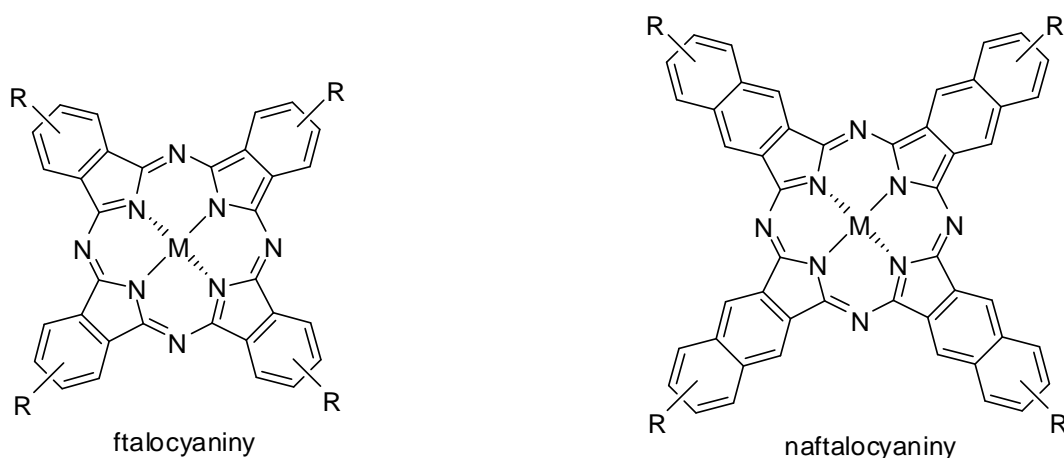


Obr.10 Struktura lutecitého motexafinu.

Ftalocyaniny (Pcs) (viz **Obr.11**) jsou dusíkaté aromatické heterocykly, strukturálně podobné porfyrinům. Základem jsou čtyři isoindolové podjednotky spojené azomethynovými můstky za vytvoření šestnáctičlenného kruhu. Na rozdíl od porfyrinů, ftalocyaniny obsahují uprostřed můstků spojujících pyrrolické podjednotky atomy dusíku. V aktivním centru molekuly je většinou kovalentní vazbou vázaný ion kovu (zinečnatý, hlinitý, křemičitý, aj.). Podobně můžeme na periferii vázat různé substituenty (hydroxylové, sulfonované). Tím můžeme pozitivně ovlivnit některé fyzikálně-chemické vlastnosti, stejně tak jako zvýšení vlnových délek absorpčních

maxim či zvýšení produkce singletového kyslíku. Pcs jsou intenzivně zbarveny a tudíž průmyslově využívány jako barviva^(2,19,21).

Naftalocyaniny (Ncs) (viz **Obr.11**) jsou deriváty ftalocyaninu rozšířené o benzenová jádra přikondenzovaná k podjednotce isoindolu na periferii Pcs. Absorbují při vyšších vlnových délkách (740-780 nm), což je vyhovující zejména pro léčbu melanomů, zároveň však vykazují některé nevýhodné vlastnosti pro použití Ncs jako fotosenzitizérů. Ncs jsou méně fotostabilní než Pcs a za přítomnosti světla a kyslíku rychle podléhají rozkladu. Jejich sloučeniny s kovy v roztoku tvoří fotodynamicky inaktivní H-agregáty^(10,19).



Obr.11 Obecná struktura ftalocyaninů a naftalocyaninů.

3.4.3. Fotosenzitizéry třetí generace

Špatná rozpustnost ve vodném prostředí, zvláště při fyziologickém pH, je problémem mnoha fotosenzitizérů. Tento jev zabraňuje přímému podání léčiva do krevního řečiště a distribuci do postižených tkání. Proto je snahou najít vhodný způsob, jak dané léčivo co nejefektivněji doručit k cílovým tkáním. Jedním z nich je využití nanočástic či lipozómů v podobě emulze olej ve vodě (o/v). Tento systém má ovšem tendenci snižovat kvantové výtěžky singletového kyslíku, nemusí být dobře rozpustný ve fyziologických tekutinách nebo částice systému nejsou dostatečně malé. Zvýšení rozpustnosti můžeme docílit **vazbou fotosenzitizéru na určitou biomolekulu** (cukry, aminokyseliny, peptidy, steroidní hormony), podobně pak tímto způsobem lze **zlepšit aktivní či pasivní targeting (směrování), zajistit cílenější distribuci a selektivitu a**

tím zvýšit účinnost terapie. Vznikají tak sloučeniny, které nazýváme fotosenzitizéry třetí generace. Nezbytnou vlastností fotosenzitizérů je také jejich bezpečnost. V ideálním případě by se fotosenzitizér měl hromadit selektivně v nádorových buňkách, aby zamezil poškození zdravých buněk, navíc cílenější distribucí se snižuje fotosenzitivita pacientů. Většina fotosenzitizérů je však vychytávána jak nádorovými, tak zdravými buňkami. Důvodem vyšší kumulace v nádorových buňkách je především jejich vyšší schopnost dělení, slabší lymfatická drenáž nebo interakce mezi fotosenzitizérem a LDL receptory nádorových buněk^(4,8,18,22,23,24). Konjugaci fotosenzitizérů (zejména Pcs) s různými biomolekulami je věnována kapitola 3.5.

3.5. Konjugace ftalocyaninů s biomolekulami

V následujících odstavcích chci zmínit některé konjugace Pcs s biomolekulami, které tak umožní zvýšit selektivitu příjmu fotosenzitizéru určitou nádorovou tkání. Zaměřila jsem se na konjugaci Pcs s biomolekulami, jelikož má práce se zabývala právě konjugací jejich analogů s mestranolem.

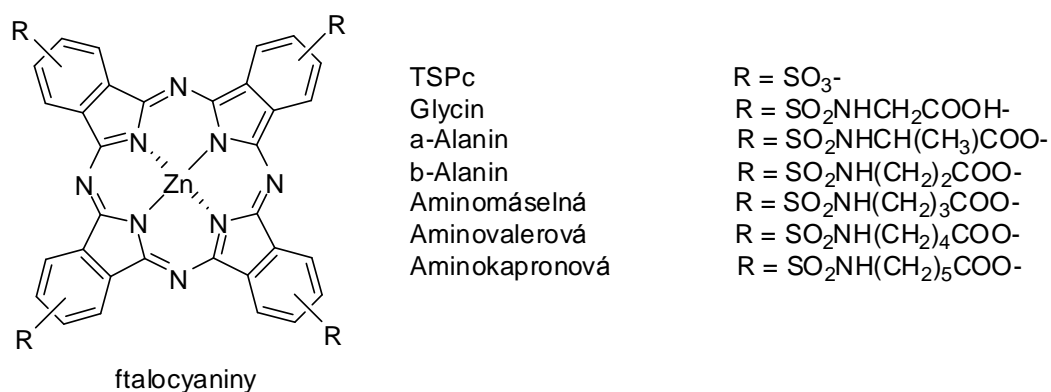
3.5.1. Konjugace s glykosidy (glykokonjugace)

Vzhledem k možnosti zlepšení membránových interakcí, zvýšení rozpustnosti ve vodě a zvýšení selektivity pro různé nádory, podléhají vývoji a výzkumu různé druhy nových konjugátů ftalocyaninů se sacharidy. Navíc různé druhy glykosidických transportérů jsou specifické pro různé monosacharidy uvnitř nádorových buněk. V praxi byly připraveny zejména sloučeniny zinečnatého komplexu ftalocyaninu se čtyřmi molekulami glukózy na periferii, což zabraňuje vlastní agregaci sloučeniny a umožňuje rozpustnost ve vodě⁽²⁵⁾. Byly připraveny i křemičité komplexy ftalocyaninu se dvěma molekulami galaktózy na periferii^(25,28). Glukóza se ze všech sacharidů jeví jako nejvhodnější, jelikož rostoucí nádorové buňky mají velkou potřebu glukózu přijímat. Prof. Hanack použil k přípravě glykokonjugovaných ftalocyaninů prekurzor získaný nukleofilní aromatickou substitucí 4-nitroftalonitrilu alkoholickou skupinou glukosy. Zbylé hydroxylové skupiny glukosy byly předem ochráněny benzylem. Produktem

cyklizace byl pak ZnPc substituovaný čtyřmi *O*-benzyl-glukózovými jednotkami, bohužel odstranění chránících skupin katalytickou hydrogenací nevedlo k syntéze požadovaného ftalocyaninu. Překvapivě cyklizací nechráněného prekurzoru s glukózou ve směsi rozpouštědel dimethylaminoethanol/*n*-butanol s octanem zinečnatým bylo dosaženo požadovaného produktu^(1,19,25,26,27,28,29). Nejoptimálnější metodou přípravy glykokonjugátů se ovšem ukázala být mědí katalyzovaná azid-alkyn 1,3-dipolární cykloadice („click chemistry“), která poskytuje vysoké výtěžky reakce za použití lehce dostupných karbohydrátových azidů. Podrobněji se o „click chemistry“ zmíním v metodické části⁽³⁰⁾.

3.5.2. Konjugace s aminokyselinami a peptidy

Konjugací hydrofilní aminokyseliny s hydrofobním ftalocyaninem vzrůstá rozpustnost ve vodě, stejně jako v předchozím případě. Vzniklé sloučeniny vykazují jak vyšší rozpustnost ve vodě, tak mnohem méně tvoří agregáty. Nevhodnou vlastností fotosenzitizerů substituovaných čtyřmi aminokyselinami je jejich malá účinnost, u ftalocyaninů konjugovaných se serinem je to pak toxicita ve tmě. Účinek zinečnatých komplexů ftalocyaninů byl porovnáván u látek substituovaných čtyřmi sulfonovými kyselinami a u derivátů vzniklých konjugací s různými aminokyselinami s lišícími se počtem CH₂ skupin (viz **Obr. 12**). Deriváty s rostoucím uhlíkovým řetězcem byly více hydrofobní a vykazovaly vyšší fototoxicitu, ale udržovaly si rozpustnost ve vodě. Nejvíce účinné tak byly sloučeniny s navázanou aminokapronovou kyselinou^(2,31,32).



Obr.12 Konjugáty ftalocyaninů se sulfonovou kyselinou a s aminokyselinami s rostoucím uhlíkovým řetězcem⁽²⁾.

3.5.3. Konjugace s epidermálním růstovým faktorem

Epidermální růstový faktor (epidermal growth factor, EGF) slouží jako vektor pro přenos ftalocyaninů selektivně k nádorovým buňkám. Byly připraveny sloučeniny hlinitého a kobaltnatého komplexu ftalocyaninu nesoucího EGF a porovnán cytotoxický účinek s odpovídajícími ftalocyaniny bez EGF na buňkách lidského karcinomu prsu. Kobaltnaté komplexy nesoucí EGF vykazovaly 4,5krát vyšší účinek než hlinité. Tyto kobaltnaté ftalocyaniny a kobaltnaté ftalocyaniny konjugované s EGF byly testovány dále i na myších, kterým byly implantovány melanomové buňky. Konjugace s EGF výrazně zvýšila dobu přežití⁽³³⁾.

3.5.4. Konjugace s oligonukleotidy

Konjugáty některých metaloftalocyaninů s deoxyribonukleotidy se dají využít při hledání změněné specifické sekvence DNA. Část oligonukleotidová je schopná rozeznávat vybrané komplementární sekvence v DNA a ftalocyaninová část může vyvolat různé modifikace DNA, ať pomocí tvorby singletového kyslíku (zinečnaté nebo hlinité komplexy) či produkcí ROS (kobaltnaté komplexy) vedoucí k následné oxidaci DNA a regulaci genové exprese⁽³⁴⁾.

3.5.5. Konjugace s monoklonálními protilátkami

Monoklonální protilátky (MAb) jsou homogenní produkty jednoho klonu lymfocytu B a jsou velmi specifické proti jednomu epitopu antigenu. Jsou využívány především k potlačení autoimunitních reakcí jako imunosupresiva, k léčbě onkologických nemocí, jako protidestičkový faktor či jako diagnostická metoda. Monoklonální protilátky jsou schopné reagovat s konkrétním antigenem, proti kterému jsou namířeny a tím vyřadit daný antigen z činnosti. Další možností je zablokování signální cesty spojené s receptorem, v případě vazby monoklonální protilátky na receptor, nebo přímo likvidace skupin buněk různými mechanismy. K likvidaci buňky,

kteřá má na svém povrchu malé množství cílových struktur, je vhodné využít monoklonální protilátky vázané na různá léčiva, toxiny či radioizotopy^(35,36). Konjugace ftalocyaninů s MAb nám umožňuje specifickou vazbu s antigeny spojených s nádory a jejich následné destrukci. Těmto metodám pojetí léčby se říká fotoimunoterapie. Původně se konjugáty připravovaly reakcí esterové skupiny ftalocyaninu s volnou aminovou skupinou na protilátkách. Tato metoda byla ovšem limitující, vzhledem k síťování polymeru a antigenu během reakce^(37,38,39). Proto byly vyvinuty fotosenzitizéry nesoucí isothiokyanátovou skupinu, která reagovala s protilátkami MAb 35A7, FSP 77 a 17.1A^(40,41). Tato metoda umožnila přímou vazbu na protilátky bez jejich předchozí úpravy a tím usnadnění přípravy a zvýšení výtěžků.

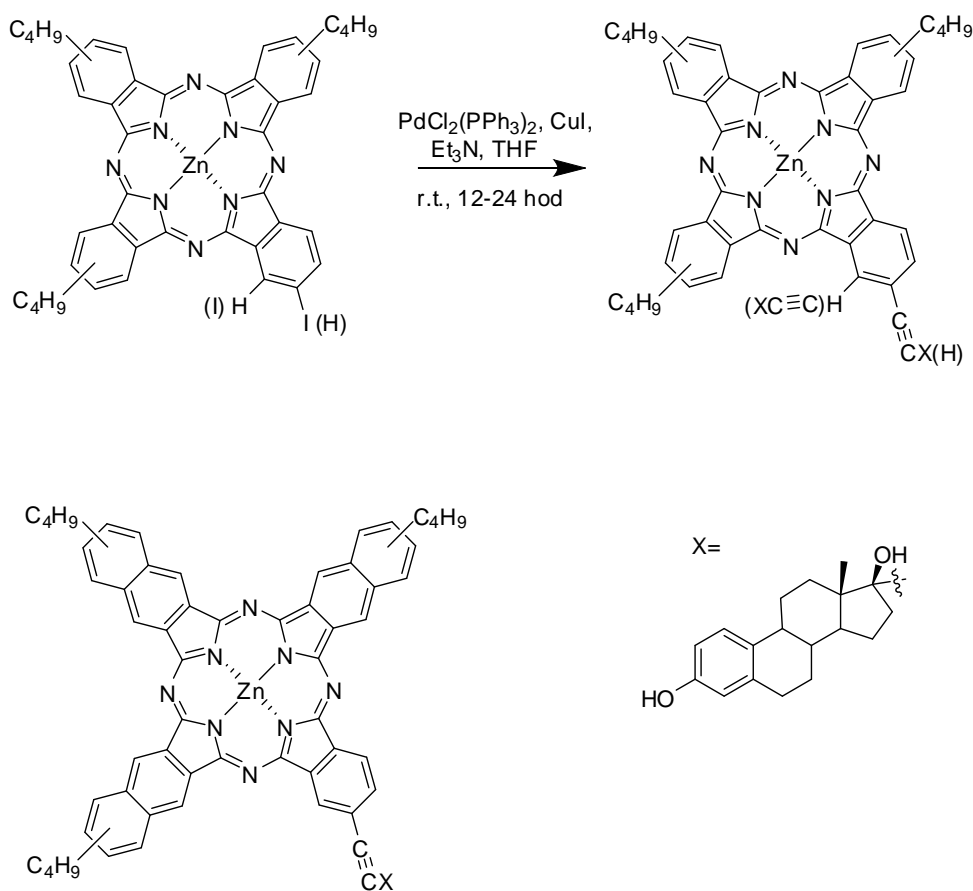
3.5.6. Konjugace s cholesterolem

Cholesterol je základem pro všechny steroidní hormony. Je nezbytně důležitý pro růst a vývoj buněk, proto je jeho příjem v nádorových buňkách velmi rychlý. Z tohoto pohledu je proto kovalentní vazba cholesterolu s fotosenzitizerem pro PDT výhodná. Navíc vazbou fotosenzitizeru, s lipofilní a objemnou molekulou cholesterolu se sníží samovolná agregace ftalocyaninů a zvýší prostupnost přes membránu. Proto byly připraveny cholesterolem mono- a disubstituované ftalocyaniny s centrálně vázaným kationtem kovu a začleněny do lipozomů⁽²⁾.

3.5.7. Konjugace s estrogy (estradiolem)

Steroidní hormony jsou hormony lipofilní povahy, odvozené od cholesterolu. Procházejí membránami buněk do cytoplasmy a váží se zde na receptory. V komplexu s receptorem pak prostupují do jádra, kde vyvolávají syntézu bílkovin. Vazbou steroidní části na molekulu ftalocyaninu se může zvýšit příjem fotosenzitizeru endokrinní nádorovou tkání bohatou na receptory. Estradiol, steroidní pohlavní hormon, je estrogen, který se vyskytuje zejména u žen, ale v malé míře i u mužů. Po navázání na molekulu ftalocyaninu má velký potenciál být vhodným selektivním léčivem pro estrogen-dependentní nádory. Připravit konjugáty ftalocyaninů s estrogy lze

nejrůznějšími metodami. Jednou z nich je konjugace za katalýzy palladiem. Prof. van Lier⁽⁴²⁾ provedl reakci jodovaného ftalocyaninu s 17 α -ethinylestradiolem popř. jeho dalšími deriváty za podmínek Sonogashirova couplingu (viz **Obr. 13**). Produkty vykazovaly silný absorpční pás okolo 680 nm až 691 nm. Obdobně byly připraveny i sloučeniny tvořené z jedné čtvrtiny částí ftalocyaninovou a ze tří čtvrtin naftalocyaninovou, které vykazují spektrální vlastnosti obou sloučenin. Například UV-vis spektrum s pásy o stejné intenzitě ve vlnových délkách 726,5 a 759,5nm. Připravené sloučeniny měly různou schopnost vázat se na estrogenní receptory. Tyto vazebné schopnosti závisely především na celkové velikosti molekuly, vazebném místě biomolekuly a lipofilitě⁽⁴²⁾. Byly připraveny i sloučeniny s estronem, oktasubstituované symetrické GePc a SnPc a axiálně disubstituované symetrické SnPc. Tyto sloučeniny netvořily agregáty díky vázaným axiálním skupinám a hodnota produkce singletového kyslíku rostla s rostoucí velikostí centrálního atomu (Si<Ge<Sn). Nejslibnější sloučeninou z hlediska využití v PDT se jevil GePc, nesoucí osm estronových zbytků, vzhledem k dlouhodobému trvání tripletního stavu^(2,43).



Obr.13 Schéma výše uváděných reakcí⁽⁴²⁾.

4. Metodická část

4.1. „Click chemistry“

„Click chemistry“ je definována jako účinná metoda pro syntézu nejrůznějších sloučenin, která zahrnuje skupinu spojovacích (linking) reakcí a která se vyznačuje vysokou selektivitou, stereospecifitou, modularitou, vysokými výtěžky, širokým spektrem působnosti a také tvorbou vedlejších produktů, které lze snadno odstranit i nechromatografickými metodami (filtrace, destilace). Reakce má být přitom snadno proveditelná, materiály a reakční činidla dobře dostupné, za použití základních rozpouštědel, navíc v případě potřeby dobře odstranitelných a produkt snadno izolovatelný⁽⁴⁴⁾.

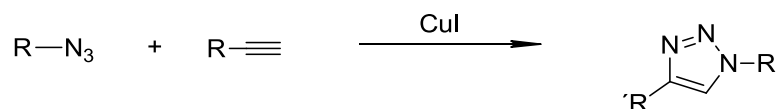
„Click chemistry“ se jeví jako metoda, která usnadňuje proces vzniku nového léčiva. Na tomto poli ovšem nesklidila zatím příliš velký zájem – pouze 14 % publikací zabývajících se „click chemistry“, vydaných mezi léty 1999 a 2007, mají vztah k výzkumu nových léčiv, přestože aplikace „click chemistry“ ve výzkumu polymerů nebo farmaceutických vědách je považována za velice zajímavou a úspěšnou. Jedním z důvodů je široké spektrum uplatnění, především výzkum transportních systémů léčiv a nanomedicíny, kde „linker chemistry“ hraje zásadní roli. Uplatnění také nachází při značení sond v biologické léčbě pro pohodlnější detekci a vyhodnocení⁽⁴⁵⁾.

Příprava výše uvedených systémů dovoluje použít jen mírné podmínky, aby se biologické struktury, s kterými se pracuje, nepoškodily, stejně tak chránění a deprotektce chránících skupin vyžaduje mírné podmínky k zamezení vzniku nežádoucích vedlejších produktů. Většina reakcí je navíc nutno provádět ve vodném prostředí. Toto jsou omezení, která se dají snadno vyřešit aplikací „click chemistry“⁽⁴⁵⁾.

4.1.1. Klasifikace click reakcí

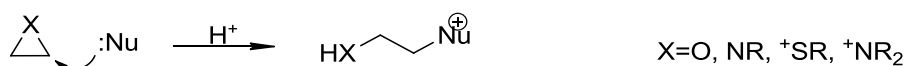
Doposud jsou známy pouze čtyři typy těchto reakcí- cykloadice, nukleofilní otevření kruhu, reakce karbonylu nealdolového typu a adice na vícenásobné vazby mezi uhlíky.

- a) Cykloadice – zahrnuje 1,3 dipolární cykloadici, které se budou věnovat hlouběji a Diels – Alderovu cykloadici (viz kapitola 4.1.2)

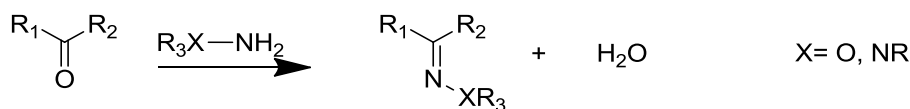


Huisgenova 1,3-dipolární cykloadice azidu a terminálního alkynu

- b) otevření kruhu pomocí nukleofilů - jedná se o otevření napjatého heterocyklického elektrofilního kruhu (akridin, epoxid, cyklické sulfáty, aj.) pomocí nukleofilu

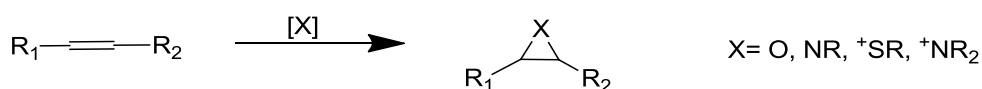


- c) reakce karbonylu nealdolového typu - reakce karbonylu aldolového typu nemohou být považovány za „click“ reakce, jelikož trvají delší dobu a poskytují i vedlejší produkty, což je pro „click chemistry“ netypické; mezi reakce nealdolového typu patří např. tvorba oximů, hydrazinů, derivátů močoviny, thiomčoviny, aromatických heterocyklů, atd.^(44,45)



tvorba oximu, hydrazinu

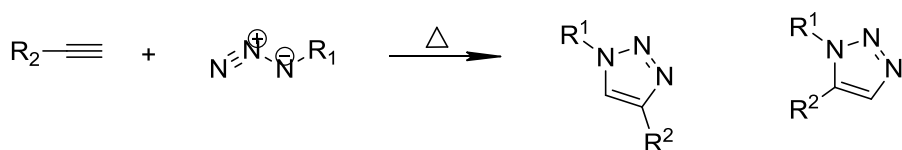
- d) adice na vícenásobné vazby mezi uhlíky – zahrnuje epoxidaci, dihydroxylaci, adici halogenidů nitrosylu a sulfenylu, Michaelovu adici, atd., za tvorby tříčlenných kruhů^(44,45,46)



Ačkoliv jsou známy čtyři typy reakcí, nejvíce používanou je právě **1,3 dipolární adice azidu na terminální alkyn podle Huisgena (1,3 azid-alkyn cykloadice), katalyzovaná měďnými kationty, za tvorby 1,2,3-triazolu**. Tato metoda našla uplatnění v mnoha oblastech výzkumu^(45,47).

4.1.2. 1,3 azid-alkyn cykloadice

Azidy a alkyny jsou sloučeniny téměř inertní pro většinu biologických a organických pochodů, jako je přítomnost kyslíku, vody a přítomnost dalších reaktivních skupin v molekule^(48,49,50). Jejich kinetická stabilita je zodpovědná za pomalý průběh nekatalyzované cykloadice, navíc vyžadující vysoké teploty. Regioselektivitu produktu v případě nekatalyzované reakce zajišťuje pouze přítomnost vysoce elektrondeficitního terminálního alkynu, ostatní alkyny poskytují směsi 1,4- a 1,5-regioisomerů (viz **Obr.14**)^(51,52,53,54,55,56).



1,4- a 1,5-substituované produkty 1:1

Obr.14 Schéma syntézy 1,4- a 1,5- regioisomerů⁽⁵⁰⁾.

Katalyzátory

Měďnými kationty katalyzovaná reakce umožňuje vytvářet regiospecificky 1,4-substituované produkty bez nutnosti zvyšovat reakční teplotu. Reakce tak může být prováděna v širokém rozmezí teplot (0 - 160 °C) a pH (5 - 12), v různých typech rozpouštědel (včetně vody). Průběh reakce je asi 10⁷ × rychlejší než bez přítomnosti katalyzátoru a produkt může být často přečištěn velmi jednoduše, a to filtrací. Azidovou a alkynovou skupinu je navíc velmi snadné zavést do molekuly a za standardních podmínek jsou tyto skupiny vysoce stabilní. Alifatické azidy, i přes svou značnou ochotu se rozkládat, zůstávají za mírných podmínek „click reakce“ stabilní, navíc dokážou být v roztoku „neviditelné“, dokud nepřistoupí do reakce nějaký dipolarofil, např. alkin. Jako katalyzátory se nejčastěji používají soli mědné, obzvláště pak CuI a soli vznikající redukcí solí měďnatých, hlavně síranu měďnatého^(49,50,57,58).

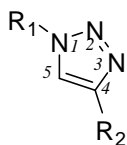
- využití měďných solí – tato metoda nevyžaduje přítomnost redukčního činidla, na druhou stranu musí být prováděna v prostředí bez přítomnosti kyslíku a v organických rozpouštědlech; používané soli jsou CuBr, CuI, [Cu(NCCH₃)₄]PF₆, aj. Přidáním vhodné báze (např. DIPEA), se dosáhne dobré selektivity bez vedlejších produktů^(49,59)

- b) redukce měďnatých solí – nejčastější používanou solí bývá $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, redukčními činidly pak sodná sůl kyseliny askorbové, hydrazin, *tris*(2-karboxyethyl)fosfin (TCEP); výhodou je možnost provádět cykloadici ve vodném prostředí, metoda je levná a nevyžaduje prostředí bez přítomnosti kyslíku; v některých případech ale mohou být měďnaté ionty redukovány až na měď, čemuž se dá předejít použitím správného poměru redukčních činidel a katalyzátoru anebo přidáním mědi-stabilizujícího činidla *tris*(hydroxypropyltriazolylmethyl)aminu (THPTA)^(50,59,60,61)
- c) oxidace mědi za využití aminové soli – tento způsob je finančně náročný a má mnoho nevýhod, zejména delší dobu trvání reakce, větší spotřebu mědi, vyžaduje mírně kyselé prostředí k rozpuštění kovu, což může působit negativně na funkční skupiny citlivé vůči kyselosti⁽⁵⁰⁾
- d) měďnými kationty modifikované zeolity – zeolity jsou krystalické hydratované hlinitokřemičitany alkalických kovů a kovů alkalických zemin; jsou velmi porézní. V kanálcích mohou zachytávat látky různého skupenství, čehož se využívá v iontové výměnných procesech. Mají též velký povrch a velký počet aktivních kyselinových míst, jsou vysoce selektivní a vykazují tepelnou stabilitu^(62,63,64)

Další výzkumy se snažily najít alternativu k používání mědi jako katalyzátoru (NiCl_2 , PtCl_2 , PdCl_2 , pentamethyl cyklopentadienyl ruthennatý komplex, aj.), ovšem žádný jiný katalyzátor nebyl tak účinný^(65,66).

1,2,3 - triazoly

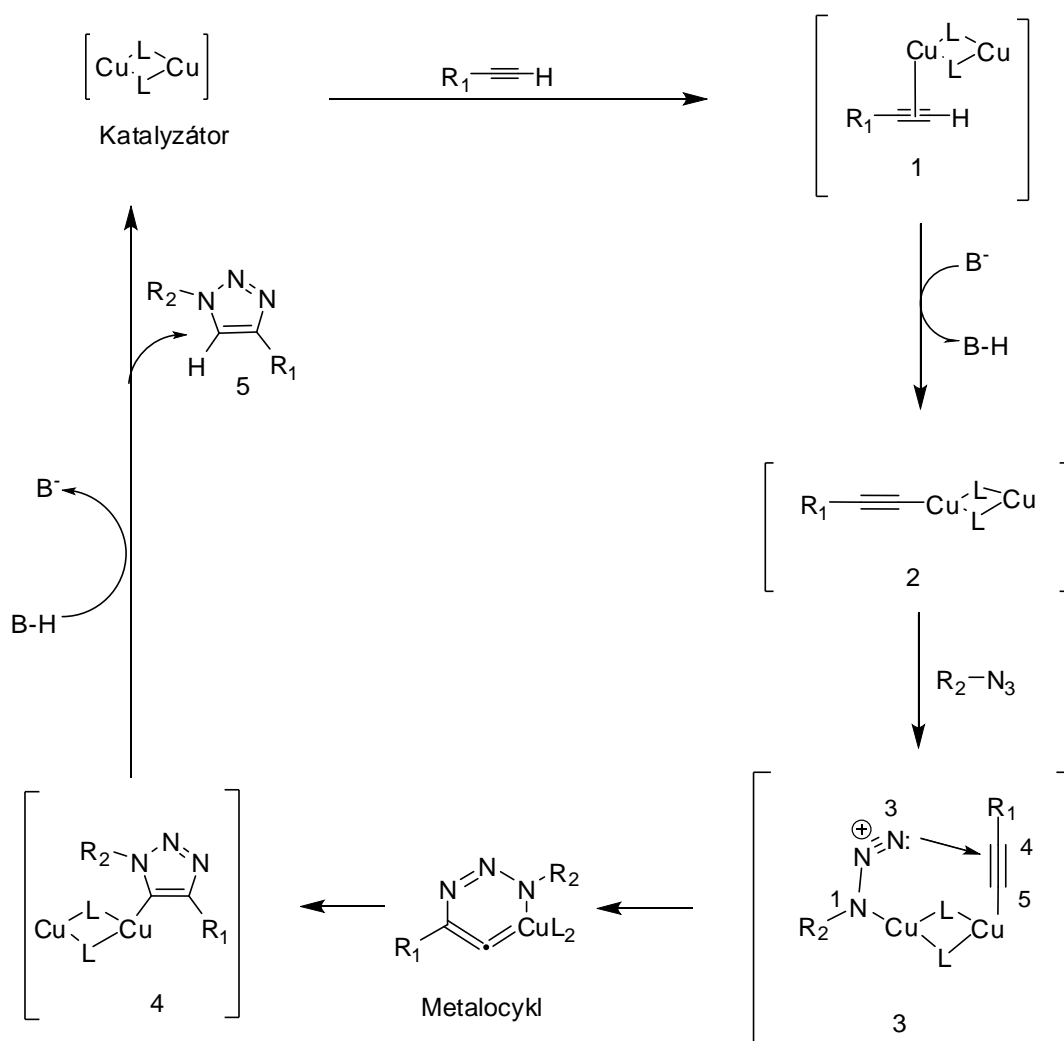
Další zajímavostí je chování vzniklých 1,2,3-triazolů (viz **Obr.15**), které mají schopnost napodobit rozmístění atomů a elektronové vlastnosti jako peptidické vazby, avšak nepodléhají hydrolytickému štěpení. Navíc jsou vysoce chemicky stabilní vůči oxidačním a redukčním reakcím i za vysokých teplot. Oba dusíkové atomy $N(2)$ a $N(3)$ pak vystupují jako akceptory vodíkových vazeb a silný dipólový moment je schopen polarizovat uhlíkový atom $C(5)$ do té míry, že může vystupovat jako donor vodíkové vazby, podobně jako amidový proton^(67,68). Vyznačují se též různorodou biologickou aktivitou (selektivní inhibice β_3 -adrenergních receptorů, antibakteriální aktivita, aktivita proti HIV, velmi silná antihistaminová aktivita, aj.^(69, 70, 71, 72,73)).



Obr.15 Struktura 1,2,3- triazolu.

4.1.3. Mechanismus cykloadice

Prvním krokem 1,3 azid-alkyn cykloadice je začlenění měďného dimeru do alkynu (tvorba π komplexu) (viz **Obr.16**, meziprodukt 1). Následuje tvorba Cu-acetylidu deprotonací terminálního vodíku (meziprodukt 2). Tvorbou π komplexu se snižuje pK_a terminálního alkynu natolik, že deprotonace může probíhat ve vodném prostředí, bez nutnosti přidávat bázi. Pokud je ovšem cykloadice prováděna v aprotickém prostředí (acetonitril), je potřeba přidat bázi, např. *N,N'*-diisopropylethylamin (DIPEA) ^(49,50,57,,74,75). Ke vzniklému Cu-acetylidu přistupuje azid, který se na něj naváže dusíkem *N*(1) za vzniku nového komplexu (meziprodukt 3), což aktivuje azid k nukleofilnímu ataku na uhlík alkynu. Díky blízkosti a elektronovým vlivům může nyní reagovat *N*(3) azidu s uhlíkem *C*(4) alkynu a vytvořit nestabilní šestičlenný metalocykl. Volný elektronový pár dusíku *N*(1) azidu následně atakuje *C*(5) alkynu a vznikne tak příslušný triazol (meziprodukt 4). Finálním krokem je protonace triazolu (produkt 5) za odstoupení měďného katalyzátoru, který pak může být využit při další cykloadici s jinými substráty ⁽⁵⁰⁾. Vznik Cu-acetylidu je exotermní reakce, tvorba meziproduktu 3 je pak téměř termoneutrální. Klíčovým krokem celé cykloadice je však následující endotermická reakce vedoucí ke vzniku metalocyklu, přesmyk vedoucí k triazolu je pak již opět méně energeticky náročný ⁽⁷⁶⁾.



Obr.16 Schéma mědnými ionty katalyzované 1,3-azid-alkyn cykloadice⁽⁴⁵⁾.

4.1.4. Aplikace „click chemistry“ ve farmaceutických vědách

„Click chemistry“ je metoda původně vyvinutá k usnadnění objevu nových léčiv. V dnešní době má ovšem široké uplatnění. Příkladem může být mikroelektronické označování virů, chemie polymerů (polymerní terapeutika je hlavní místo aplikace „click chemistry“), nanočásticový transportní systém nebo léčba rakoviny. V následující části mé práce bych ráda ve stručnosti zmínila některé z nich.

Polymerní terapeutika

Hlavní myšlenkou polymerních terapeutik je zkombinovat cílený transport léčiv a řízené uvolňování využitím syntetických polymerů. Syntetické polymery jsou přitom kovalentně vázané s účinnou látkou pomocí spojky (linkeru), který se dá snadno štěpit v cílové tkáni. Významné uplatnění nachází polymerní terapeutika u cytostatik. Zejména v této oblasti je nutný cílený transport a snížená nespecifická cytotoxicita. Směrování cytostatik do nádorové tkáně je řízeno tzv. EPR efektem (Enhanced Permeability and Retention, zvýšená propustnost a zadržení). Nádorové buňky mají díky svému rychlému růstu mnohem větší spotřebu živin a kyslíku. Díky tomu dochází k mohutné neoangiogenezi v nádorové tkáni a větší propustnosti makromolekul, vzhledem k ještě nedokonale vyvinutým cévním stěnám. Lymfatický systém, který by odváděl nadbytečné množství makromolekul, zpravidla chybí a v nádorové tkáni tak dochází k nadměrnému hromadění makromolekul (pasivní targeting, neboli směrování). Hlavními látkami v polymerní terapeutice se staly velmi dobře rozpustné blokové kopolymery. „Click chemistry“ přitom usnadňuje syntézu a následné čištění, zejména jsou vhodné pro reaktivní polymery nebo polymery s rozdílnou rozpustností, které nelze spojit jiným způsobem. Lze tak vytvořit kopolymery z odlišných polymerů se specifickými vlastnostmi velmi snadno a rychle. Blokové kopolymery se pak využívají jako transportní systémy pro různá léčiva a to ve formě polymerních micel, lineárních multifunkčních transportních systémů (*N*-(2-hydroxypropyl)metakrylamid, HPMA), aj. (45,77).

Nanočásticový transportní systém

Výzkum v této oblasti se zaměřuje na micely, lipozómy, nanočástice zlata, magnetické nanočástice, aj. Používají se k označování protilátek, směrování polynukleotidů, jako transportní systémy pro nejrůznější léčiva, k diagnostice rakovinotvorných buněk, atd. Nanočástice zahrnují částice o velikosti 10 až 1000 nm, což umožňuje průnik přes perforovaný cévní systém a nahromadění na cílových místech, navíc s použitím mnohem menších dávek, za minimálních vedlejších efektů, zvýšenou stabilitou léčiv a s ochranou léčiva proti degradaci^(78,79,80). „Click chemistry“ se zde uplatňuje při modifikacích povrchu, což má vliv na různé vlastnosti těchto nosičů (hydrofobicita, úprava Zeta potenciálu nanočástic, schopnost směrování)⁽⁸⁰⁾.

Biokonjugace

Častá aplikace „click chemistry“ při biokonjugaci vyplývá z vlastností 1,2,3-triazolů. Jak již bylo výše uvedeno, tyto spojky (linkery) jsou výborně rozpustné ve vodě a dovolují tak velice snadnou *in vivo* aplikaci, dále jejich elektronické vlastnosti jsou velice podobné amidickým vazbám, avšak nepodléhají tak snadno hydrolýze, jsou stabilní v biologických prostředích; rigidní, tudíž látky spojené linkerem spolu neinteragují, jako by tomu bylo, pokud by linker byl flexibilní. Azidové a alkynylové skupiny jsou navíc nereaktivní s mnohými funkčními skupinami, proto biokonjugace probíhá pouze na požadovaných místech a nedochází tak k vedlejším reakcím. A konečně při reakcích nehraje roli objemnost molekuly, „click chemistry“ podléhá primární, sekundární, terciární i aromatické azidy, což je důležité především pro častou sterickou mohutnost biomolekul. Biokonjugace se používá např. při označování molekul radioaktivními značkami, označování *E.coli*, označování CPMV (cowpea mosaic virus; virus mozaiky vigny), značení DNA, nebo biokonjugaci polysacharidů a jiných biomolekul^(45,46,50).

4.1.5. Úskalí „click chemistry“

„Click chemistry“ není dokonalou metodou, jak by se mohlo zdát. Nyní bych chtěla zdůraznit některé nevýhody a úskalí, se kterými se při provádění reakcí můžeme setkat. Jedním z nich je případ, kdy dien (azid) je příliš elektronově deficitní a nepodléhá reakci, jelikož jeho energie v základním stavu je příliš malá na interakci s dienofilem (alkynem). Stejně tak nemůže být dienofil příliš elektronově bohatý. Většina biologických systémů a léčiv takovéto uspořádání funkčních skupin nemá, a proto je tato situace nepravděpodobná.⁽⁴⁵⁾

Někdy může dojít k homocouplingu alkynů, pokud první alkyne reaguje s druhým namísto reakce s azidem. Homocoupling může nastat za různých podmínek, v přítomnosti katalyzátorů měďných i měďnatých. Většinou však toto může být minimalizováno použitím stericky objemné báze. Pro průběh „click“ reakce je potřeba, aby komplex Cu-acetylid byl v přímém styku s azidem. Pokud je komplex těsně obklopen terminálními alkyny, může se stát, že dojde k chelataci alkynu s Cu-

acetylidovým komplexem a tím dojde k „nasyčení“ katalyzátoru. Tento proces zabráňuje vazbě jakékoliv funkční azidové skupiny na komplex.⁽⁴⁵⁾

Dalším limitujícím faktorem metody se ukázala být stabilita některých azidů. Pokud totiž je množství dusíkových atomů stejné nebo vyšší než počet uhlíkových atomů, může takováto molekula být explozivní. Například azidy kovů se často používají jako roznětky, methylazid se také rozkládá a je výbušný. Proto manipulace vyžaduje pozvolný přísun energie (tlak, teplota). Použití mědi jako katalyzátoru může být pro lidské tělo nebezpečné, jelikož nadměrné použití mědi by mohlo vést k různým onemocněním (hepatitida, ledvinná onemocnění, Alzheimerova choroba, aj.), proto je nezbytné katalyzátor po použití dokonale odstranit. Problémem se zdá být i nedostatečná znalost biokompatibility triazolů a z toho vyplývající toxicity, i přes to, že se pečlivě zkoumá. V poslední řadě chci zmínit fakt, že ani produkty „click reakcí“, ani jejich „stavební jednotky“ nejsou ještě komerčně dostupné a z toho vyplývá nutnost farmaceutů a chemiků syntetizovat si je sami. Avšak „click chemistry“ je stále mladá a progresivní metoda, čteně zkoumaná a proto je nasnadě, že bude časem k dispozici více informací a řešení výše uvedených nedostatků, stejně tak jako vyšší dostupnost výchozích sloučenin⁽⁴⁵⁾.

5. Experimentální část

Teploty tání byly stanoveny na digitálním přístroji pro stanovování teplot tání ELECTROTHERMAL IA9200 a jsou nekorigovány. Průběh reakcí a čistota produktů a meziproductů byly kontrolovány tenkovrstvou chromatografií na deskách Merck Silikagel 60 F254. Detekce byla prováděna světlem vlnové délky 254 nm a 366 nm. Vytvářecí soustavy jsou uvedeny u jednotlivých reakcí. Sloupcová chromatografie byla prováděna na silikagelu Merck Kieselgel 60 (0,040-0,063 mm).

Infračervená spektra byla měřena IR spektrofotometrem Nicolet 6700 (v ATR módu) na KAOCH FaF UK v Hradci Králové, popř. IR spektrofotometrem Nicolet 400 (KBr). Vlnočty jsou uvedeny v cm^{-1} .

Elementární analýza byla měřena na přístroji Automatic Microanalyser EA1110CE (Fisons Instruments S.p.A., Milano, Italy) na KFCHKL FaF UK v Hradci Králové.

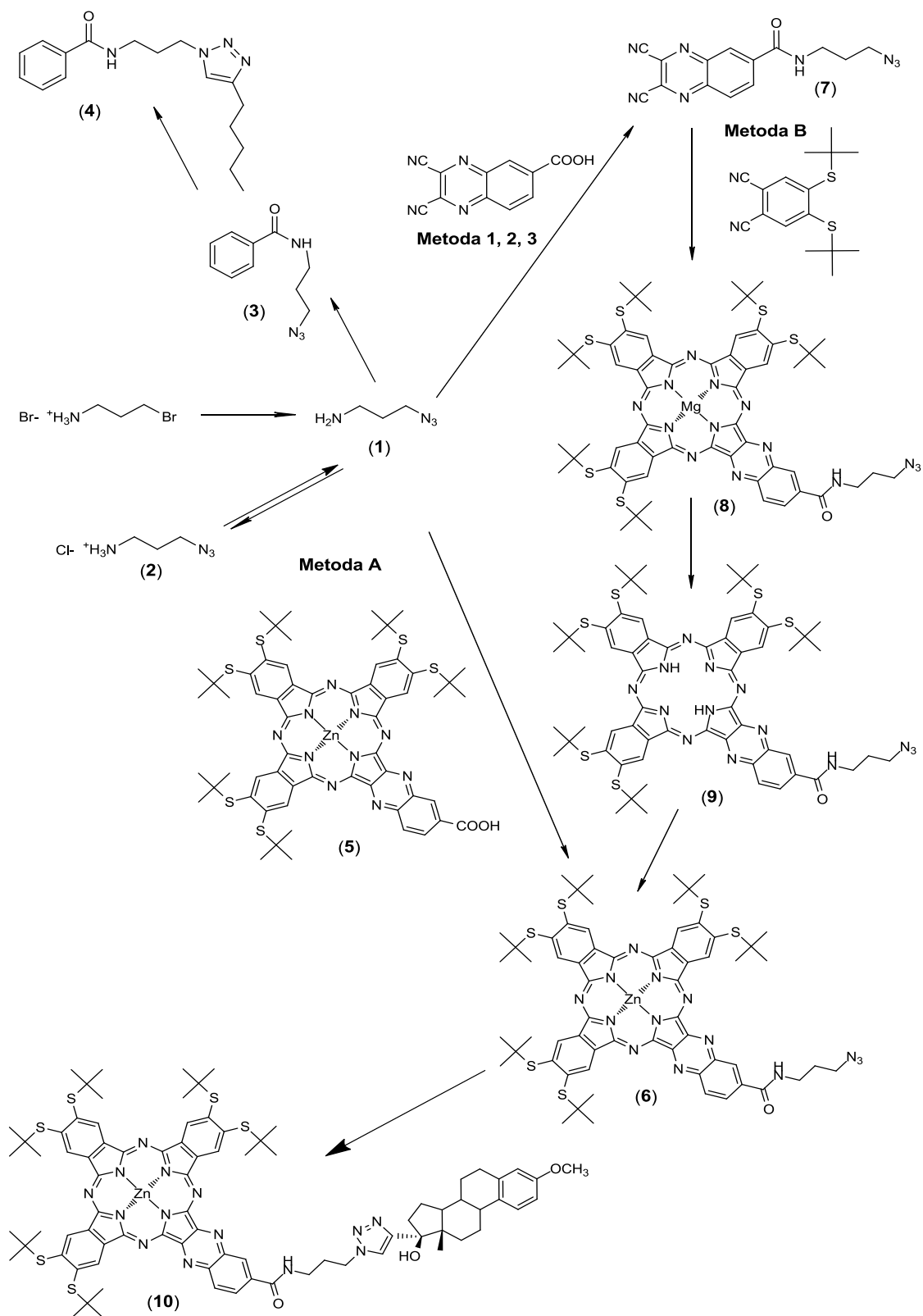
NMR spektra byla měřena na přístroji VARIAN MERCURY VxBB 300 na KAOCH FaF UK v Hradci Králové. Měření bylo prováděno při frekvenci 299.95 MHz (^1H NMR) a 75.43 (^{13}C NMR). Posuny jsou vztaženy k $\text{Si}(\text{CH}_3)_4$.

Spektrum ve viditelné oblasti bylo změřeno na přístroji SHIMADZU UV 240 1 PC: UV-VIS recording spectrophotometer (Shimadzu Europa, GmbH, Duisburg, Germany)

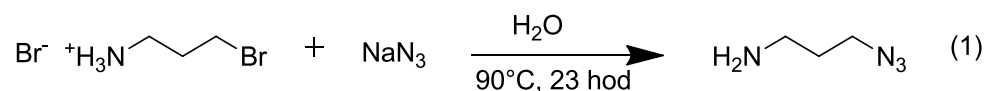
Hmotnostní spektra (MALDI-TOF) byla měřena na přístroji Voyager-DE STR mass spectrometer (Applied Biosystems, Framingham, MA, USA). Přístroj byl kalibrován externě 5-ti bodovou kalibrační metodou pomocí Peptide Calibration Mix1 (LaserBio Labs, Sophia-Antipolis, France). Roztok měřeného vzorku v dichlormethanu nebo pyridinu (přibližně 10 μM , 1.5 μl) byl smíchán s matricí (*trans*-2-[3-(4-*tert*-butylfenyl)-2-metyl-2-propenyliden]-malononitril) v dichlormethanu a nanesen na destičku.

2,3-dikyanochinoxalin-6-karboxylová kyselina, 4,5-bis(*tert*-butylsulfanyl)ftalonitril a ftalocyanin **5** byly připraveny v naší laboratoři dříve dle publikovaných postupů⁽⁸¹⁾. Mestranol a hydrobromid 3-brompropylaminu byly zakoupeny od firmy Acros.

5.1. Schéma prováděných reakcí



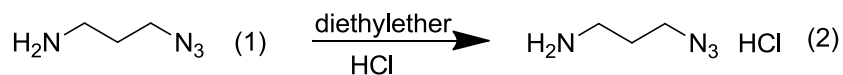
5.1.1. Příprava 3-azidopropylaminu (1)



Hydrobromid 3-brompropylaminu (5 g, 0,023 mol) byl rozpuštěn v 10 ml vody, přidán azid sodný (4,5 g, 0,069 mol) rozpuštěný v 15 ml vody a reakční směs byla pod zpětným chladičem zahřívána při teplotě 90 °C. Po 23 hodinách zahřívání se k ochlazené směsi přidal hydroxid draselný (10 g) a postupně bylo toto množství zvyšováno, dokud se neoddělily 2 vrstvy. Organická fáze byla následně několikrát vytřepána do diethyletheru. Vodná fáze byla oddělena od organické a spojené etherové výtřepky se vysušily bezvodým síranem sodným a přefiltrovaly. Filtrát byl odpařen do sucha na vakuové rotační odparce.

Výtěžek 1,74 g žlutého oleje (35 %).

Připravená látka **1** byla uchovávána jako hydrochlorid (**2**):



3-azidopropylamin **1** (1,74 g, 0,02 mol) byl rozpuštěn v diethyletheru (20 ml) a probublán plynným chlorovodíkem vyvíjeným pomocí chloridu sodného a kyseliny sírové. Hydrochlorid 3-azidopropylaminu **2** (1,2 g, tj. 69 % teoretického výtěžku, bílá pevná látka) byl poté uchováván v diethyletheru při teplotě 10 °C do dalšího zpracování.

^1H NMR (CD_3OD) δ 1,93 (2 H, p, $J=7$ Hz, CH_2), 3,02 (2 H, t, $J=7$ Hz, CH_2N_3), 3,50 ppm (2 H, t, $J=6$ Hz, NH_3CH_2).

^{13}C NMR (CD_3OD) δ 38,52; 38,43; 27,84ppm.

Pro porovnání bylo změřeno i NMR spektrum výchozího hydrobromidu 3-brompropylaminu:

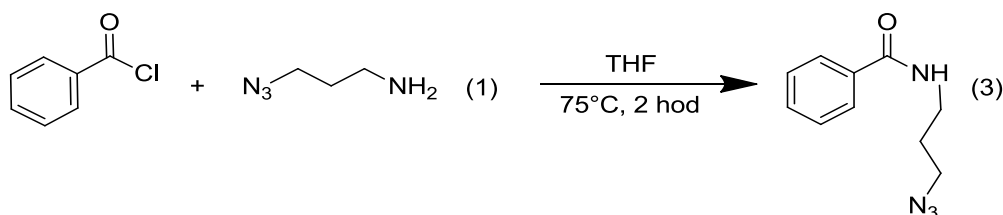
^1H NMR (CD_3OD) δ 2,23 (2 H, p, $J=7$ Hz, CH_2), 3,11 (2 H, t, $J=7$ Hz, CH_2Br), 3,56 ppm (2 H, t, $J=6$ Hz, NH_3CH_2).

^{13}C NMR (CD_3OD) δ 38,52; 38,43; 27,84ppm.

V čas potřeby byla sloučenina 2 převedena zpět na volnou bazi 1:

Hydrochlorid 3-azidopropylaminu 2 v diethyletheru byl dekantován, promyt diethyletherem a rozpuštěn ve vodě. K roztoku se poté přidával hydroxid draselný do opětovného oddělení dvou vrstev. Organická fáze se vytřepala do diethyletheru, a spojené etherové výtřepky byly vysušeny bezvodým síranem sodným, přefiltrovány a rozpouštědlo bylo odpařeno pomocí vakuové rotační odparky.

5.1.2. Příprava *N*-(3-azidopropyl)benzamidů (3)



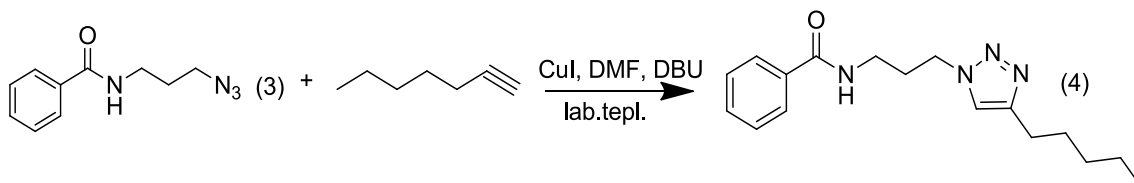
Amin 1 (1,2 g, 0,0139 mol) byl rozpuštěn v bezvodém tetrahydrofuranu, přidán chlorid kyseliny benzoové (0,653 g, 0,0046 mol) a roztok byl zahříván pod zpětným chladičem při 75 °C. Průběh reakce byl sledován pomocí tenkovrstvé chromatografie s mobilní fází hexan/ ethyl-acetát/ kyselina octová 8:3:0,1.

Reakce byla ukončena po dvou hodinách a rozpouštědla se odpařila. Směs byla vytřepána do směsi ethyl-acetát/ okyselená voda, organická fáze byla oddělena a vysušena bezvodým síranem sodným, přefiltrována a rozpouštědla byla odpařena pomocí vakuové rotační odparky. Výtěžek 0,75 g nažloutlého oleje (tj. 80 % teoretického výtěžku)

^1H NMR (CDCl_3) δ 1,88 (2 H, p, $J=7$ Hz, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$); 3,40 (2 H, t, $J=7$ Hz, CH_2N_3); 3,51 (2 H, q, $J=7$ Hz, NHCH_2); 6,72 (1 H, br s, NH); 7,37-7,43 (2 H, m, aromH); 7,45-7,51 (1 H, m, aromH); 7,74-7,79 ppm (2 H, m, arom H).

^{13}C NMR (CDCl_3) δ 167,7; 134,3; 131,4; 128,5; 126,8; 49,5; 37,7; 28,7 ppm.

5.1.3. Příprava *N*-[3-(4-pentyl-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)propyl] benzamidu (4)



Jodid měďný (0,266 g, 1,4 mmol) se vnesl do baňky a baňka byla naplněna argonem. V další baňce byl smísen *N*-(3-azidopropyl)benzamid **3** (0,570 g, 2,8 mmol) s bezvodým dimethylformamidem (6 ml) a přidán hept-1-yn (0,403g, 4,2 mmol) a DBU (0,213 g, 1,4 mmol). Tento roztok se nechal cca 20 – 30 min probublávat argonem k odstranění rozpuštěného kyslíku. Roztok se poté přidal stříkačkou pod argonem do baňky s jodidem měďným a nechal míchat při pokojové teplotě. Jodid měďný se nerozpustil, a tak bylo přidáno dalších 0,102 g DBU (1,4 mmol). Suspenze se okamžitě změnila v čirý žlutý roztok. Podle provedené tenkovrstvé chromatografie s ethyl-acetátem jako mobilní fází, bylo zjištěno, že reakce proběhla okamžitě. Dimethylformamid byl odpařen a produkt vytřepán několikrát do směsi ethyl-acetát / okyselená voda. Organická fáze byla oddělena a vysušena bezvodým síranem sodným, přefiltrována a odpařena na vakuové rotační odparce. Vzniklý produkt byl poté přečištěn pomocí sloupcové chromatografie s automatickým sběračem frakcí na přístroji CombiFlashRf. Jako mobilní fáze byl zvolen ethyl-acetát, při průtoku 20 ml/min, množství použitého silikagelu bylo 80 g, vlnová délka pro detekci 273 nm. Frakce s produktem byly spojeny a rozpouštědlo bylo odpařeno na vakuové rotační odparce.

Výtěžek činil 0,6604 g bílé krystalické látky (tj. 79 %) teoretického výtěžku

$T_f = 85,8 - 86,7$ °C

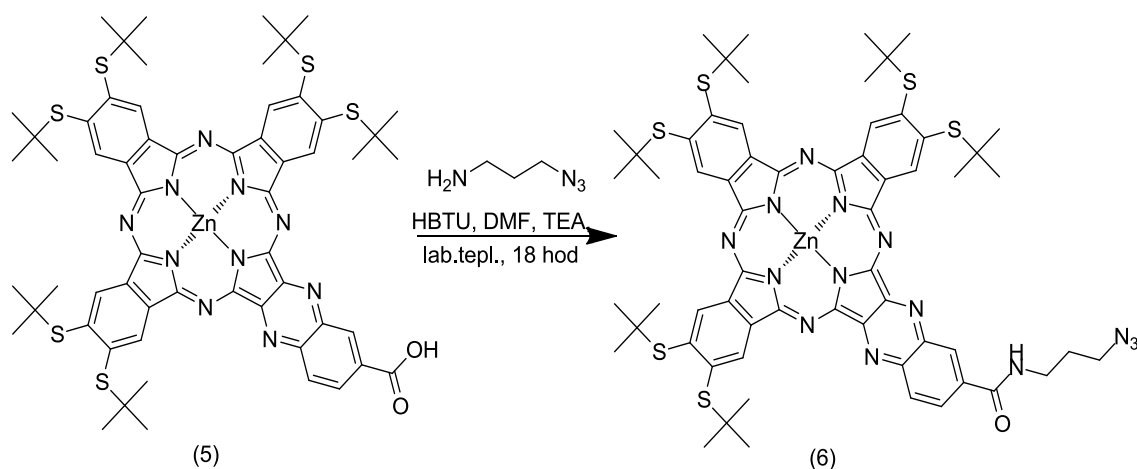
Elementární analýza - nalezeno: C, 67,74; H, 8,36; N, 19,13. Vypočteno pro $\text{C}_{17}\text{H}_{24}\text{N}_4\text{O}$: C, 67,97; H, 8,05; N, 18,65 %.

IČ (KBr) ν_{\max} 3354, 3121, 3067, 3027, 2954, 2928, 2871, 2856, 1737, 1633, 1601, 1577, 1539, 1488, 1456, 1374, 1336, 1307, 1260, 1214, 1185, 1153, 1088, 1057, a 890 cm^{-1} .

^1H NMR ($(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) δ 0,87 (2H, t, $J=7$ Hz, CH_3), 1,29-1,35 (4H, m, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 1,62 (2H, p, $J=7$ Hz, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 2,18 (2H, p, $J=7$ Hz, $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 2,62 (2H, t, $J=8$ Hz, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 3,44 (2H, q, $J=6$ Hz, $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 4,45 (2H, t, $J=7$ Hz, $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 7,41-7,53 (3H, m, aromH), 7,75 (1H, s, triazolH), 7,87-7,90 ppm (2H, m, aromH).

^{13}C NMR ($(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) δ 14,2; 23,0; 26,2; 29,9; 31,2; 32,1; 37,7; 48,2; 122,1; 127,9; 129,1; 131,9; 135,8; 148,2 a 167,5 ppm.

5.1.4. Příprava ftalocyaninu (6) Metoda A :

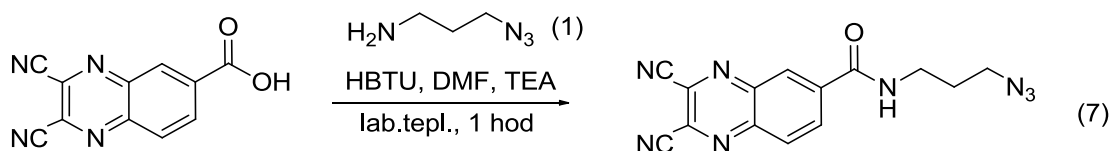


Sloučenina **5** (0,020 g, 16,6 μmol) byla rozpuštěna v bezvodém dimethylformamidu (5 ml), následně byl přidán aktivátor HBTU (0,0126 g, 33,2 μmol) a směs byla 10 minut míchána při pokojové teplotě. Po 10 minutách se přidala triethylamin (0,017 g, 0,17 mmol) a 3-azidopropylamin **1** (0,180 g, 0,17 mmol). Průběh reakce byl sledován pomocí tenkovrstvé chromatografie s mobilní fází chloroform/ aceton/ methanol 20:1:1. Reakce byla ukončena po 18 hodinách, reakční směs byla zahuštěna pomocí vakuové rotační odparky a byla přidána voda (30 ml). Vysrážený produkt byl odfiltrován a vysušen. Dle TLC reakce probíhala kvantitativně. Produktem byla zelená pevná látka.

m/z (MALDI-TOF) 1282 $[M]^+$, 1305 $[M+Na]^+$ a 1321 $[M+K]^+$

Příprava *N*-(3-azidopropyl)-2,3-dikyanchinoxalin-6-karboxamidu (7)

Metoda 1: pomocí HBTU



2,3-dikyanchinoxalin-6-karboxylová kyselina (0,103 g, 0,46 mmol) byla smíchána s HBTU (0,356 g, 0,92 mmol), rozpuštěna v bezvodém dimethylformamidu a směs byla míchána při pokojové teplotě asi 10 minut. Poté byl přidán triethylamin (0,451 g, 4,6 mmol) a 3-azidopropylamin **1** (0,137 g, 1,38 mmol) rozpuštěný v bezvodém dimethylformamidu (3 ml) a reakční směs byla opět asi 15 minut míchána při pokojové teplotě. Průběh reakce byl sledován pomocí tenkovrstvé chromatografie s mobilní fází dichlormethan/ethyl-acetát/ kyselina octová 5:2:0,2. Reakce byla ukončena po 1 hodině. Směs byla zahusťována pomocí vakuové rotační odparky a byla přidána voda (30 ml). Vysrážený produkt byl odfiltrován, ponechán vysušit a následně přečištěn pomocí sloupcové chromatografie s mobilní fází dichlormethan/ethyl-acetát 5:1. Výtěžek činil 0,025 g, bílé krystalické látky, tj. 24 % teoretického výtěžku.

T.t.=139,3-139,9 °C

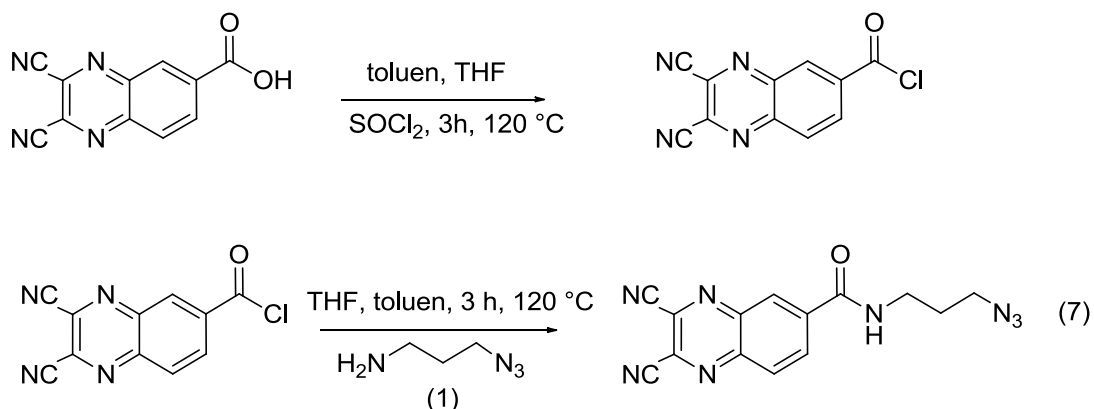
Elementární analýza - nalezeno: C, 54,76; H, 3,53; N, 36,53. Vypočteno pro $C_{14}H_{10}N_8O$: C, 54,90; H, 3,29; N, 36,59 %

ÍČ (KBr) ν_{\max} 3294, 3082, 2953, 2875, 2108, 1736, 1640, 1609, 1552, 1509, 1500, 1481, 1453, 1428, 1400, 1382, 1352, 1325, 1287, 1249, 1230, 1188, 1134, 1106, 1055, 1014, 986, 958, 914, 856, 820 a 760 cm^{-1} .

^1H NMR ($(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) δ 1,96 (2 H, p, $J=6,8$ Hz, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$); 3,53 (2 H, t, $J=6,8$ Hz, CH_2N_3); 3,59 (2 H, q, $J=6,4$ Hz, NHCH_2); 8,38 (1 H, dd, $J_1=9$ Hz, $J_2=0,5$ Hz, aromH); 8,63 (1 H, dd, $J_1=9$ Hz, $J_2=2$ Hz, aromH); 8,73 ppm (1 H, dd, $J_1=2$ Hz, $J_2=0,5$ Hz, arom H);

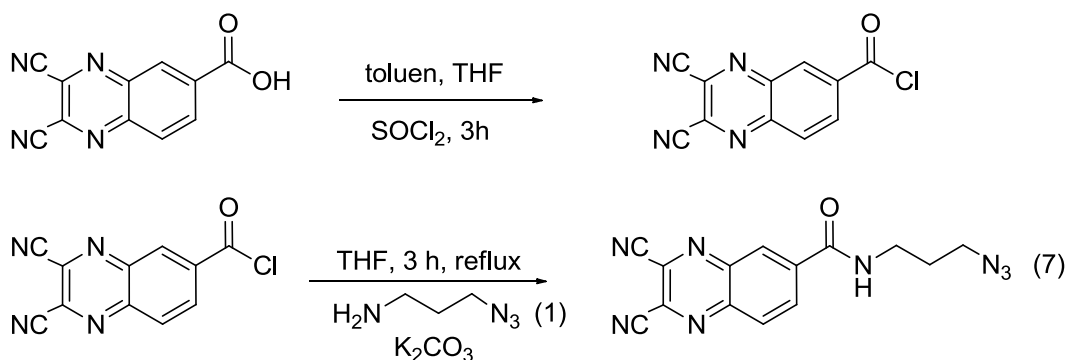
^{13}C NMR ($(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) δ 165,3; 143,2; 141,98; 141,3; 134,4; 133,3; 133,1; 130,8; 129,0; 114,9; 49,7; 38,3; 29,4 ppm.

Metoda 2: přes chlorid kyseliny



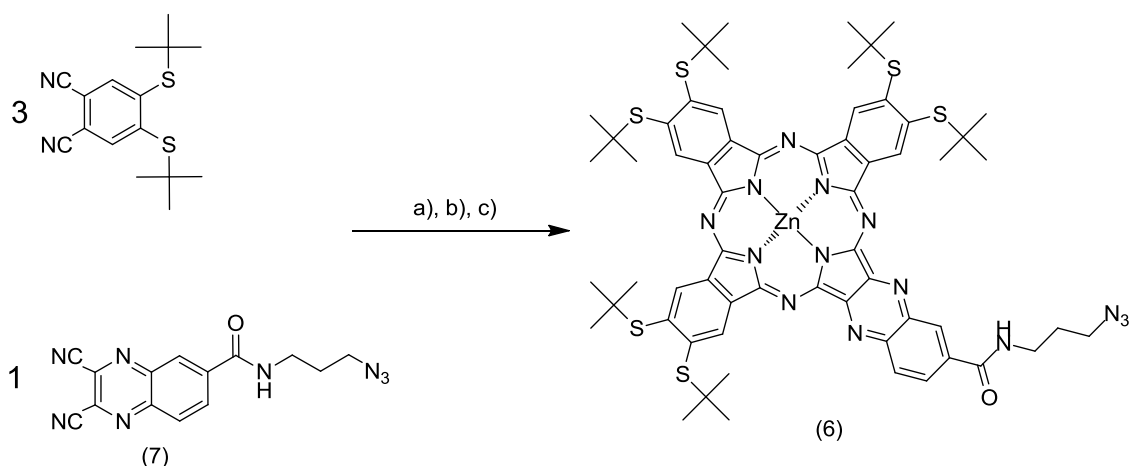
2,3-dikyanochinoxalin-6-karboxylová kyselina (0,9 g, 4,01 mmol) byla rozpuštěna v bezvodém tetrahydrofuranu (20 ml) a byl přidán bezvodý toluen (15 ml) a SOCl_2 (4,8 g, 40,1 mmol). Roztok byl zahříván 3 hodiny při 120°C a SOCl_2 , tetrahydrofuran a toluen byly poté odpařeny na vakuové rotační odparce. Vznikl tmavě hnědý olej, který byl rozpuštěn v bezvodém toluenu (15 ml) a bezvodém tetrahydrofuranu (15 ml), a byl k němu přikapáván 3-azidopropylamin **1** (1,2 g, 12,04 mmol). Reakce probíhala bouřlivě, uvolňovaly se našedlé páry štiplavého zápachu, vznikala hnědá sraženina. Následně byla reakční směs zahřívána pod zpětným chladičem při teplotě 120°C další 3 hodiny. Rozpouštědla byla odpařena pomocí vakuové rotační odparky a zbytek vytřepán do směsi ethyl-acetát/voda. Organická vrstva byla oddělena a vysušena pomocí bezvodého Na_2SO_4 , přefiltrována a rozpouštědlo odpařeno pomocí vakuové rotační odparky. Vzniklý hnědý olej byl dále přečištěn pomocí sloupcové chromatografie s mobilní fází dichlormethan/ethyl-acetát 5:1. Výtěžek činil 0,220 g hnědé látky (21%). Pomocí tenkovrstvé chromatografie s mobilní fází dichlormethan/ethyl-acetát 5:1 byla i po sloupcové chromatografii zjištěna přítomnost nečistot.

Metoda 3: přes chlorid kyseliny s přidavkem K_2CO_3



2,3-dikyanchinoxalin-6-karboxylová kyselina (0,84 g, 3,7 mmol) byla rozpuštěna v bezvodém tetrahydrofuranu (20 ml) a byl přidán bezvodý toluen (15 ml) a $SOCl_2$ (4,46 g, 37,5 mmol). Směs byla zahřívána 3 hodiny při 90 °C, poté byly $SOCl_2$, tetrahydrofuran a toluen odpařeny na vakuové rotační odparce. Následně byl přidán bezvodý toluen, vše probíhalo v bezvodém prostředí v argonové atmosféře. K roztoku byl přidán jemně upráškovaný bezvodý K_2CO_3 (0,27 g, 3,74 mmol) a přikapán 3-azidopropylamin **1** (1,13 g, 5,55 mmol) v bezvodém tetrahydrofuranu (10 ml). Reakční směs byla pod zpětným chladičem zahřívána další 3 hodiny při teplotě 90 °C. Po 3 hodinách se směs odpařila do sucha pomocí vakuové rotační odparky a vytřepala do směsi ethyl-acetát/voda. Organická vrstva byla vysušena pomocí bezvodého Na_2SO_4 a rozpouštědla odpařena pomocí vakuové rotační odparky. Produkt byl přečištěn pomocí sloupcové chromatografie s mobilní fází dichlormethan/ethyl-acetát 5:1. Výtěžek činil 0,71 g bílé krystalické látky, tj. 65 % teoretického výtěžku. Naměřená NMR spektra, teplota tání i R_f hodnoty odpovídaly stejné sloučenině připravené pomocí Metody 1.

5.1.5. Příprava ftalocyaninu (6). Metoda B



a) BuOH, Mg, I₂, 19 h, reflux, b) *p*-toluensulfonová kyselina, THF, 3 hod, lab. teplota c) DMF, pyridin, Zn(CH₃COO)₂, 120 °C, 4 hod

Příprava ftalocyaninu 8

Čerstvě predestilovaný bezvodý butanol (20 ml), kovový hořčík (1,58 g, 64,9 mmol), a krystalek jodu byl pod zpětným chladičem zahříván při teplotě varu 3 hodiny. Poté se smíchal *N*-(3-azidopropyl)-2,3-dicyanochinoxalin-6-karboxamid **7** (0,71 g, 2,3 mmol) s 4,5-bis(*tert*-butylsulfanyl)ftalonitrilem (2,12 g, 6,9 mmol) a přidal do reakce. Po 19 hodinách a po ochlazení se směs nalila do směsi voda/methanol/kyselina octová 5:5:1, tato směs byla při pokojové teplotě míchána po dobu 2 hodin. Přebytný butanolát hořečnatý v této směsi zreagoval na ve vodě rozpustný octan hořečnatý, směs produktů statistické kondenzace se vysrážela a byla následně odfiltrována a promyta vodou. Získalo se 3,1 g směsi všech kongenerů. Požadovaný kongener **8** byl odseparován pomocí sloupcové chromatografie s gradientovou elucí. Nejdříve byl použit chloroform/aceton 25:1 jako mobilní fáze a byla získána zelená frakce obsahující symetrický hořečnatý ftalocyanin složený ze čtyř jednotek 4,5-bis(*tert*-butylsulfanyl)ftalonitrilu. Poté byla soustava urychlena použitím soustavy chloroform/aceton/methanol 20:1:1 a získán požadovaný produkt **8**. Ten byl znovu přečištěn pomocí sloupcové chromatografie s gradientovou elucí s mobilní fází

chloroform/aceton 25:1 a následně chloroform/aceton/metanol 25:1:1. Celkový zisk 805 mg (33 %) zelené pevné látky.

Elementární analýza - nalezeno: C, 58,28; H, 5,90; N, 15,15; Vypočteno pro $C_{62}H_{70}N_{14}S_6Mg+2H_2O$: C, 58,18; H, 5,83; N, 15,32 %

UV-vis - λ_{max} (pyridin)/nm ($\epsilon/dm^3 mol^{-1} cm^{-1}$) 726 (143900), 705 (145200), 638 (36200), 553br (10800) a 379 (100200).

IČ (KBr) ν_{max} 2957, 2937, 2920, 2894, 2859, 2094, 1615, 1593, 1517, 1470, 1454, 1385, 1363, 1333, 1266, 1236, 1159, 1129, 1095, 1063, 1034, 940, a 908 cm^{-1} .

1H NMR (C_5D_5N) δ 1,54 (9H, s, CH_3), 1,57 (9H, s, CH_3), 1,66 (18H, s, CH_3), 1,67 (18H, s, CH_3), 2,09 (2H, p, $J=6,7Hz$, CH_2), 3,53 (2H, t, $J=6,7 Hz$, CH_2N_3), 3,86 (2H, q, $J=6,3 Hz$, CH_2NH), 8,89 (1H, dd, $J= 8,9 Hz$, arH), 9,04 (1H, d, $J= 8,8 Hz$, arH), 9,82 (1H, s, arH), 10,14 (2 H, s, arH) a 10,17 ppm (4H, s, arH).

^{13}C NMR (C_5D_5N) δ 29,56; 31,38; 38,02; 48,71; 48,85; 48,90; 49,49; 130,62; 131,39; 132,60; 132,73; 137,60; 138,80; 138,96; 141,59; 141,66; 142,43; 142,48; 143,03; 143,08; 144,54; 154,25; 155,23; 155,58 a 167,07 ppm.

m/z (MALDI-TOF) 1242 $[M]^+$, 1265 $[M+Na]^+$ a 1281 $[M+K]^+$

Příprava ftalocyaninu (9)

Hořčnatý ftalocyanin **8** (805 mg, 0.65 mmol) se rozpustil v chloroformu (20 ml) a byla přidána *p*-toluensulfonová kyselina (846 mg, 5.2 mmol) rozpuštěná v tetrahydrofuranu (20 ml). Roztok byl míchán při pokojové teplotě 3 hodiny. Rozpouštědla byla odpařena pomocí vakuové rotační odparky a produkt následně promyt vodou, 1% roztokem $NaHCO_3$, opět vodou a nechal se vyschnout na filtračním papíru. Výtěžkem bylo 718 mg zelené pevné látky, tj. 88 % teoretického výtěžku.

Elementární analýza – nalezeno: C, 59,49; H, 6,03; N, 15,80. Vypočteno pro $C_{62}H_{72}N_{14}OS_6+2H_2O$: C, 59,21; H, 6,09; N, 15,59 %

UV-vis - λ_{max} (pyridin)/nm ($\epsilon/dm^3 mol^{-1} cm^{-1}$) 725 (128100), 705 (136000), 637 (36200), 546br (12800) a 379 (88500).

IČ (ATR) ν_{\max} 3299, 2955, 2919, 2893, 2856, 2553, 2360, 2342, 2092, 1736, 1726, 1655, 1648, 1597, 1546, 1535, 1499, 1453, 1413, 1384, 1363, 1301, 1259, 1229, 1159, 1125, 1113, 1070, 1056, 1015, 940, 903 a 844 cm^{-1} .

^1H NMR ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}/\text{CDCl}_3$) δ 1,27 (9H, s, CH_3), 1,31 (9H, s, CH_3), 1,46 (9 H, s, CH_3), 1,47 (9 H, s, CH_3), 1,51 (9H, s, CH_3), 1,52 (9H, s, CH_3), 1,90 (2H, p, $J=6,7$ Hz, CH_2), 3,35 (2H, t, $J=6,6$ Hz, CH_2N_3), 3,57 (2H, q, $J=6,4$ Hz, CH_2NH), 8,19 (1 H, dd, $J=8,6$ Hz, arH), 8,31 (1 H, d, $J=8,7$ Hz, arH) 8,78-8,80 (1 H, m, arH), 8,89 (1H, s, arH), 9,08 (1H, s, arH), 9,10 (1H, s, arH), 9,13 (1H, s, arH), 9,19 (1H, s, arH) a 9,21 ppm (1 H, s, arH);

^{13}C NMR ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}/\text{CDCl}_3$) δ 28,47; 30,74; 30,77; 30,81; 37,25; 47,89; 48,01; 48,03; 48,09; 48,57; 48,73; 128,69; 130,26; 131,13; 131,18; 136,35; 137,20; 137,33; 140,04; 140,12; 141,45; 141,69; 141,87; 143,28; 144,92; 145,20; 151,45; 151,52; 159,26; 159,35; 166,84 ppm.

m/z (MALDI-TOF) 1220 $[\text{M}]^+$, 1243 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

Chelatace zinečnatého kationtu - Příprava ftalocyaninu (6)

Ftalocyanin **9** (718 mg, 0,59 mmol) byl rozpuštěn v pyridinu a byl přidán bezvodý octan zinečnatý (755 mg, 4,1 mmol) a dimethylformamid (30 ml). Směs se nechala míchat 4 hodiny při 120 $^\circ\text{C}$, po vychladnutí byla přidána voda a směs byla míchána dalších 45 minut při pokojové teplotě. Produkt byl přefiltrován a přečištěn pomocí sloupcové chromatografie s mobilní fází chloroform/aceton/pyridin 10:1:0,5. Výtěžek činil 646 mg čisté sloučeniny **6**, tj. 86 % teoretického výtěžku.

Elementární analýza – nalezeno: C, 58,57; H, 5,66; N, 15,38. Vypočteno pro $\text{C}_{62}\text{H}_{70}\text{N}_{14}\text{O}_6\text{Zn}$: C, 57,95; H, 5,49; N, 15,26 %

UV-vis - λ_{\max} (pyridin)/nm ($\epsilon/\text{dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) 728 (150300), 706 (145400), 672br (45400), 638 (35600), 545 (9600) a 377 (95900).

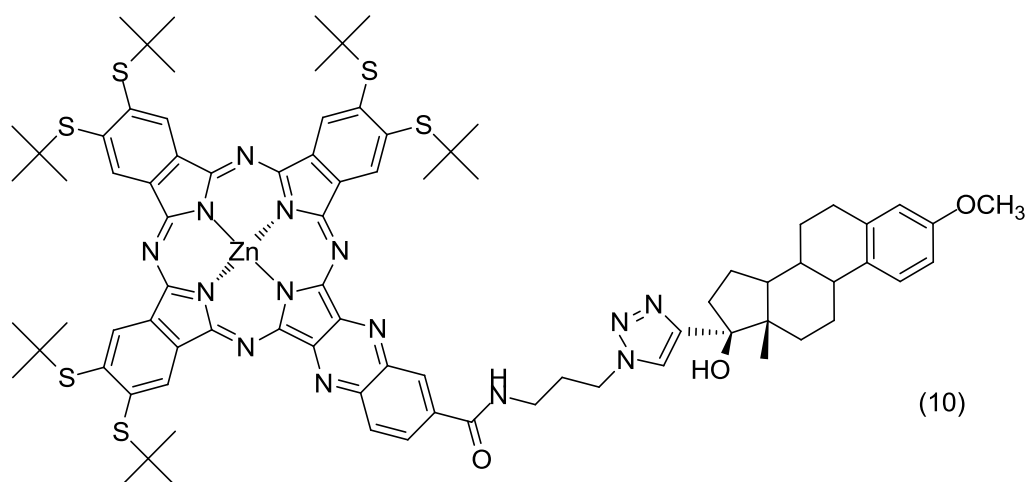
IČ (KBr) ν_{\max} 3319, 2958, 2937, 2919, 2893, 2858, 2557, 2387, 2288, 2093, 1649, 1594, 1522, 1486, 1470, 1454, 1389, 1363, 1333, 1314, 1265, 1236, 1160, 1128, 1100, 1077, 1062, 1037, 941, 907, 881 a 844 cm^{-1} .

^1H NMR ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) δ 1,52 (9H, s, CH_3), 1,57 (9H, s, CH_3), 1,68 (9 H, s, CH_3), 1,69 (9 H, s, CH_3), 1,70 (18H, s, CH_3), 2,13 (2H, p, $J=6,7$ Hz, CH_2), 3,56 (2H, t, $J=6,7$ Hz, CH_2N_3), 3,90 (2H, q, $J=6,3$ Hz, CH_2NH), 8,89 (1 H, dd, $J=8,8$ Hz, arH), 8,97 (1 H, d, $J=8,7$ Hz, arH) 9,78-9,82 (1 H, m, arH), 10,05 (1H, s, arH), 10,11 (2H, s, arH), 10,12 (2H, s, arH) a 10,13 ppm (1 H, s, arH);

^{13}C NMR ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) δ 29,59; 31,40; 38,06; 48,72; 48,75; 48,95; 49,53; 130,66; 131,10; 131,34; 132,28; 132,46; 137,66; 137,95; 138,06; 138,22; 138,28; 141,58; 142,59; 142,66; 143,14; 143,39; 143,43; 144,64; 154,48; 155,30; 155,64 a 167,03 ppm.

m/z (MALDI-TOF) 1282 $[\text{M}]^+$, 1305 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ a 1321 $[\text{M}+\text{K}]^+$

5.1.6. Příprava konjugátu (10)



Baňka s jodidem měďným (4,4 mg, 23,3 μmol) byla naplněna argonem, v další baňce se rozpustil ftalocyanin **6** (0,06 g, 46,6 μmol) v bezvodém dimethylformamidu a přidal se mestranol (0,022 g, 69,9 μmol) a DBU (3,5 mg, 23,3 μmol). Tato směs se nechala probublat asi 15 minut argonem k odstranění rozpuštěného kyslíku a přidala se k jodidu měďnému. Průběh reakce byl sledován pomocí tenkovrstvé chromatografie s mobilní fází chloroform/methanol 20:1. Reakce byla ukončena po 3 dnech. Produkt byl následně přečištěn pomocí sloupcové chromatografie za použití směsi toluen/pyridin 10:2. Získ 17 mg (29 %) zelené pevné látky.

Elementární analýza – nalezeno: C, 59,50; H, 6,06; N, 11,34. Vypočteno pro $C_{83}H_{96}N_{14}O_3S_6+4H_2O$: C, 59,78; H, 6,29; N, 11,76 %

UV-vis - λ_{max} (pyridin)/nm ($\epsilon/dm^3 mol^{-1} cm^{-1}$) 728 (104500), 706 (101700), 672br (3150), 638 (25000), 545 (7100) a 377 (69300).

IČ (ATR) ν_{max} 2922, 2853, 2814, 2762, 2121, 2069, 1734, 1653, 1550, 1496, 1455, 1363, 1318, 1237, 1218, 1165, 1129, 1100, 1063, 1041, 942, 892, 842 a 783 cm^{-1} .

1H NMR (C_5D_5N) δ 1,35 (3 H, s, $CH_3Mestr.$); 1,53 (9 H, s, CCH_3); 1,57 (9 H, s, CCH_3); 1,67 (18 H, s, CCH_3); 1,69 (18 H, s, CCH_3); 1,45-1,75 (4 H, m, alifMestr); 1,88-1,95 (4 H, m, alifMestr); 2,14-2,29 (4 H, m, alifMestr); 2,43-2,60 (3 H, m, alifMestr a $CH_2CH_2CH_2$); 2,70-2,83 (1 H, m, alifMestr); 2,91-3,04 (1 H, m, alifMestr); 3,56 (3 H, s, OCH_3); 3,89 (2 H, q, $J=7.1$ Hz, $NHCH_2$); 4,81 (2 H, t, $J=6,8$ Hz, NCH_2); 6,64 (1 H, d, $J=2,5$ Hz, ArMestr.); 6,79 (1 H, dd, $J_1=2,6$ Hz, $J_2=8,8$ Hz, ArMestr.); 6,82 (1 H, s, ArMestr); 8,41 (1 H, s, CH triazol); 8,89 (1 H, d, $J=9,1$ Hz, arH); 9,01 (1 H, d, $J=8.8$ Hz); 9,81-9,86 (2 H, m, arH); 10,14 (2 H, s, arH); 10,16 ppm (3 H, s, arH).

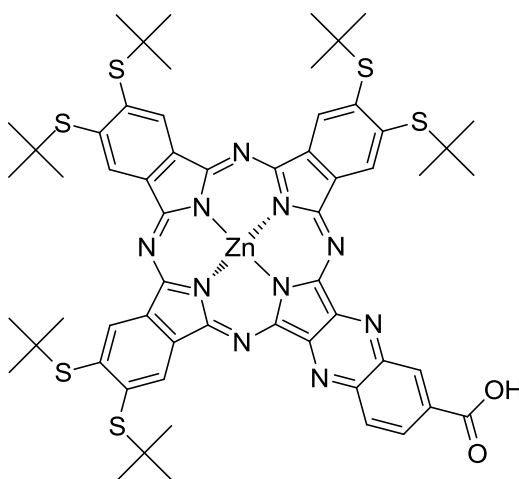
^{13}C NMR (C_5D_5N) δ 15,07; 24,47; 26,97; 27,85; 30,15; 29,98; 31,38; 33,73; 37,98; 38,85; 39,98; 43,85; 47,84; 48,29; 48,74; 48,76; 48,90; 48,97; 54,94; 82,28; 111,94; 114,01; 126,72; 130,11; 130,73; 131,17; 131,42; 132,43; 132,59; 133,08; 134,83; 137,58; 138,07; 138,17; 138,28; 138,32; 141,67; 141,72; 142,63; 142,66; 143,16; 143,39; 143,44; 144,68; 154,56; 155,39; 155,66; 155,68; 155,93; 157,87 a 167,16 ppm.

m/z (MALDI-TOF) 1593 $[M+H]^+$

6. Výsledky a diskuze

Fotosenzitizéry třetí generace se vyznačují především cílenou distribucí, zvýšením selektivity a zlepšení některých farmakologických vlastností. Toho lze docílit navázáním fotosenzitizéru na určitou biomolekulu. V mé práci jsem se proto zabývala využitím relativně nové metody, tzv. „click chemistry“ při přípravě konjugátů fotosenzitizéru s biomolekulou, vzhledem k nesporným výhodám, které tato metoda vykazuje. Nejpoužívanějším typem „click chemistry“ je pak 1,3 azid-alkyn cykloadice za katalýzy měďnými kationty, kterou jsem použila i já ve své práci. Za biomolekulu jsem si zvolila steroidní hormon mestranol, jelikož obsahuje ve své molekule terminální alkynovou skupinu a navíc jeho konjugací s fotosenzitizérem vzniká sloučenina, která by mohla mít velký potenciál při léčbě estrogen-dependentních nádorů.

Výběr fotosenzitizéru vycházel ze snahy použít pro reakci sloučeninu co nejoptimálnější z hlediska fotofyzikálních a fotochemických parametrů. Proto byl nakonec vybrán následující zinečnatý ftalocyanin (viz **Obr. 17**)⁽⁸¹⁾ vyvinutý dříve v naší laboratoři. Ten se vyznačuje silnou absorpcí až při 726 nm ($\epsilon=139\,000\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$) a vysokou produkcí singletového kyslíku (kvantový výtěžek singletového kyslíku, $\Phi_{\Delta}=0,80$).



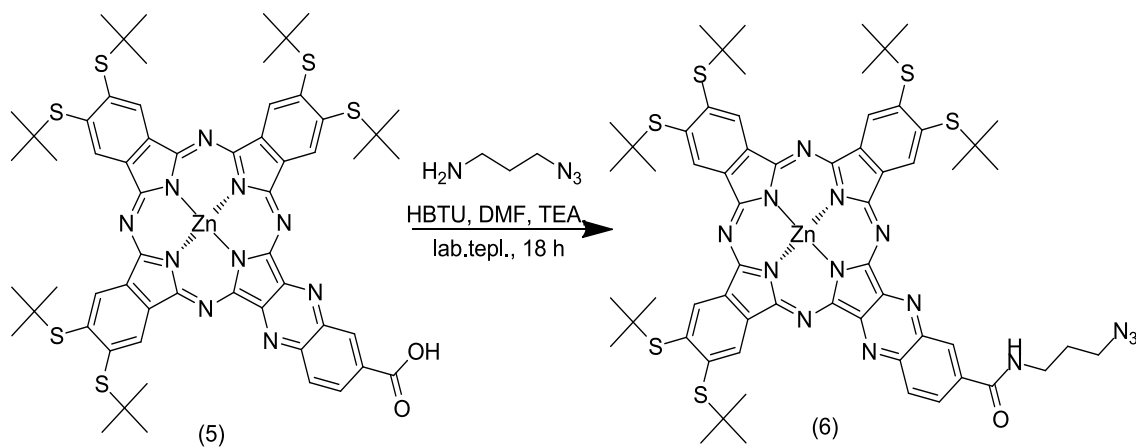
Obr.17 Námí používaný zinečnatý ftalocyanin

Zinečnatý kation vázaný v molekule ftalocyaninu zvyšuje kvantové výtěžky singletového kyslíku a tripletového stavu molekuly, což je navíc podpořeno i

alkylsulfanylovými substituenty na periférii. Rozšířením konjugovaného systému π -vazeb ftalocyaninu vložení pyrazinového kruhu pak byla získána sloučenina s absorpcí o vyšších vlnových délkách (726 nm), což umožní hlubší průnik aktivujícího světla do tkání. Karboxylová skupina na periférii umožňuje stabilní amidickou vazbu s linkerem.

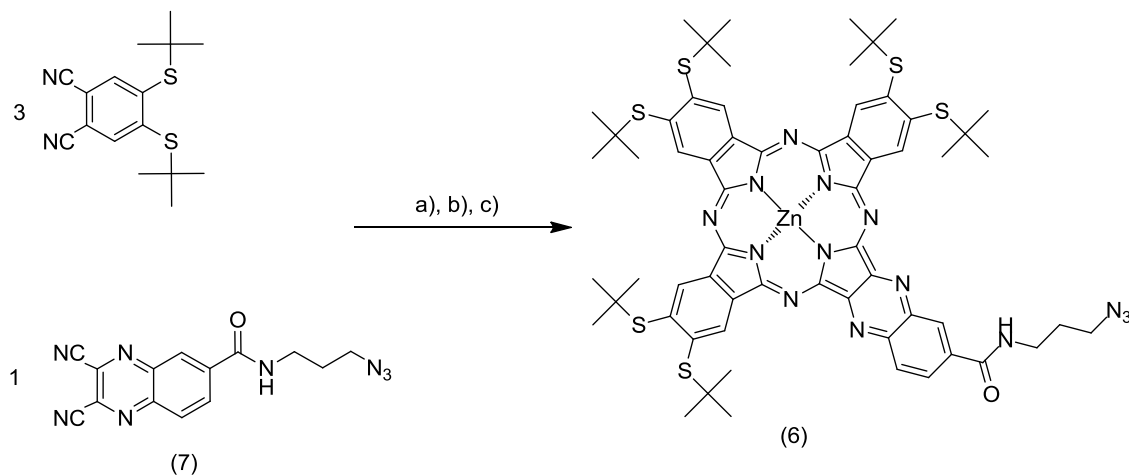
Principem 1,3 azid-alkyn cykloadice je reakce terminálního alkynu s azidem. Vzhledem k tomu, že tato metoda nebyla dosud na naší katedře prováděna, mým prvním krokem bylo, vyzkoušet jí tzv. „nanečisto“ za použití hept-1-ynu jako terminálního alkynu. Základním krokem bylo připravit 3-azidopropylamin **1** reakcí 3-brompropylaminu s azidem sodným. Příprava musela být prováděna velice opatrně, jelikož azid sodný je výbušná sloučenina, nicméně žádné problémy zde nenastaly. Sloučenina **1** byla uchovávána ve formě hydrochloridu a v čas potřeby byla převedena zpět na volnou bazi. Následně byla sloučenina **1** podrobena reakci s chloridem kyseliny benzoové, čímž vznikl amid **3** této kyseliny s volnou terminální azidovou skupinou, a tím byla sloučenina připravena na vlastní „click“ s hept-1-ynem. Click reakce probíhala s katalyzátorem CuI, bází 1,8-diazabicyklo[5,4,0]undec-7-en (DBU), za laboratorní teploty pod inertní argonovou atmosférou. Malý problém nastal, když po přidání DBU nedošlo ke zreagování CuI (patrně z toho, že nedošlo rozpuštění suspenze za vzniku čirého roztoku), tudíž jsem přidala do reakce další DBU. Reakce proběhla okamžitě ve vysokém výtěžku (79 %). Část prekurzorů - azidoamid kyseliny benzoové, jodid měďný, DBU a bezvodý dimethylformamid - jsem použila k provedení souběžné kontrolní reakce bez hept-1-ynu. Tímto jsem zjistila, že nedochází k jiným nežádoucím reakcím.

Následovala příprava amidu ftalocyaninu **6** z ftalocyaninu **5** nesoucího volnou karboxylovou skupinu. Výchozí ftalocyanin **5** byl podroben reakci s 3-azidopropylaminem (**1**) za laboratorní teploty, s přidáním HBTU jako aktivátoru, rozpouštědlem dimethylformamidem (DMF) a bází triethylaminem (TEA) (viz **Obr.18**, viz také Metoda A v experimentální části). Dle TLC proběhla reakce kvantitativně.



Obr.18 Přímá příprava ftalocyaninu 6, metoda A

Tato příprava látky **6** se ovšem ukázala jako méně vhodná, díky silné vazbě výchozího ftalocyaninu **5** na silikagel během jeho přípravy, a tím snížení jeho výtěžků (pouhých 11%)⁽⁸¹⁾. Z tohoto důvodu jsem zvolila odlišný způsob přípravy, který spočíval v přípravě nejprve modifikovaného prekurzoru, v našem případě amidu 2,3-dikyanochinoxalin-6-karboxylové kyseliny **7** a následné cyklizaci s prekurzorem nesoucím *tert*-butylsulfanylovou skupinu (viz **Obr.19**), viz také Metoda B v experimentální části).



a) BuOH, Mg, I₂, 19 h, reflux; b) *p*-toluensulfonová kyselina, THF, 3 h, lab. teplota; c) DMF, pyridin, Zn(CH₃COO)₂, 120 °C, 4 h

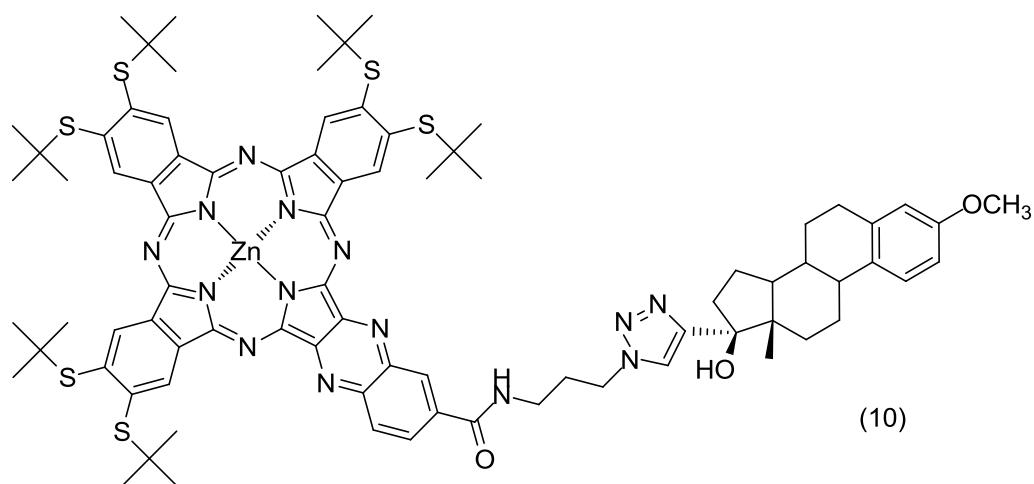
Obr.19 Příprava ftalocyaninu 6 pomocí modifikovaných prekurzorů, metoda B

2,3-dikyanoxalin-6-karboxylová kyselina byla ponechána reagovat přímo se sloučeninou **1**, za stejných podmínek (HBTU, TEA, DMF) jako předchozí reakce ftalocyaninu **5**, za vzniku sloučeniny **7** (viz Metoda 1 v experimentální části). Jelikož tato reakce byla prováděna v malých množstvích, spotřeba HBTU nebyla příliš vysoká. Pokud by se ovšem reakci podrobilo větší množství surovin, spotřeba HBTU by byla finančně náročná, navíc výtěžek reakce činil pouze 58 %. Proto jsem se pokusila připravit žádanou sloučeninu přes chlorid kyseliny, který vznikl působením thionylchloridu (viz Metoda 2 v experimentální části). Při použití přebytku azidopropylaminu pro vychytávání uvolňovaného HCl byly výtěžky poměrně malé, což byl důvod, proč jsem metodu upravila přidáním uhličitanu draselného jako báze (viz Metoda 3 v experimentální části). Výtěžek reakce činil na rozdíl od předchozí metody 65%.

Následujícím krokem byla cyklizace sloučeniny **7** s 4,5-bis(*tert*-butylsulfanyl)ftalonitrilem v molárním poměru 1:3 v butanolu za použití butanolátu hořečnatého jako iniciátoru reakce. Poměr 1:3 byl zvolen proto, abychom zvýšili výtěžek požadovaného nesymetrického kongeneru typu AAAB nesoucího pouze jednu modifikovatelnou azidovou skupinu na periférii. Produktem této statistické kondenzace byla směs šesti různých kongenerů (AAAA, AAAB, AABB, ABAB, ABBB a BBBB), z nichž jsem požadovaný kongener AAAB s hořečnatým kationtem chelatovaným v centru molekuly **8** odseparovala sloupcovou chromatografií. K přípravě požadovaného zinečnatého komplexu ftalocyaninu **6** bylo nutné nejdříve odstranit hořečnatý kation z centra makrocyklu pomocí kyseliny *p*-toluensulfonové (sloučenina **9**) a následně zavést do molekuly zinečnatý kation pomocí bezvodého octanu zinečnatého.

Srovnáme-li přípravu požadovaného ftalocyaninu **6** Metodou A a B, dojdeme k závěru, že druhá z nich je výhodnější. Modifikací prekurzoru před cyklotetramerizací jsme získali směs ftalocyaninů, ze které lze poměrně snadno pomocí sloupcové chromatografie oddělit požadovaný ftalocyanin **6**, který vykazuje daleko nižší vazbu na silikagel oproti sloučenině **5**. Celkový výtěžek přípravy ftalocyaninu **6** vypočtený z výchozí 2,3-dikyanoxalin-6-karboxylové kyseliny se tak zvýšil z 11 % (Metoda A) na 16 % (Metoda B), přičemž velkou výhodou je snazší separace kongenerů po proběhlé statistické kondenzaci.

Finální reakcí byl pak „click“ zinečnatého komplexu ftalocyninu **6** s mestranolem, za vzniku konjugátu **10** (viz **Obr.20**). Reakce probíhala 3 dny, za laboratorní teploty, pod inertní argonovou atmosférou, za použití organického rozpouštědla DMF a DBU jako báze. Výtěžek činil ovšem pouhých 29 % díky mnoha vedlejším produktům patrným z tenkovrstvé chromatografie. To vedlo k dalšímu pokračování v práci a hledání optimálních podmínek, za kterých bychom dosahovali vyšších výtěžků. Ještě před sepsáním mé diplomové práce byly nakonec kolegy v laboratoři nalezeny vhodné reakční podmínky, kdy za použití tetrahydrofuranu jako reakčního prostředí a *N,N*-diisopropylethylaminu (DIPEA) jako báze probíhala „click“ reakce ve výtěžku 86 %. Část výsledků mé diplomové práce se stala součástí publikace, kde jsem také spoluautorkou.



Obr.20 Cílová molekula **10**

7. Závěr

V rámci mé diplomové práce jsem studovala „click“ 1,3 azid-alkyn cykloadici, na jednoduché sloučenině a hledala optimální podmínky pro reakce. Tyto poznatky jsem pak využila při aplikaci „click“ chemistry pro přípravu fotosenzitizerů třetí generace, a to přípravu zinečnatého ftalocyaninu konjugovaného s mestranolem. Tato sloučenina je potenciálním léčivem, které by se mohlo použít při fotodynamické terapii k léčbě estrogen-dependentních nádorů.

V rámci mé diplomové práce jsem připravila tyto sloučeniny:

- 3-azidopropylamin (**1**) (uchovávaný jako hydrochlorid **2**)
- *N*-(3-azidopropyl)benzamid (**3**)
- *N*-[3-(4-pentyl-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)propyl]benzamid (**4**)
- zinečnatý komplex ftalocyaninu (**6**)
- *N*-(3-azidopropyl)-2,3-dikyanoxalin-6-karboxamidu (**7**)
- hořečnatý komplex ftalocyaninu (**8**)
- bezkovový derivát ftalocyaninu (**9**)
- konjugát zinečnatého komplexu ftalocyaninu a mestranolu (**10**)

Syntéza prekurzorů a studie následné „click“ azid-alkyn cykloadice.

Jana Ivincová

Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv, Farmaceutická fakulta v Hradci

Králové, Univerzita Karlova v Praze

Fotosenzitizéry (PS) se využívají ve fotodynamické terapii, jejímž principem je destrukce nádorových buněk pomocí singletového kyslíku, který vzniká při ozáření těchto látek. Třetí generace PS se vyznačuje vysokou účinností, optimálními spektrálními vlastnostmi a především cílenější distribucí do nádorových tkání. Toho lze dosáhnout vazbou PS na vhodně zvolenou biomolekulu.

Ve své práci jsem se zabývala spojením vhodného PS s mestranolem pomocí 1,3 azid-alkyn cykloadice, označované jako „click chemistry“. Zvolený PS byl již dříve připraven na našem pracovišti a byl vybrán díky svým ideálním fotofyzikálním a fotochemickým vlastnostem. 1,3 azid-alkyn cykloadice je reakce azidu s terminálním alkynem za katalýzy CuI a vzniku 1,2,3-triazolu. Jedná se o vysoce selektivní, snadnou a rychlou reakci s vysokými výtěžky, bez vlivu substituentů vázaných v blízkosti azidu a alkynu.

Předem připravený 3-azidopropylamin jsem navázala amidicky na vybraný PS. Zavedená azidová skupina v PS poskytla reakci s terminálním alkynem mestranolu za podmínek 1,3-azid-alkyn cykloadice uvedených kýžený produkt.

Karboxylová skupina na periférii PS zvoleného pro tuto reakci je zodpovědná za nízké výtěžky při jeho přípravě díky silné vazbě na silikagel během čištění sloupcovou chromatografií. Proto byl zvolený PS připraven i alternativní metodou - amidací prekurzoru 3-azidopropylaminem a jeho následnou cyklizací s prekurzorem nesoucím *terc*-butylsulfanylové skupiny. Tato metoda poskytla vyšší výtěžky a snadnější separaci jednotlivých kongenerů.

Synthesis of precursors and studies of „click“ azide-alkyne cycloaddition .

Jana Ivincová

Department of Pharmaceutical Chemistry and Drug Control,

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Charles University in Prague

Photosensitizers are used in photodynamic therapy that is based on a destruction of tumor cells by singlet oxygen. Singlet oxygen is generated during irradiation of photosensitizers. The third generation of the photosensitizers is characterized by high efficiency, optimal spectral properties and particularly by targeted distribution into the tumor cells. This can be achieved by conjugation of phthalocyanine photosensitizer with biomolecules.

My thesis concerned with conjugation of suitable phthalocyanine with mestranol using 1,3 azide-alkyne cycloaddition (also called „click chemistry“). Selected photosensitizer with optimal photophysical and photochemical properties was prepared in our department earlier. 1,3 azide-alkyne cycloaddition is CuI catalyzed reaction of azide and terminal alkyne. This reaction is high yielding, selective and easy to perform, without any considerable effects of substituents in proximity of azide or alkyne.

Pre-prepared 3-azidopropylamine was linked to the selected phthalocyanine introducing thus azide group to photosensitizer. The azide group in Pc reacted with terminal alkyne of mestranol and provided the desired conjugate through 1,3 azide- alkyne cycloaddition.

Carboxy group in chosen phthalocyanine is responsible for its low yield because of strong silica-binding during purification by column chromatography. That is why, the phthalocyanine was prepared also by alternative method - by amidation of the precursor with 3-azidopropylamine and subsequent cyclization with precursor bearing *tert*-butylsulfanyl groups. The alternative approach provided phthalocyanine in higher yield particularly due to easier isolation from the reaction mixture.

8. Použitá literatura

- ¹ MACDONALD, I. J., DOUGHERTY, T. J. Basic principles of photodynamic therapy. *J. Porphyrins Phthalocyanines*, 2001, vol. 5, no. 2, pp. 105–129.
- ² TAQUET, J. P., FROCHOT, C., MANNEVILLE, V., BARBERI-HEYOB M. Phthalocyanines Covalently Bound to Biomolecules for a Targeted Photodynamic Therapy. *Curr. Med. Chem.*, 2007, vol. 14, pp. 1673-1687.
- ³ ACKROYD, R., KELTY, C., BROWN, N., REED, M.. The history of photodetection and photodynamic therapy, *Photochem. Photobiol.*, 2001, vol. 74, no. 5, pp. 656-669.
- ⁴ BOYLE, R. W., DOLPHIN, D. Structure and biodistribution relationships of photodynamic sensitzers. *Photochem. Photobiol.*, 1996, vol. 64, no. 3, pp. 469-485.
- ⁵ VALKO, M., IZAKOVIC, M., MAZUR, M., RHODES, C. J., TELSER, J. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Mol. Cell. Biochem.*, 2004, vol. 266, pp. 37–56.
- ⁶ SHARMAN, W. M., ALLEN, C. M., VAN LIER, J. E. Photodynamic therapeutics: basic principles and clinical applications. *Drug Discov. Today*, 1999, vol. 4, no. 11, pp. 507–517.
- ⁷ DOUGHERTY, T. J., GOMER, C. J., HENDERSON, B. W., JORI, G, KESSEL, D, KORBELIK, M, MOAN, J, PENG, Q. Photodynamic therapy. *J. Natl. Cancer Inst.*, 1998, vol. 90, no. 12, pp. 889–905.
- ⁸ BONNET, R. Photosensitizers of the porphyrin and phthalocyanine series for photodynamic therapy. *Chem. Soc. Rev.*, 1995, vol. 24, pp. 19–33.
- ⁹ DETTY, M. R., GIBSON, S. L., WAGNER, S. J. Current clinical and preclinical photosensitizers for use in photodynamic therapy. *J. Med. Chem.*, 2004, vol. 47, no. 16, pp. 3897–3915.
- ¹⁰ JOSEFSEN, L. B., BOYLE, R. W. Photodynamic Therapy and the Development of metal-based photosensitisers. *Met.-Based Drugs*, 2008, vol. 2008, Article ID 276109, 24 pages.
- ¹¹ ANDERSON, H. L. Building molecular wires from the colours of life: conjugated porphyrin oligomers. *Chem. Commun.*, 1999, pp. 2323–2330.

-
- ¹² CASTANO, A. P., DEMIDOVA, T. N., HAMBLIN, M. R. Mechanisms in photodynamic therapy: part one—photosensitizers, photochemistry, and cellular localization. *Photodiagn. Photodyn. Ther.*, 2004, vol. 1, no. 4, pp. 279–293.
- ¹³ SCHMIDT, M. H., REICHERT II, K. W., OZKER, K., MEYER, G. A., DONOHOE, L. D., BAJIC, D. M., WHELAN, N. T. Preclinical evaluation of benzoporphyrin derivative combined with a light-emitting diode array for PDT of brain tumors. *Pediatr. Neurosurg.*, 1999, vol. 30, pp. 225-231.
- ¹⁴ BUSETTI, A., SONCIN, M., JORI, G., RODGERS, M. A. J. High efficiency of benzoporphyrin derivative in PDT of pigment malignit melanoma. *Br. J. Cancer*, 1999, vol. 79, pp. 821-824.
- ¹⁵ STABLES, G. I., ASH, D. V. Photodynamic therapy. *Cancer Treat. Rev.*, 1995, vol. 21, no.4, pp. 311-323.
- ¹⁶ BROWN, S. B., BROWN, E. A., WALKER, I. The present and future role of photodynamic therapy in cancer treatment. *Lancet Oncol.*, 2004, vol.5, no.8, pp. 497-508.
- ¹⁷ NYMAN, E. S., HYNNINEN, P. H. Research advances in the use of tetrapyrrolic photosensitizers for PDT. *J. Photochem. Photobiol., B-Biol.*, 2004, vol.73, no.1-2, pp. 1-28.
- ¹⁸ BONNETT, R., MARTINEZ, G. Photobleaching of sensitisers used in photodynamic therapy. *Tetrahedron*, 2001, vol. 57, no. 47, pp. 9513–9547.
- ¹⁹ ALI, H., VAN LIER, J. E. Metal complexes aa photo- and radio- sensitizers. *Chem. Rev.*, 1999, vol.99, no.9, pp. 2379-2450.
- ²⁰ ZIMCIK, P, MILETIN, M., Photodynamic Therapy. In *Dyes and Pigments: New Research*, Lang, A. R., Ed. Nova Science Publishers, Inc.: New York, 2009; p. 1-62.
- ²¹ KAESTNER, L., CESSON, M., KASSAB, K., CHRISTENSEN, T., EDMINSON, P. D., COOK, M. J., CHAMBRIER, I., JORI, G. Zinc octa-n-alkyl phthalocyanines in photodynamic therapy: photophysical properties, accumulation and apoptosis in cell cultures, studies in erythrocytes and topical application to Balb/c mice skin. *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2003, vol. 2, pp. 660–667.
- ²² LANG, K., MOSINGER, J., WAGNEROVA, D. M. Photophysical properties of porphyrinoid sensitizers non-covalently bound to host molecules; models for photodynamic therapy. *Coord. Chem. Rev.*, 2004, vol. 248, no. 3-4, pp. 321–350.

-
- ²³ ALVAREZ, M. G., VITTAR, N. B. R., PRINCIPE, F., BERGESSE, J., ROMANINI, M., ROMANINI, S., BERTUZZI, M., DURANTINI, E., RIVAROLA, V. Pharmacokinetic and phototherapeutic studies of monocationic methoxyphenylporphyrin derivative. *Photodiagn. Photodyn. Ther.*, 2004, vol. 1, no. 4, pp. 335–344.
- ²⁴ COLLINS-GOLD, L., FEICHTINGER, N., WÄRNHEIM, T. Are lipid emulsions the drug delivery solution? *Mod. Drug Discov.*, 2000, vol. 3, no. 3, pp. 44–46.
- ²⁵ ALVAREZ-MICO, X., CALVETE, M. J. F., HANACK, M., ZIEGLER, T. The first example of anomeric glycoconjugation to phthalocyanines. *Tetrahedron Lett.*, 2006, vol.47, pp. 3283–3286.
- ²⁶ KUMAMOTO, K., GOTO, Y., SEKIKAWA, K., TAKENOSHITA, S., ISHIDA, N., KAWAKITA, M., KANNAGI, R. Increased expression of UDP-galactose transporter messenger RNA in human colon cancer tissues and its implication in synthesis of Thomsen-Friedenreich antigen and sialyl Lewis A/X determinants. *Cancer Res.*, 2001, vol. 61, pp. 4620- 4627.
- ²⁷ MAILLARD, P., GUERQUIN-KERN, J.-L., MOMENTEAU, M. S., GASPARD, S. Glycoconjugated tetrapyrrolic macrocycles. *J. Am. Chem. Soc.*, 1989, vol. 111, pp. 9125-9127.
- ²⁸ LEE, P. P. S., LO, P. C., CHAN, E. Y. M., FONG, W. P., KO, W. H., NG, D. K. P. Synthesis and in vitro photodynamic activity of novel galactose-containing phthalocyanines. *Tetrahedron Lett.*, 2005, vol. 46, pp. 1551-1554.
- ²⁹ TOSHIMA, K., TASUTA, K. Recent progress in o-glycosylation methods and its application to natural-products synthesis. *Chem. Rev.*, 1993, vol. 93, pp. 1503-1531.
- ³⁰ ERHONG, H., JENSEN, T. J., GRACA, M., VICENTE, H. Synthesis of porphyrin-carbohydrate conjugates using „click“ chemistry and their preliminary evaluation in human HEP2 cells. *J. Porphyrins Phthalocyanines*, 2009, vol. 13, pp. 51-59.
- ³¹ GA, Z. W., SPIKES, J. D., KOPECKOVA, P., KOPECEK, J. Synthesis and photoproperties of a substituted zinc(ii) phthalocyanine-n-(2-hydroxypropyl)methacrylamide copolymer conjugate. *Collect. Czech. Chem. Commun.*, 1993, vol. 58, pp. 2321-2336.

-
- ³² DRECHSLER, U., PFAFF, M., HANNACK, M. Synthesis of novel functionalised zinc phthalocyanines applicable in photodynamic therapy. *Eur. J. Org. Chem.*, 1999, pp. 3441-3453.
- ³³ LUTSENKO, S. V., FELDMAN, N. B., FINAKOVA, G. V., POSYPANOVA, G. A., SEVERIN, S. E., SKRYABIN, K. G., KIRPICHNIKOV, M. P., LUKYANETS, E. A., VOROZHTSOV, G. N. Targeting Phthalocyanines to Tumor Cells Using Epidermal Growth Factor Conjugates. *Tumor Biol.*, 1999, vol.20, pp. 218-224.
- ³⁴ CHERNONOSOV, A. A., KOVAL, V. V., KNORRE, D. G., CHERNENKO, A. A., DERKACHEVA, V. M., LUKYANETS, E. A., FEDOROVA, O. Conjugates of Phthalocyanines with Oligonucleotides as Reagents for Sensitized or Catalytic DNA Modification. *Bioorg. Chem. App.*, 2006, vol. 2006, pp. 63703.
- ³⁵ CWIERTKA K., TROJANEC R., ŠPAČKOVÁ K., HAJDÚCH M. Terapeutické monoklonální protilátky v onkologii. *Klinická Farmakologie A Farmacie*, 2004, vol. 18, pp. 165–170.
- ³⁶ RUSSELL, S. J., LLEWELYN, M. B., HAWKINS, R. E. Principles of antibody therapy. *Br. Med. J.*, 1992, vol. 305, pp. 1424–1429.
- ³⁷ GOFF, B. A., BAMBERG, M., HASAN, T. Photoimmunotherapy of human ovarian carcinoma cells *ex vivo*. *Cancer Res.*, 1991, vol.51, pp. 4762–4767.
- ³⁸ HAMBLIN, M. R., DEL GOVERNATORE, M., RIZVI, I., HASAN, T. Biodistribution of charged 17.1A photoimmunoconjugates in a murine model of hepatic metastasis of colorectal cancer. *Br. J. Cancer*, 2000, vol.83, pp. 1544–1551.
- ³⁹ VROUENRAETS, M. B., VISSER, G. W. M., STEWART, F. A., STIGTER, M., OPPELAAR, H., POSTMUS, P. E., SNOW, G. B., VAN DONGEN, G. A. M. S. Development of *meta*-tetrahydroxyphenylchlorin–monoclonal antibody conjugates for photoimmunotherapy. *Cancer Res.*, 1999, vol. 59, pp. 1505–1513.
- ⁴⁰ CLARKE, O. J., BOYLE, R. W. Isothiocyanatoporphyrins, useful intermediates for the conjugation of porphyrins with biomolecules and solid supports. *Chem. Commun.*, 1999, pp. 2231–2232.

-
- ⁴¹ SUTTON, J. M., CLARKE, O. J., FERNANDEZ, N., BOYLE, R. W. Porphyrin, chlorin, and bacteriochlorin isothiocyanates: useful reagents for the synthesis of photoactive bioconjugates. *Bioconjugate Chem.*, 2002, vol.13, pp. 249–263.
- ⁴² KHAN, E. H., ALI, H., TIAN, H., ROUSSEAU, J., TESSIER, G., VAN LIER, S., VAN LIER, J. E. Synthesis and Biological Activities of Phthalocyanine-Estradiol Conjugates. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2003, vol. 13, pp. 1287-1290.
- ⁴³ MAREE, S. E., PHILLIPS, D., NYOKONG, T. Synthesis, photophysical and photochemical studies of germanium and tin phthalocyanine complexes. *J. Porphyrins Phthalocyanines*, 2002, vol. 6, pp. 17- 25.
- ⁴⁴ KOLB, H. C., FINN, M. G., SHARPLESS, K. B. Click chemistry: diverse chemical function from a few good reactions. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2001, vol. 40, pp. 2204-2021.
- ⁴⁵ HEIN, D. C., LIU, X.-M., WANG, D. Click chemistry, a powerful tool for pharmaceutical science. *Pharm. Res.*, 2008, vol.25, no.10, pp. 2216-2230.
- ⁴⁶ KOLB, H. C., SHARPLESS, K. B. The growing impact of click chemistry on drug discovery. *Drug Discov. Today*, 2003, vol. 8, pp. 1128-1137.
- ⁴⁷ HUISGEN, R. 1,3-Dipolar cycloadditions. *Angew. Chem.*, 1963, vol. 75, pp. 604-637.
- ⁴⁸ SAXON, E., BERTOZZI, C. R. Cell surface engineering by a modified Staudinger reaction. *Science*, 2000, vol. 287, pp. 2007-2010.
- ⁴⁹ ROSTOVTSEV, V. V, GREEN, L. G, FOKIN, V. V., SHARPLESS, K. B. A stepwise Huisgen cycloaddition process: Copper(I)-catalyzed regioselective "ligation" of azides and terminal alkynes. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2002, vol. 41, pp. 2596-2599.
- ⁵⁰ BOCK, V. D., HIEMSTRA, H., MAARSEVEEN, J. H.-V. CuI-Catalyzed alkyne-azide "click" cycloadditions from a mechanistic and synthetic perspective. *Eur. J. Org. Chem.*, 2006, pp. 51–68.
- ⁵¹ GOTHELF, K. V., JORGENSEN, K. A. Asymmetric 1,3-dipolar cycloaddition reactions. *Chem. Rev.*, 1998, vol. 98, pp. 863-909.

-
- ⁵²KATRITZKY, A. R., SINGH, S. K. Synthesis of C-carbamoyl-1,2,3-triazoles by microwave-induced 1,3-dipolar cycloaddition of organic azides to acetylenic amides. *J. Org. Chem.*, 2002, vol. 67, pp. 9077-9079.
- ⁵³WANG, Z.-X., QIN, H.-L. Regioselective synthesis of 1,2,3-triazole derivatives via 1,3-dipolar cycloaddition reactions in water. *Chem. Commun.*, 2003, pp. 2450- 2451.
- ⁵⁴HARJU, K., VAHERMO, M., MUTIKAINEN, I., YLI-KAUHALUOMA, J. Solid-phase synthesis of 1,2,3-triazoles via 1,3-dipolar cycloaddition. *J. Comb. Chem.*, 2003, vol. 5, pp. 826-833.
- ⁵⁵BASTIDE, J., HENRI-ROSSEAU, O. Interpretation of orientation of 1,3-dipolar cycloadditions - application to alkynes. *Bull. Soc. Chim. Fr.*, 1973, pp. 2294-2296.
- ⁵⁶STEPANOVA, N. P., ORLOVA, V. A., GALISHEV, V. A., TURBANOVA, E. S., PETROV, A. A. 1,3-dipolar addition of aromatic azides to fluoro-containing acetylenes and diacetylenes. *Zh. Org. Khim.*, 1985, vol. 21, pp. 979-983.
- ⁵⁷RODIONOV, V. O., FOKIN, V. V., FINN, M. G. Mechanism of the ligand-free CuI-catalyzed azide-alkyne cycloaddition reaction. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2005, vol. 44, pp. 2210–2215.
- ⁵⁸TORNØE, C. W., CHRISTENSEN, C., MELDAL, M. Peptidotriazoles on solid phase: [1,2,3]-triazoles by regiospecific copper(I)-catalyzed 1,3-dipolar cycloadditions of terminal alkynes to azides. *J. Org. Chem.*, 2002, vol. 67, pp. 3057–3064.
- ⁵⁹ORGUERIA, H. A., FOKAS, D., ISOME, Y., CHANE, P. C.-M., BALDINO, C. M. Regioselective synthesis of [1,2,3]-triazoles catalyzed by Cu(I) generated in situ from Cu(0) nanosize activated powder and amine hydrochloride salts. *Tetrahedron Lett.*, 2005, vol. 46, pp. 2911–2914.
- ⁶⁰ZHAN, W. H., BARNHILL, H. N., SIVAKUMAR, K., TIAN, H., WANG, Q. Synthesis of hemicyanine dyes for ‘click’ bioconjugation. *Tetrahedron Lett.*, 2005, vol. 46, pp. 1691–1695.
- ⁶¹GOLAS, P. L., TSAREVSKY, N. V., SUMERLIN, B. S., MATYJASZEWSKI, K. Catalyst performance in “click” coupling reactions of polymers prepared by ARTP: ligand and metal effects. *Macromolecules*, 2006, vol. 39, pp. 6451–6457.
- ⁶²KLIER, K. Transition-metal ions in zeolites: the perfect surface sites. *Langmuir*, 1988, vol. 4, pp. 13–25.
- ⁶³MARCUS, B. K., CORMIER, W. E. Going green with zeolites. *Chem. Eng. Progr.*, 1999, vol. 95, pp. 47–53.

-
- ⁶⁴ WHITTINGHAM, S. *Synthesis and Characterization of the Zeolite ZSM-5* [online]. 2010 [cit. 29-04-2010]. Dostupné z: <http://imr.chem.binghamton.edu/labs/zeolite/zeolite.html>
- ⁶⁵ ZHANG, L. L., CHEN, X., XUE, P., SUN, H. H. Y., WILLIAMS, I. D., SHARPLESS, K. B., FOKIN, V. V., JIA, G. Ruthenium-catalyzed cycloaddition of alkynes and organic azides. *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, vol. 127, pp. 15998–15999.
- ⁶⁶ TRON, G. C., PIRALI, T., BILLINGTON, R. A., CANONICO, P. L., SORBA, G., GENAZZANI, A. A. Click chemistry reactions in medicinal chemistry: applications of the 1,3-dipolar cycloaddition between azides and alkynes. *Med. Res. Rev.*, 2007, vol. 28, pp. 278–308.
- ⁶⁷ HORNE, W. S., YADAV, M. K., STOUT, C. D., GHADIRI, M. R. Heterocyclic peptide backbone modifications in an alpha-helical coiled coil. *J. Am. Chem. Soc.*, 2004, vol. 126, pp. 15366–15367.
- ⁶⁸ PALMER, M. H., FINDLAY, R. H., GASKELL, A. J. Electronic charge-distribution and moments of 5-membered and 6-membered heterocycles. *J. Chem. Soc.*, 1974, vol. 4, pp. 420–428.
- ⁶⁹ ALVAREZ, R., VELAZQUEZ, S., SAN-FELIX, A., AQUARO, S., DE CLERCQ, E., PERNO, C.-F., KARLSSON, A., BALZARINI, J., CARMARASA, M. J. 1,2,3-triazole-[2',5'-bis-o-(tert-butyl)dimethylsilyl]-beta-d-ribofuranosyl]-3'-spiro-5''-(4''-amino-1'',2''-oxathiol 2'',2''-dioxide) (tsao) analogs - synthesis and anti-hiv-1 activity. *J. Med. Chem.*, 1994, vol.37, pp. 4185–4194.
- ⁷⁰ BROCKUNIER, L. L., PARMEE, E. R., OK, H. O., CANDELORE, M. R., CASCIERI, M. A., COLWELL, L. F., DENG, L., FEENEY, W. P., FORREST, M. J., HOM, G. J., MACINTYRE, D. E., TOTA, L., WYVRATT, M. J., FISHER, M. H., WEBER, A. E. Human beta 3-adrenergic receptor agonists containing 1,2,3-triazole-substituted benzenesulfonamides. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2000, vol.10, pp. 2111–2114.
- ⁷¹ GENIN, M. J., ALLWINE, D. A., ANDERSON, D. J., BARBACHYN, M. R., EMMERT, D. E., GARMON, S. A., GRABER, D. R., GREGA, K. C., HESTER, J. B., HUTCHINSON, D. K., MORRIS, J., REISCHER, R. J., FORD, C. W., ZURENKO, G. E., HAMEL, J. C., SCHAADT, R. D., STAPERT, D., YAGI, B. H. Substituent effects on the antibacterial activity of nitrogen-carbon-linked (azolylphenyl)oxazolidinones with expanded activity against the fastidious gram-negative organisms *Haemophilus influenzae* and *Moraxella catarrhalis*; *J. Med. Chem.*, 2000, vol.43, pp. 953–970.
- ⁷² TULLIS, J. S., VAN-RENS, J. C., NATCHUS, M. G., CLARK, M. P., DE, B., HSIEH, L. C., JANUSZ, M. J. The development of new triazole based inhibitors of tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) production. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2003, vol.13, pp. 1665–1668.
- ⁷³ CUNHA, A. C., FIGUEIREDO, J. M., TRIBUTINO, J. L. M., MIRANDA, A. L. P., CASTRO, H. C., ZINGALI, R. B., FRAGA, C. A. M., DE SOUZA, M. C. B. V., FERREIRA, V. F., BARREIRO, E. J. Antiplatelet properties of novel N-substituted-

phenyl-1,2,3-triazole-4-acylhydrazone derivatives. *Bioorg. Med. Chem.*, 2003, vol. 11, pp. 2051–2059.

⁷⁴ HIMO, F., LOVELL, T., HILGRAF, R., ROSTOVTSEV, V. V., NOODLEMAN, L., SHARPLESS, K. B., FOKIN, V. V. Copper(I)-catalyzed synthesis of azoles. DFT study predicts unprecedented reactivity intermediates. *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, vol. 127, pp. 210–216.

⁷⁵ HORNE, W.S., STOUT, C.D., GHADIRI, M.R. A heterocyclic polymer nanotube. *J. Am. Chem. Soc.*, 2003, vol. 125, pp. 9372–9376.

⁷⁶ WU, P., FOLKIN, V.V. Catalytic Azide-Alkyne Cycloaddition: Reactivity and Applications. *Aldrichimica Acta*, 2007, vol. 40, no. 1.

⁷⁷ ETRYCH, T. Polymerními cytostatiky proti solidním nádorům. *Medical Tribune* 2009 [online] [cit. 03-05-2010] Dostupné z: <http://www.tribune.cz/clanek/13469>.

⁷⁸ PANYAM, J., LABHASETWAR, V. Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2003, vol. 55, pp. 329–347.

⁷⁹ KATZ, E., WILLNER, I. Integrated nanoparticle-biomolecule hybrid systems: synthesis, properties, and applications. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2004, vol. 43, pp. 6042–6108.

⁸⁰ COUVREUR, P., BARRATT, G., FATTAL, E., LEGRAND, P., VAUTHIER, C. Nanocapsule technology: a review. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, 2002, vol. 19, pp. 99–134.

⁸¹ ZIMCIK, P., MILETIN, M., NOVAKOVA, V., KOPECKY, K., NEJEDLA, M., STARA, V., SEDLACKOVA, K. Effective monofunctional azaphthalocyanine photosensitizers for photodynamic therapy. *Aust. J. Chem.*, 2009, vol. 62, pp. 425–433.