

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



Diplomová práce

Syntéza substituovaných pyrazino[2,3-b]pyrazinů jako prekurzorů azaftalocyaninů



Hradec Králové 2014

René Šebl

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpal, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové dne 12.5.2014

Podpis:

Rád bych poděkoval Doc. PharmDr. Petru Zimčíkovi, Ph.D. za cenné rady při práci v laboratoři a pomoci při vypracování mé diplomové práce. Dále bych poděkovat ostatním pracovníkům AzaPcgroup za jejich rady a pomoc při práci v laboratoři.

Za finanční podporu děkuji projektu SVV 260 062 a grantové agentuře Univerzity Karlovy v Praze (grant č. 1182313/2013)

Obsah

Seznam zkratk	6
ABSTRAKT	7
ABSTRACT.....	8
Cíl práce	9
Teoretická část	10
Historie fotodynamické terapie	10
Fotofyzikální princip fotodynamické terapie	11
Působení PDT na organismus	12
Apoptóza a nekróza	12
Působení na cévy	13
Účinek PDT na imunitní buňky.....	13
Průnik světla tkáněmi	14
Fotosenzitizéryv PDT.....	14
Přehled fotosenzitizérů	14
Chemické struktury fotosenzitizérů.....	15
Lokalizace fotosenzitizérů.....	17
Vlastnosti ideálního fotosenzitizéru	19
Metodologická část	20
Příprava prekurzorů.....	20
Syntéza tetra(pyrazinopyrazino)porfyrasinů.....	23
Experimentální část.....	25
Příprava 5,6-diamino-pyrazin-2,3-dikarbonitrilu(8)	25
Příprava6,7-dioxo-5,8-dihydropyrazino[2,3-b]pyrazin-2,3-dikarbonitrilu (9)	26
Příprava 6,7-dichlorpyrazino[2,3-b]pyrazin-2,3-dikarbonitrilu (10)	26
Příprava 6,7-bis(2,6-diisopropylfenoxy)pyrazino[2,3-b]pyrazin-2,3-dikarbonitrilu (11)	27
Příprava 6,7-bis(diethylamino)pyrazino[2,3-b]pyrazin-2,3-dikarbonitrilu (12)	27

Příprava 6,11,11,-trimethyl-6,7,8,9-tetrahydro-6,9- methanopyrazino[2,3b]chinoxalin- 2,3-dikarbonitrilu (13).....	28
Příprava 3,4,12,13,21,22,30,31-oktakis(2,6-diisopropylfenyloxy)- 1,2,5,6,10,11,14,15,19,20,23,24,28,29,32,33-hexadekaaza- naftalocyaninato zinečnatého komplexu (14)	29
Příprava 3,4,12,13,21,22,30,31-oktakis(diethylamino)-1,2,5,6,10,11,14,15,19, 20,23,24,28,29,32,33-hexadekaaza-naftalocyaninato lithného komplexu (15)	30
Příprava 3,4,12,13,21,22,30,31-oktakis(2,6-diisopropylfenyloxy)- 1,2,5,6,10,11,14,15,19,20,23,24,28,29,32,33-hexadekaaza-naftalocyaninato hořečnatého komplexu (16).....	31
Výsledky a diskuze	32
Příprava prekurzorů.....	32
Cyklotetramerizace prekurzorů	35
Závěr	39
Seznam použité literatury	40

Seznam zkratek

ALA	kyselina 5-aminolevulová
AzaPc	azaftalocyaniny
DMF	dimethylformamid
HpD	hematoporfyrinové deriváty
M-ALA	methylester kyseliny 5-aminolevulové
PDT	fotodynamická terapie
PpIX	protoporfyrin
PS	fotosenzitizér
TLC	tenkovrstvá chromatografie
THF	tetrahydrofuran

ABSTRAKT

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

KATEDRA FARMACEUTICKÉ CHEMIE A KONTROLY LÉČIV

Jméno: René Šebl

Školitel: Doc. PharmDr. Petr Zimčák, Ph.D

Název práce: Syntéza substituovaných pyrazino[2,3-*b*]pyrazinů jako prekurzorů azaftalocyaninů

Téma mé diplomové práce byla syntéza azaftalocyaninů obsahujících pyrazinopyrazinovou jednotku. Tyto molekuly byly dosud publikovány pouze v několika málo publikacích. Jelikož jsou tyto molekuly rozšířeny o jedno pyrazinové jádro na každé jednotce, dochází k rozšíření konjugovaného systému vazeb, což vede k zvýšené absorpci ve vyšších oblastech viditelného spektra.

V prvním kroku jsem se soustředil na syntézu prekurzorů pro následnou cyklotetramerizaci. Společnou molekulou pro přípravu různých prekurzorů je 6,7-dichlorpyrazino[2,3-*b*]pyrazin-2,3-dikarbonitril. Následnou nukleofilní substitucí byly připraveny různé molekuly vázané přes heteroatomy, jako je kyslík nebo dusík. Další možností přípravy prekurzorů, kterou jsem zkoušel je kondenzace 5,6-diaminopyrazin-2,3-dikarbonitrilu s alifatickým diketonem. Ovšem tento pokus nevedl k úspěšné přípravě daného prekurzoru.

Ve druhém kroku byly provedeny pokusy o cyklotetramerizaci různých prekurzorů. Podařilo se nám cyklotetramerizovat pouze jeden prekurzor a to 6,7-bis(2,6-diisopropylfenoxy)-pyrazino[2,3-*b*]pyrazin-2,3-dikarbonitril. Z ostatních prekurzorů se nám nepodařilo připravit příslušný azaftalocyanin.

ABSTRACT

CHARLES UNIVERSITY IN PRAGUE

FACULTY OF PHARMACY IN HRADEC KRÁLOVÉ

DEPARTMENT OF PHARMACEUTICAL CHEMISTRY AND DRUG CONTROL

Name: René Šebl

Supervisor: Doc. PharmDr. Petr Zimčík, Ph.D

Title of the thesis: Synthesis of pyrazino[2,3-*b*]pyrazines - azaphthalocyanine precursors

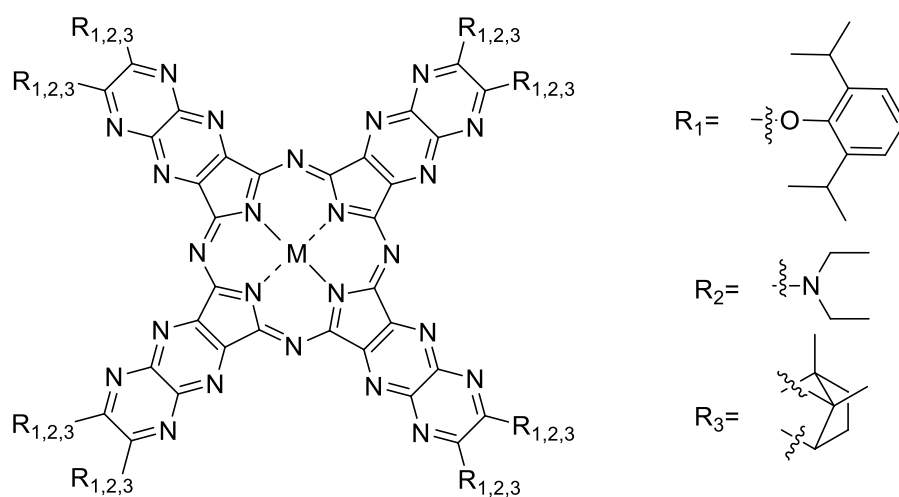
The topic of my thesis was synthesis of azaphthalocyanines containing pyrazinopyrazine units. These molecules have been published only in few publications till now. Since these molecules are extended by one pyrazine nucleus on each unit, their extended conjugation leads to an increased absorption in the higher regions of the absorption spectrum.

In the first step, I focused on the synthesis of precursors for subsequent cyclotetramerization. Starting compound for the preparation of various precursors was 6,7-dichloropyrazino [2,3-*b*] pyrazine-2,3-dicarbonitrile. It underwent nucleophilic substitution leading to products substituted with various substituents attached *via* heteroatoms such as oxygen or nitrogen. Another option is the condensation of 5,6-diaminopyrazine-2,3-dicarbonitrile with appropriate diketone. This attempt did not lead to the successful preparation of the precursor.

The precursors were subsequently cyclotetramerized to corresponding macrocycles. We succeeded only with one precursor 6,7-bis(2,6-diisopropylphenoxy)pyrazin[2,3-*b*] pyrazine-2,3-dicarbonitrile. We have failed with the other precursors to prepare appropriate azaphthalocyanine.

Cíl práce

Podstatná část dobře fungující fotodynamické terapie je průchod světla o určité vlnové délce tkáněmi. Nejlépe prochází světlo o vlnové délce 700 nm a více. Cíl mé práce bylo nasyntetizovat azaftalocyanin s absorpcí světla o této vlnové délce. Jako základní jednotka těchto AzaPc byl pyrazinopyrazin s různými substituenty vázanými přes rozdílné (hetero)atomy (Obr. 1).



Obrázek 1- Cílové struktury AzaPc

Teoretická část

Ve fotodynamické terapii (PDT) se využívá vhodných fotosenzitizérů (PS) v kombinaci se světlem o určité vlnové délce k tvorbě singletového kyslíku, který je hlavním nositelem účinku. Princip této metody je znám už téměř sto let, ale až poslední dobou pro ni bylo nalezeno vhodné využití. Jedná se o neinvazivní léčbu benigních i maligních nádorových onemocnění, popřípadě i jiných onemocnění.

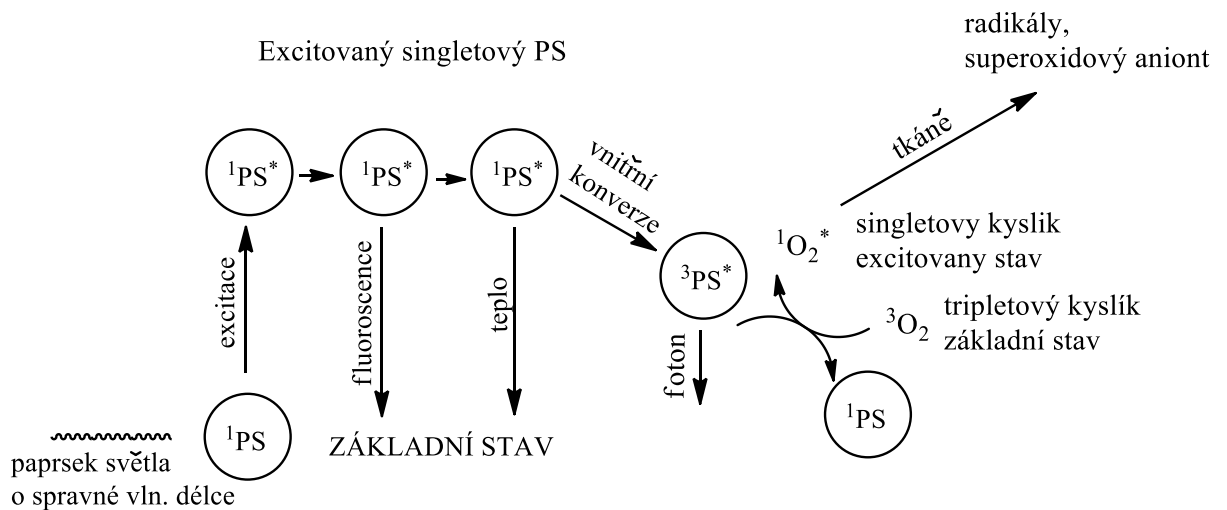
Historie fotodynamické terapie

První pozorování účinku světla ve spojení s PS provedl Raab v roce 1900 ve své laboratoři, při použití akridinu při studiu prvoků rodu *Paramecium*¹. Po ozáření světlem došlo k jejich usmrcení². V roce 1920 Policard³ zjistil, že nádorová tkáň je podstatně více fluorescenční než tkáň zdravá. Další výzkum následoval v letech 1940 a 1960, kdy Figge a spol.^{4,5,6} a Rasmussen-Taxdal⁷ a spol. podali pacientům a zvířatům s nádorovým onemocněním přírodní porfyriny a pokusili se zjistit jejich lokalizaci v těle pomocí fluorescence. Také syntetické porfyriny byly zkoumány pro detekci nádorových ložisek. V šedesátých letech je použil Winkelmann pro detekci nádorové tkáně. V návaznosti na to v roce 1960 Samuel Schwartz vyizoloval ze směsi derivátů hematoporphyrinu látky, které se ve zvýšené míře kumulovaly v nádorech. Ty pak přejmenoval na tzv. „hematoporphyrinové deriváty“ (HpD). Výzkumu lokalizace nádorové tkáně v těle se věnoval v 60. letech na MayoClinic také Richard Lipson. Lipson při prvních pokusech zjišťoval, jak lokalizovat nádorovou tkáň v těle pomocí detekce fluorescence hematoporphyrinu. Tyto pokusy byly neúspěšné. V další sérii pokusů se věnoval HpD. Použil je jako detekční látku⁸ pro nádorovou tkáň. Při tom zjistil, že by se tyto látky daly použít ke zničení nádorové tkáně. V roce 1970 Dougherty a spol. znovuobjevil, že fluorescein může zničit nádorové buňky *in vitro*⁹. Použil fluorescein na léčbu nádorové tkáně a zjistil, že funguje jako PS. Zároveň s tím Weisthaup a spol. zjistili, že aktivní látkou je singletový kyslík. Po dalších pokusech došli ke zjištění, že nevýhodou fluoresceinu je jeho nízká produkce singletového kyslíku a maximální absorpce světla je v zelené oblasti viditelného spektra, což není dostatečné k průniku do tkání. Z tohoto důvodu se dále věnovali výzkumu porfyrinových PS, které mají lepší fotofyzikální a fotochemické vlastnosti. Několik následujících let zkoumali a čistili aktivní složky HpD a výsledkem bylo zavedení prvního fotosenzitizéru do klinické praxe pod názvem porfimer sodný (přípravek Photofrin[®]). Tato látka je dnes používána k léčbě mnoha druhů rakoviny po celém světě. V současnosti stále pokračuje vývoj nových látek

používaných v PDT, které by měli lepší vlastnosti, co se týče účinnosti, bezpečnosti, absorpce světla o v hodné vlnové délce atd.

Fotofyzikální princip fotodynamické terapie

Principem působení PDT je tvorba singletového kyslíku². Ten pak způsobuje v buňce řadu pochodů, které vedou ke zničení buňky. Po ozáření PS světlem o vhodné vlnové délce dojde k jeho excitaci¹⁰. V excitovaném singletovém stavu je PS velmi energeticky bohatý a existuje jen několik málo nanosekund. V tomto stavu se PS může zbavit energie fluorescencí, což je možno využít ke studiu farmakokinetiky a pohybu PS, případně k lokalizaci nádorových ložisek. Další možností deaktivace excitovaného stavu je vnitřní konverze a přeměna energie na teplo. Tato deaktivací cesta nemá pro terapii výraznější význam. A poslední možností relaxace excitovaného singletového stavu je vnitřní konverze na tripletový stav, ve kterém molekula může existovat po delší dobu až několika mikrosekund^{11, 12}. Dojde k přetočení spinu jednoho z vnějších elektronů a molekula má obsazeny dva orbitály elektrony se spinem ve stejném směru¹³. PS v tripletovém stavu podléhá dvou typům fotoreakcí. Při fotoreakci typu 1, skrze elektronový nebo vodíkový přenos, vede k produkci volných radikálů nebo iontových radikálů. Ty dále reagují s volným kyslíkem za vzniku hydroxylových radikálů (H_2O_2 , O_2^-), které reagují s různými organelami v buňce¹⁴. Další možností je předání energie přímo kyslíku v základním stavu za vzniku singletového kyslíku a tato fotoreakce je označován jako typ 2¹⁵. Obě tyto reakce většinou probíhají simultánně, ale poměr mezi typem 1 a typem 2 je určen PS, množstvím kyslíku a koncentrací substrátu¹⁶. Celé toto schéma zobrazuje Jablonského diagram (Obr. 2)¹⁷.



Obrázek 2–Jablonského diagram, ^1PS - fotosenzitizér v základním stavu; $^1\text{PS}^*$ - fotosenzitizér v excitovaném stavu; $^3\text{PS}^*$ - fotosenzitizér v excitovaném stavu s obráceným spinem.

Působení PDT na organismus

PDT působí na organismus třemi základními mechanismy. První z nich je přímé působení reaktivních forem kyslíku přímo na nádorové buňky. Buňka nakonec umírá buď apoptózou a nekrotózou^{18,19}. Další mechanismus zahrnuje působení na cévní systém, který zásobuje kyslíkem a živinami nádorové buňky. V posledním případě se jedná o aktivaci imunitního systému organismu. Tyto tři rozdílné mechanismy mohou působit současně nebo také ovlivňovat sebe navzájem. Také různé mechanismy mohou působit na různé druhy nádorů. Tyto vztahy nejsou ještě úplně vysvětlené.

Apoptóza a nekróza

Oba tyto mechanismy vedou k destrukci nádorové buňky¹⁹. Při nekrotóze dochází k násilné destrukci buňky. Jedná se o nefyziologický proces poškození buněk ať mechanicky, chemicky či jinou cestou. Dochází k rozpouštění jádra, rozpadu organel a cytoplazmatické membrány. Tento proces je provázen proteolytickou aktivitou poškozující okolní tkáň. Následkem tohoto procesu dochází k uvolnění enzymů z poškozené buňky do okolí tkáň, které vedou k zánětu v okolí nekrotizující tkáň.

Apoptóza je řízený rozpad jednotlivé buňky. Je řízena specifickým genem, který je zodpovědný pouze za řízení usmrcení buňky. Dochází k rozdělení buňky na více částí, které jsou pak pohlceny makrofágy a tím nedochází k zánětu v okolí buňky. Tento proces trvá delší dobu než nekrotóza. Oba tyto procesy smrti buňky probíhají při PDT

současně, ale každý z nich může být při dané léčbě v převaze. Tato skutečnost záleží na druhu nádoru, typu PS a v neposlední řadě jedince, který je touto cestou léčen a to z důvodu rozdílné genetické výbavy jedince.

Po určité době od zveřejnění těchto fakt se prokázalo, že buňka může umírat i jinými cestami např.: mitotickou smrtí²⁰ buňky nebo programovatelnou nekrotózou²¹. Je tedy třeba brát v potaz i tyto možnosti.

Působení na cévy

Tento mechanismus nezahrnuje přímé působení na nádorové buňky, ale působí na cévní systém nádorové tkáně. Výhodou je, že po ukončení PDT, má stále účinek na nádor. Toto je velmi výhodné zvláště při dlouho trvající léčbě²². Tento dlouho trvající účinek může být pozorován při opakované léčbě²³ pomocí PDT, kdy můžeme sledovat nedostatek kyslíku v nádorové tkáni²⁴, což paradoxně může vést i k reverzním účinkům – čili nižší odpovědi na PDT zásah. Různé mechanismy účinků na cévy se většinou liší podle toho, jaký PS byl použit.

Při aplikaci Photofrinu[®] dochází ke konstrikcí cévního řečiště, adhezi leukocytů a tvorbě trombu, zřejmě způsobeného účinkem tromboxanu²⁵. Při terapii PDT, kde PS je tvořen deriváty ftalocyaninů dochází především cévnímu průsaku²⁶. Všechny tyto efekty mohou vést k poškození endotelu. PDT může také způsobit cévní vazokonstrikci prostřednictvím uvolnění nebo inhibice oxidu dusného v endotelu²⁷. Preklinické testy prokázaly, že některé látky, které mají efekt na eikosanoidy např.: indometacin²⁸, snižují reakci nádoru.

Účinek PDT na imunitní buňky

Následující data jsou získány z pokusů *in vitro*. Leukocyty a obzvláště pak aktivované leukocyty jsou na léčbu PDT velmi citlivé a často dochází k jejich poškození nebo destrukci²⁹. Tento objev vedl k využití PDT při léčbě některých autoimunitních onemocnění³⁰. Na druhou stranu makrofágy mohou být aktivovány sníženým zářením z terapie PDT³¹. Tyto makrofágy prokázaly jistou preferenční cytotoxicitu k nádorovým tkáním. Výzkum ukázal, že při léčbě dochází z uvolnění tumor nekrotizujícího faktoru z makrofágů³².

Průnik světla tkáněmi

Základním mechanismem PDT je tvorba reaktivních forem kyslíku (singletový kyslík, radikály), které mají na buňku přímý cytotoxický efekt. Většina PS má své absorpční maximum mezi 640-780 nm. PDT je takto omezoována svojí účinností na ozařované orgány, protože světlo o této vlnové délce nedokáže proniknout hlouběji do těla. Jelikož je dosah účinků reaktivních forem přibližně 0,02 μm , musí být molekula PS přesně zacílena na konkrétní oblast či buňky. Tím je zaručena větší selektivita a snižuje se možnost poškození zdravých buněk a okolních tkání. Ke snížení hloubky zásahu také přispívá rozptyl světla, který nastává po průniku do tkáně. Dalším omezením pro PDT je skutečnost, že lidské tělo není homogenní. Některé látky lidskému tělu vlastní jako je například hemoglobin absorbují světlo o určité vlnové délce. Voda nacházející se v lidském těle také absorbují určité spektrum viditelného světla.

Fotosenzitizéryv PDT

Exogenní nebo endogenní PS jsou molekuly, které absorbují světlo o určité vlnové délce a dochází k produkci singletového kyslíku a k dalším vedlejším reakcím. Exogenní PS jsou podávány především parenterálně, zatím co endogenní PS, protoporfyrin (PpIX), je syntetizován v těle z kyseliny 5-aminolevulové. Pomocí PS dochází ke vzniku singletového kyslíku, což vede k usmrcení buňky.

Přehled fotosenzitizérů

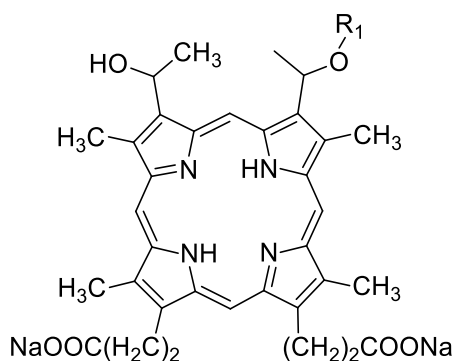
V následující tabulce³³ jsou uvedeny jen základní léčivé přípravky. Samozřejmě existuje mnoho jiných druhů, co se týče chemické struktury např.: hypericin, bromovaný rhodamin³⁴. A účinné látky byly nebo nadále jsou vydávány i pod jinými obchodními názvy.

Název přípravku	Základní skelet	Účinná látka	Absorpční maximum	Ideální čas, kdy PS dosáhne max. konc. v nádorové tkáni	Výrobce
Photofrin®	Porfyrin	Porfimer sodný	630 nm	48 hodiny	AxcanPharma, Inc
Levulan®	Porfyrin	ALA	630 nm	4 hodiny	DUSA pharmaceuticals, Inc.

Metvix [®]	Porfyrin	M-ALA		3 hodiny	PhotoCure ASA
Visudyne [®]	Porfyrin	Verteporfin	690 nm	2-3 hodiny	NovartisPharmaceuticals
Antrin [®]	Texaphyrin	Lutexaphyrin	732 nm	3 hodiny	Pharmacylics
Foscan [®]	Chlorin	Temoporfin	652 nm	3-4 dny	BiolitecPharma Ltd.
LS11	Chlorin	Talaporfin	664 nm	4 hodiny	LightSciences

Chemické struktury fotosenzitizérů

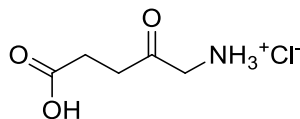
Porfimer sodný



Obrázek 3. Příklad jedné z monomerních jednotek Photofrinu[®]

Jedná se o první registraci PSv PDT (Obr. 3). Nevýhodou tohoto PS³⁵ je relativně nízké absorpční maximum 630 nm a slabý absorpční koeficient 1170 dm³ mol⁻¹ cm⁻¹. Pro účinnou PDT jsou vyžadovány reálně velké dávky PS a delší dobu ozařování. Kumuluje se také v játrech a v kůži, což má za následek zvýšenou fotosenzibilizaci po dobu 4 – 12 týdnů.

Kyselina 5-aminolevulová

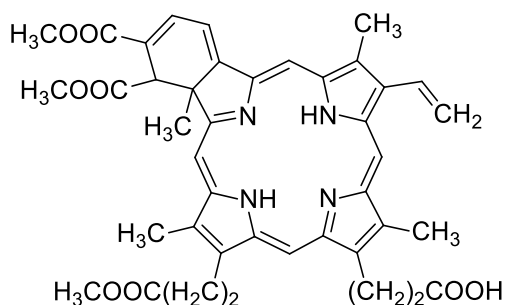


Obrázek 4. 5-aminolevulová kyselina

5-aminolevulinátová kyselina (ALA) (Obr. 4) je pouze prekurzorem³⁶ pro enzymatickou syntézu hemu. V těle dochází k syntéze protoporphyrinu (PpIX), který je účinným PS. V nádoru se nevyskytuje velké množství železa a ferrochelata není tak účinná. To zaručuje, že nedojde k poslednímu kroku přeměny PpIX na hem (ten je fotodynamicky neaktivní). Absorpční maximum PpIX je 630 nm a je dost podobné

HpD. Absorpční koeficient je $5000 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ a z toho vyplývá větší produkce singletového kyslíku než u HpD. Jelikož je poměrně hydrofilní a má tak problém s přestupem přes biologické membrány, bylo připraveno několik esterů např.: methylester - dostupný pod komerčním názvem Metvix[®].

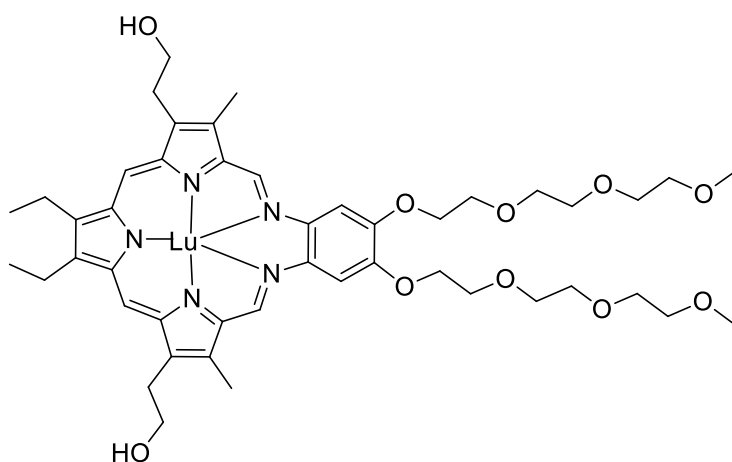
Verteporfin



Obrázek 5. Verteporfin

Verteporfin³⁷ patří do skupiny benzoporphyrinových derivátů. Klinicky je podáván ve formě liposomů. Absorpční maximum verteporfinu (Obr. 5) je posunuto k 690 nm, což umožňuje léčbu mnohem hlouběji v lidském těle. Látka se rychle vstřebává do tkáně, ale i rychle vylučuje z těla. Tím se o hodně snížila fotosenzibilita kůže. Molekula má poměrně velkou selektivitu na neovaskulární cévy, které po ozáření uzavírá. Používá se především v oftalmologii.

Lutexaphyrin

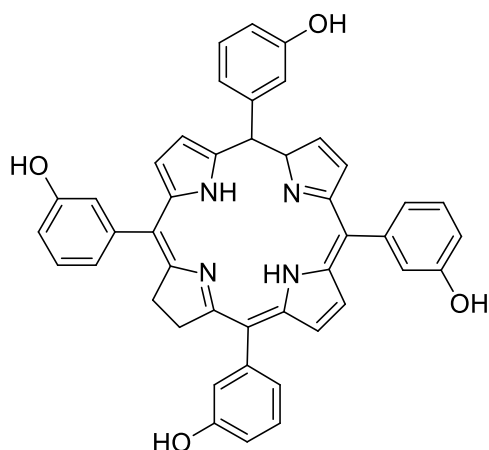


Obrázek 6. Lutetaphyrin

Jedná se o derivát texafyrinu³⁸ (Obr. 6) a v centru je chelatován lutecitý kation. Velkou předností této molekuly je absorpce při 732 nm a toho lze dobře využít při léčbě

hlouběji situovaných lézí. Je poměrně rychle vylučován z těla. Ve světě byl zkoumán pod několika názvy, podle aplikace PS na různé druhy léčby. Lutrin[®] pro onkologické onemocnění nebo Atrin[®] k léčbě kardiovaskulárních onemocnění.

Temoporfin



Obrázek 7. Temoporfin

Temoporfin³⁹ (Obr. 7) patří do skupiny chlorinů. Jeho absorpční maximum je 652 nm. Jeho selektivita mezi nádorovou tkání a zdravou tkání je poměrně malá. Kožní fotosenzitivita se pohybuje mezi 2 – 3 týdny.

Lokalizace fotosenzitizérů

Existuje mnoho teorií o distribuci PS do nádorových tkání, ale ani jedna teorie nevysvětluje všechny vlastnosti PS.

Převážně lipofilní PS jsou po podání intravenózní cestou vázány na lipoproteiny jako je například LDL. Nádorové buňky mají více receptorů pro LDL-proteiny^{40,41,42}. Tím pádem se PS navázaný na lipoproteiny kumuluje více v nádorových buňkách než ve zdravých. Do buňky se přenáší pomocí receptory zprostředkované endocytózy a ukládá se převážně do lipofilních částí nádorové buňky jako je cytoplazma, endoplazmatické retikulum, mitochondrie, atd^{40,42}. Nicméně tato teorie nevysvětluje některé jiné pochody, které se při přenosu PS do buňky dějí. Při pokusech na tkáni *in vitro* se ukázalo, že kumulace PS je u buněk nádorových a buněk zdravých stejná⁴¹.

V případě *in vivo* je situace zcela odlišná. V porovnání s normální lidskou tkání má rychle rostoucí nádorová tkáň zhoršenou krevní mikrocirkulaci a tudíž je hůře prokrvená a má menší přísun živin. V důsledku toho má zvýšenou permeabilitu pro

plazmatické proteiny, zmenšený počet lymfatických cest a väčší intersticiálny priestor. Testy dokázali, že zvýšený transport PS do nádorových buniek a jejich delší setrvání v bunke. PS navázané na lipoproteiny, jsou transportovány do buňky pomocí endocytózy, jak bylo uvedeno výše⁴³.

Ovšem PS, které nejsou navázané na lipoproteiny, mají zcela odlišný vstup do nádorové buňky, většinou se jedná o pasivní difúzi. Výsledkem sníženého prokrvení nádorové tkáně, jsou buňky nuceny využívat anaerobní glykolýzy. To produkuje vysoké množství mléčné kyseliny. Z toho vyplývá, že pH v intersticiu nádorové tkáně je nižší⁴⁴, okolo 6,5pH oproti běžnému pH v těle 7,4. Mnohé PS jsou slabé kyseliny a v tomto lehce kyselém pH se nachází v neionizovaném stavu. Je jim tak usnadněn přestup z intersticia do buňky samotné pasivní difúzí. Jakmile se ocitnou v bunke, kde je pH o něco vyšší, dojde opět k jejich ionizaci. Jsou tak uvězněny v bunke, dokud se extracelulární koncentrace nesníží a dochází k jejich odstranění z buňky jako neutrální molekuly. Nicméně je zde časový rámeček, který stanovuje čas od doby podání volného PS do lidského těla, kdy je koncentrace v nádorové bunke nejvyšší. Tento čas je rozdílný podle daného PS a typu nádoru⁴¹.

Hydrofilní PS jsou navázané na albumin nebo jiné krevní proteiny a jsou shromažďovány v intersticiu nádorových buniek. Díky jejich hydrofilní povaze, nemohou tyto PS prostoupit do buňky pomocí difúze. Avšak malá část prostupuje pomocí endocytózy nebo pinocytózy. Stejně jako u volných PS existuje časový rámeček, kdy je od podání látky koncentrace v nádorové bunke nejvyšší a je jiný pro určitý typ PS a typu nádoru.

Při podání PS je třeba vždy dobře zvážit dobu mezi podáním PS a začátkem ozařování. Pokud se začne s ozařováním příliš brzy, může dojít k poškození okolní tkáně a krevního řečiště v důsledku nedostatečného vstřebání PS. Pokud příliš pozdě, dojde k vyloučení PS z nádorové buňky a výsledek bude stejný jako u předešlého případu. Nicméně není nutné, aby došlo k ozařování při maximální hladině PS v nádorové bunke. Využívá se i mechanismu PS, kdy působí na cévní zásobení tumoru případně na imunitní systém. V tomto případě můžeme využít "vyhladování" nádoru pomocí účinku terapie na cévní oběh.

Vlastnosti ideálního fotosenzitizéru

Efektivita při tvorbě singletového kyslíku a radikálů

Maximální absorpce PS v oblasti 650 – 800 nm

Malá toxicita ještě před ozářením a i při následném vylučování z těla

Selektivita na tkáň nádorové

Rychlá eliminace z těla po odeznění účinku,

Jednoduchá syntéza

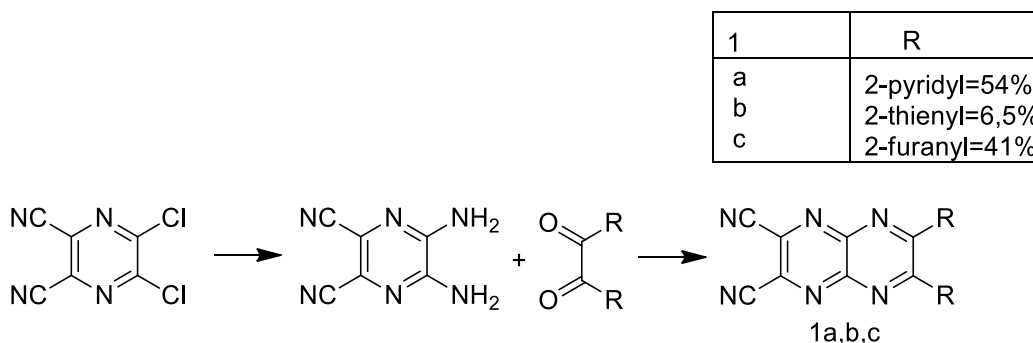
Dostatečná rozpustnost

Metodologická část

Cílem mé práce byla syntéza AzaPc jejichž základní jednotkou je na periferii disubstituovaný pyrazinopyrazin. Hlavním důvodem rozšíření podjednotky AzaPc o další pyrazinový kruh, je rozšíření konjugovaného systému vazeb. Tento rozšířený systém poskytuje možnost absorpce světla o větší vlnové délce než je tomu u AzaPc, které mají pouze jeden pyrazinový kruh. O těchto molekulách bylo ovšem dosud publikováno velice málo článků, a to jak o syntéze prekurzorů (substituovaných pyrazino[2,3-*b*]pyrazin-2,3-dikarbonitrilů) tak o jejich cyklotetramerizaci na makrocycklus.

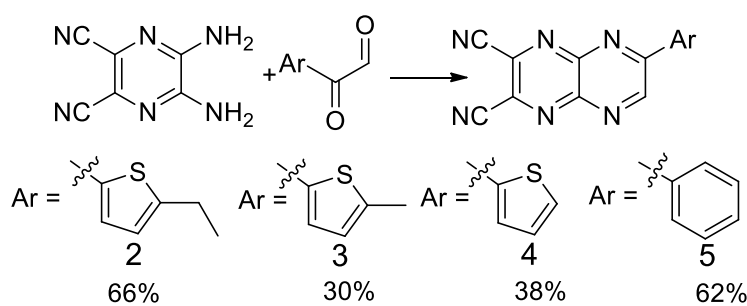
Příprava prekurzorů

Syntéza substituovaných pyrazino[2,3-*b*]pyrazin-2,3-dikarbonitrilů může principiálně vycházet ze dvou metod. Buď je periferní řetězec připojen přes heteroatom nebo pomocí C-C vazby. V prvním případě lze výhodně použít nukleofilní substituci v 6,7-dichlorpyrazino[2,3-*b*]pyrazin-2,3-dikarbonitrilu, která dosud ovšem nebyla popsána. V případě substituentů vázaných C-C vazbou se vychází z kondenzace 5,6-diaminopyrazin-2,3-dikarbonitrilu s příslušným diketonem. Tímto způsobem byly připraveny první takovéto deriváty disubstituované v poloze 6 a 7 pyridin-2-ylem (**1a**), thiofen-2-ylem (**1b**) nebo furan-2-ylem (**1c**) (Obr. 8). Reakce probíhají v kyselém prostředí kyseliny octové a i přes vyšší reakční teplotu (112°C) a dlouhé reakční doby (až 7 dní v případě **1b**) byly výtěžky relativně nižší, zejména pro **1b**. A to i přesto, že v případě nižších homologů, hetaryl disubstituovaných pyrazin-2,3-dikarbonitrilů, byly výtěžky výrazně vyšší.^{45, 46} Dalším problémem u pyrazino[2,3-*b*]pyrazin-2,3-dikarbonitrilů **1b,c** byla jejich nestabilita na světle, která vedlo k postupnému rozkladu.



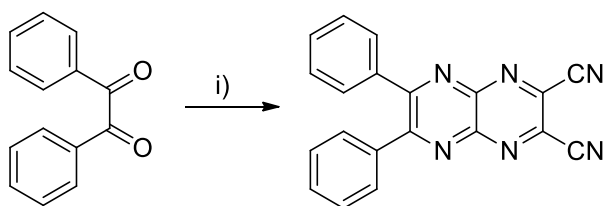
Obrázek 8. schéma syntézy pyrazinopyrazinů⁴⁷

Jedna z možných cest přípravy monosubstituovaných pyrazinopyrazinů je pomocí kondenzace 5,6-diaminopyrazin-2,3-dikarbonilu a příslušných arylglyoxalaldehydů. Aryl glyoxaldehydy jsou substituovány příslušnými heterocykly, jak je zobrazeno na schématu níže (Obr. 9). K syntéze byl zvolen arylglyoxaldehyd na místo ethandionů, který byl použit při syntéze 6,7-diarylpyrazino[2,3-*b*]pyrazin-2,3-dikarbonitrilu (viz výše), a to z důvodu větší reaktivity⁴⁷. Tyto sloučeniny se ukázaly být více stabilní než 6,7-diheteroarylpyrazino[2,3-*b*]pyrazin-2,3-dikarbonitrily **1a-c** (viz výše). Reakce probíhá v prostředí ledové kyseliny octové. Reakční směs byla zahřívána pod zpětným chladičem po dobu 14 hodin. Tímto způsobem byly připraveny čtyři látky, jejichž periferní substituenty jsou 2-ethylthiofen-2-yl (**2**), 2-methylthiofen-2-yl (**3**), thiofen-2-yl (**4**), fenyl (**5**).



Obrázek 9. syntéza monosubstituovaných pyrazinopyrazinů

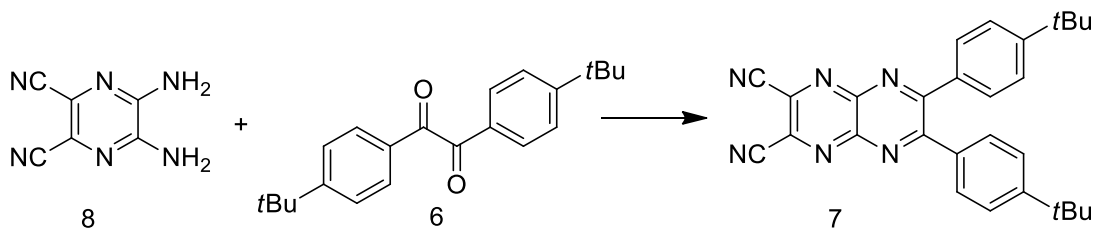
V jiné práci⁴⁸ autoři provedli syntézu disubstituovaného pyrazinopyrazinu, ale s trochu jinými reakčními podmínkami. Jako výchozí látky opět použili 5,6-diaminopyrazin-2,3-dikarbonitril a příslušný diketon (obr. 10). Jako rozpouštědlo byl použit THF. Reakce probíhala za přídavku kyseliny octové pod zpětným chladičem po dobu 4 dnů. Více reakčních podmínek bohužel autoři neuvodli. Tato syntéza je pouze jeden krok ze série syntéz, které autoři používají k přípravě kondenzovaných pyrazinacenů, ovšem i tento prekurzor by mohl být využit k přípravě azafthalocyaninů.



i) = 5,6-diaminokyano-2,3-dikarbonitril,
octová kyselina, THF, 4 dny po zpětným
chladičem

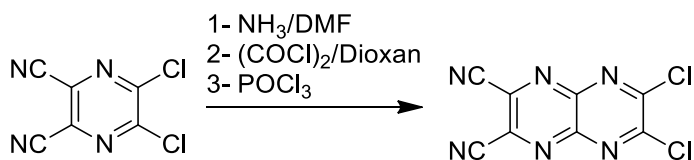
Obrázek 10. 6,7-Difenylypyrazino[2,3-*b*]pyrazin-2,3-dikarbonitril

Výchozí látkou pro syntézu 6,7-bis(4-*terc*-butylfenyl)pyrazino[2,3-*b*]pyrazin-2,3-dikarbonitrilu(7) byl 5,6-diaminopyrazin-2,3-dikarbonitril (8), ke které byl přidán 1,2-bis(4-*terc*-butyl)ethan-1,2-dion (6)(Obr. 11)⁴⁹. Jako reakční prostředí byla použita směs octové kyseliny, bezvodého THF a kyseliny trifluoroctové. Celá reakční směs byla zahřívána k bodu varu pod zpětným chladičem bez přístupu vzdušné vlhkosti. Z reakce byl získán oranžový produkt ve výtěžku 25%.



Obrázek 11. Syntéza 6,7-bis(4-*terc*-butylfenyl)pyrazino[2,3-*b*]pyrazin-2,3-dikarbonitrilu

Jediná zmínka, kde byla tato látka připravena, je uvedena v publikaci⁵⁰, jako jeden z kroků při syntéze dalších látek. Autoři vycházeli z 5,6-dichloropyrazin-2,3-dikarbonitrilu, který následně kondenzoval s oxalylechloridem za vzniku 6,7-dichloropyrazino[2,3-*b*]pyrazin-2,3-dikarbonitrilu. Ten byl dále chlorován. Bohužel autoři neuvedli žádný bližší postup reakce kromě schématu (Obr. 12) ani bližší charakterizaci produktu. Toto může zřejmě úzce souviset s absolutní nerozpustností 6,7-dichloropyrazino[2,3-*b*]pyrazin-2,3-dikarbonitrilu, která se projevila i během mé práce (viz dále Experimentální část).



Obrázek 12. Syntéza 6,7-dichlorpyrazino[2,3-*b*]pyrazin-2,3-dikarbonitrilu

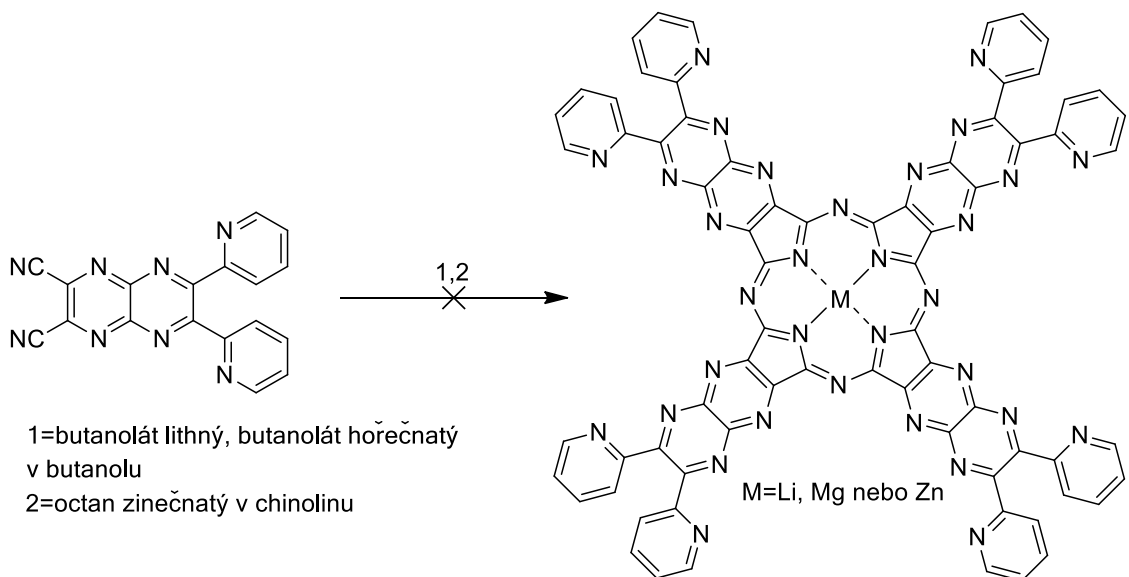
Syntéza tetra(pyrazinopyrazino)porfyrazinů

Pokusy o cyklotetramerizaci pyrazino[2,3-*b*]pyrazin-2,3-dikarbonitriluse vyskytují velice zřídka a ve většině případů jsou neúspěšné.

Při pokusu o cyklotetramerizaci 7-arylpyrazino[2,3-*b*]pyrazin-2,3-dikarbonitrilů (A-D), které jsou uvedeny výše, došlo k vytvoření černé nerozpustné látky, která se autorům nepodařila vyčistit ani charakterizovat. Autoři bohužel neudávají postup cyklotetramerizace kterou zkoušeli⁵¹.

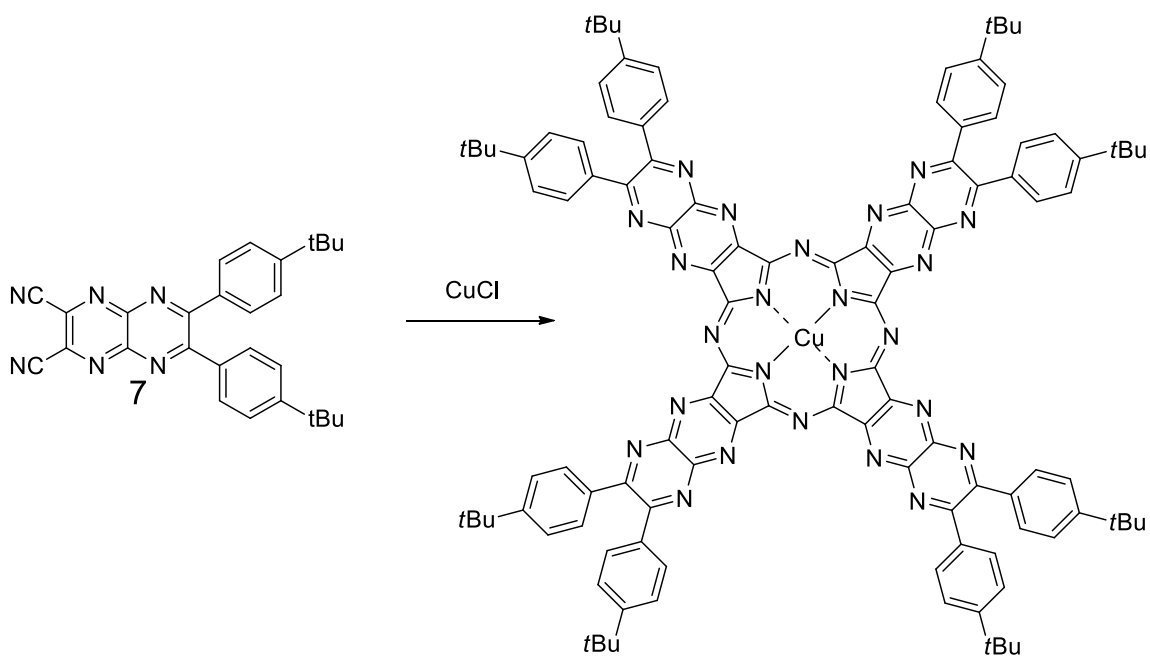
Autoři⁴⁸, kteří pracovali na přípravě pyrazinacenů, vyzkoušeli nesyntetizovat ftalocyaniny z 6,7-difenylypyrazino[2,3-*b*]pyrazin-2,3-dikarbonitrilu. Jejich pokusy vedly ovšem pouze k záměně nitrilové skupiny za alkoxy skupinu z iniciátoru cyklotetramerizace.

Při pokusu o cyklotetramerizaci⁴⁷ 6,7-di(pyridin-2-yl)pyrazino[2,3-*b*]pyrazin-2,3-dikarbonitrilubly vyzkoušeny dvě metody (Obr. 13). Jako první cyklotetramerizační činidla byla použita butanolát lithný nebo butanolát hořečnatý v prostředí butanolu. Tato reakce poskytla světle zelený produkt pouze přechodně a poté se barva reakční směsi změnila na tmavě hnědou. Druhá reakční směs byla složena z výchozí látky a octanu zinečnatého v prostředí chinolinu. Reakční směs byla zahřáta, ale poskytla stejný výsledek jako reakce předešlá. Ani jedna z reakcí nevykázala v UV-vis spektru Q-pás v očekávané oblasti.



Obrázek 13. Cyklotetramerizace 6,7-di(pyridin-2-yl)pyrazino[2,3-*b*]pyrazin-2,3-dikarbonitrilu

Jako jediná úspěšná doposud publikovaná syntéza tetra(pyrazinopyrazino)porfyrinu je práce Songa et al. z roku 2013⁴⁹. K výchozí látce 6,7-bis(4-*tert*-butylfenyl)pyrazino[2,3-*b*]pyrazin-2,3-dikarbonitrilu byl přidán chlorid měďný a katalytické množství tetrahydrátu molybdenanu ammoného v *o*-dichlorbenzenu (Obr. 14). Reakční směs byla zahřívána pod zpětným chladičem bez přístupu vzduchu při teplotě vyšší než 300°C. Produkt měl tmavě zelenou barvu s výtěžkem 45 %.



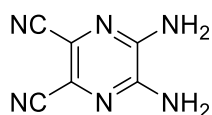
Obrázek 14. Cyklotetramerizace 6,7-bis (4-*tert*-butylfenyl)pyrazino[2,3-*b*]pyrazin-2,3-dikarbonitrilu

Experimentální část

5,6-Dichlorpyrazin-2,3-dikarbonitril byl zakoupeny od firmy TCI Europe, 2,6-diisopropylfenol od firmy Sigma-Aldrich. Použitá rozpouštědla byla zakoupena u firem Penta a Lach-Ner. Tetrahydrofuran pro sloupcovou chromatografii byl predestilován ze sodíku, aby se odstranil stabilizátor BHT. Dimethylformamid bezvodý byl zakoupen od firmy Acros.

Průběh reakcí a čistota produktů byly průběžně kontrolovány pomocí tenkovrstvé chromatografie na deskách Merck Silikagel 60 F254. Detekce byla prováděna UV lampou při vlnové délce 254 nm a 366 nm. Čištění produktů bylo prováděno sloupcovou chromatografií na stacionární fázi MerckKieselgel 60 (0,040-0,063 mm). Mobilní fáze jsou uvedeny u jednotlivých postupů příprav. Teploty tání byly stanovovány na digitálním přístroji ELECTROTHERMAL IA9200. Infračervená spektra byla měřena na přístroji Nicolet 6700 v ATR módu. Analýza ^{13}C a ^1H NMR byla provedena na přístroji Varian Mercury Vx BB 300 nebo VNMR S500. Data elementární analýzy byla získána pomocí přístroje AutomaticMicroanalyser EA1110CE. UV/Vis spektra byla naměřena na Shimadzu UV-2401PC spectrophotometer. MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie byla provedena na přístroji Voyager-DE STR massspectrometer. Za naměřená analytická data bych rád poděkoval Ivě Vencovské (IČ), Věnceslavě Hronové (CHN), doc. PharmDr. Jiřímu Kunešovi, CSc. a Mgr. Zdeňkovi Novákovi (NMR) a PharmDr. Juraji Lenčovi, Ph.D. (MS).

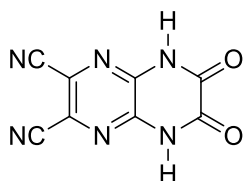
Příprava 5,6-diamino-pyrazin-2,3-dikarbonitrilu(8)



5,6-dichlorpyrazin-2,3-dikarbonitril (6 g, 30 mmol) byl rozpuštěn v dimethylformamidu (50 ml). Ke směsi byl přidán 36% roztok amoniaku (50 ml). Po přidání amoniaku vznikl sytě žlutý roztok a poté žlutá sraženina. Směs byla míchána po dobu 4 hodin při pokojové teplotě. Chlorid amonný byl z roztoku odfiltrován a následně byl odpařen dimethylformamid na rotační vakuové odparce. Produkt byl poté rekrystalizován několikrát z acetonitrilu. Produkt byl odfiltrován a následně vysušen.

Bylo připraveno 3,22 g (67 %) žlutého, pevného krystalického produktu. Látka již byla připravena v laboratoři dříve. Produkt byl porovnán pomocí TLC v soustavě aceton/toluen v poměru 2:1 se standardem dostupným v laboratoři⁵².

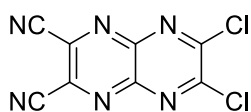
Příprava 6,7-dioxo-5,8-dihydropyrazino[2,3-b]pyrazin-2,3-dikarbonitrilu (9)



5,6-Diamino-2,3-dikyanopyrazinu (3,21 g, 20 mmol) byl suspendován v bezvodém tetrahydrofuranu (50 ml). Směs byla následně ponořena do ultrazvukové lázně na dobu 15 minut. Přidáním oxalychloridu (7,65 g, 60,3 mmol) došlo téměř ihned k reakci a rozpuštění suspenze na čirý roztok. Reakce probíhala za varu pod zpětným chladičem. Po půl hodině bylo rozpouštědlo odpařeno na vakuové odparce. Produkt byl překrytalizován z vody (100 ml). Bylo připraveno 2,63 g (60 %) krystalické látky. Byla provedena TLC v soustavě toluen/aceton/kyselina octová v poměru 7:3,5:1. Látka byla dříve nasynthetizována v laboratoři tímto postupem⁵².

IČ (ATR); ν_{\max} = 3436, 2958, 2241(CN), 1720, 1630, 1577, 1502, 1368, 1308, 1187, 1034

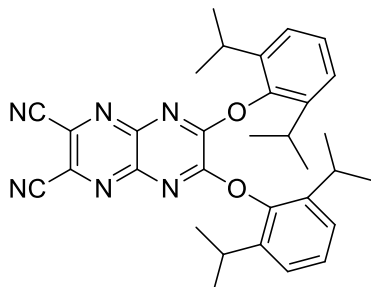
Příprava 6,7-dichlorpyrazino[2,3-b]pyrazin-2,3-dikarbonitrilu (10)



Chloridfosforylu (60 ml, 660 mmol) a látka **9** (3,63 g, 16,9 mmol) byly smíchány za neustálého chlazení vodou a ledem. Následně byl přidán pyridin (6 g, 76 mmol) a směs byla chlazená do ukončení exotermní reakce. Dále se reakční směs míchala při 120 °C pod zpětným chladičem po dobu 6 hodin. Chlorid fosforylu byl poté odpařen pomocí rotační vakuové odparce a produkt byl následně promyt vodou. Získali jsme 3,5 g (82%) hnědé, amorfni látky. Získané množství je ovšem pouze teoretické, protože látka nebyla v ničem rozpustná, a tudíž nebylo možné její vyčištění ani plná charakterizace.

IČ (ATR); $\nu_{\max} = 2220(\text{CN}), 1736, 1726, 1597, 1500, 1371, 1227, 1158, 1126, 1031, 924, 819\text{cm}^{-1}$.

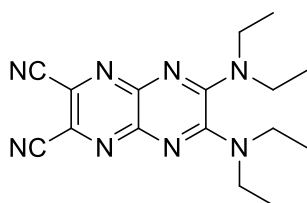
Příprava 6,7-bis(2,6-diisopropylfenoxy)pyrazino[2,3-b]pyrazin-2,3-dikarbonitrilu (11)



Propofol (445,7 mg, 2,5 mmol) byl rozpuštěn v tetrahydrofuranu (50 ml) a poté byl přidán 1M roztok hydroxidu sodného (2,6 mmol). K této reakční směsi byla přidána látka **10** (251 mg, 1 mol) suspendovaná v THF. Reakce proběhla téměř okamžitě, což bylo indikováno plným rozpuštěním suspenze. Reakce probíhala dále po dobu 30 minut při teplotě 25°C a následně bylo rozpouštědlo odpařeno na rotační vakuové odparce. Zbytek v baňce byl poté promyt vodou. Produkt byl poté rozpuštěn v chloroformu a vytřepán s vodou. Organická fáze byla vysušena pomocí síranu sodného, zfiltrována a poté odpařena pomocí rotační vakuové odparky. Po vytřepání byla látka čištěna sloupcovou chromatografií a jako mobilní fáze byl použit toluen. Po vyčištění byl produkt rekrystalizován ze směsi aceton/hexan. Bylo získáno 0,26g (49%) žlutého, krystalického produktu.

T. t. 279,5 – 280,5 °C za rozkladu. Elementární analýza. (%) pro $\text{C}_{32}\text{H}_{34}\text{N}_6\text{O}_2$: C 71,89; H 6,41; N 15,72; nalezeno: C 72,24; H 6,78; N 15,85. IČ (ATR); $\nu_{\max} = 2968, 2870, 2243, 1608, 1553, 1499, 1407, 1265, 1141, 1089, 999, 852\text{cm}^{-1}$. ^1H NMR (500MHz, CDCl_3) δ (ppm) 7,41-7,36 (m, 2H, ArH); 7,33-7,30 (m, 4H, ArH); 2,91 (hept, 4H, $J=6,9\text{Hz}$, CH); 1,35-1,26 (m, 12H, CH_3), 1,25-1,18 (m, 12H, CH_3). ^{13}C NMR (125MHz, CDCl_3) δ (ppm) 22,4; 23,8; 28,2; 112,6; 124,8; 127,9; 130,6; 139,3; 144,1; 146,6; 155,3.

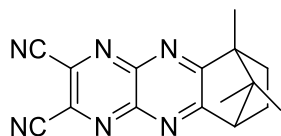
Příprava 6,7-bis(diethylamino)pyrazino[2,3-b]pyrazin-2,3-dikarbonitrilu (12)



Látka **10** (1,00 g, 3,9 mmol) byla suspendována v tetrahydrofuranu (20 ml) a následně byl přidán *N,N*-diethylamin (1,74 g, 5,4 mmol). Ihned po přidání došlo k rozpuštění suspenze a ke změně barvy na žlutou. Reakční směs byla dále míchána pod zpětným chladičem při teplotě 78 °C po dobu 3 hodin. Reakce byla sledována pomocí tenkovrstvé chromatografie. Jako mobilní fáze byla použita směs ethyl-acetát/hexan v poměru 3:1. Následně byl ze směsi odfiltrován hydrochlorid diethylaminu za sníženého tlaku a čirý roztok po filtraci byl odpařen na rotační vakuové odparce. Produkt byl dále přečištěn pomocí sloupcové chromatografie na silikagelu. Byla použita mobilní fáze ethyl-acetát/chloroform v poměru 1:7. Nakonec byla provedena rekrystalizace produktu z ethyl-acetátu. Bylo získáno 1,1 g (85 %) žluté krystalické látky.

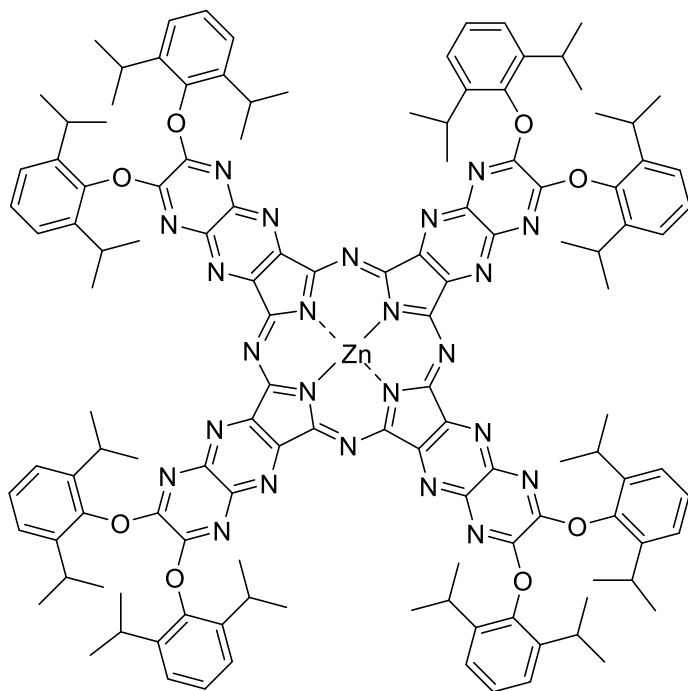
T. t. 242,9 – 243,7. Elementární analýza. (%) pro C₁₆H₂₀N₈: C 59,24; H 6,21; N 34,54; nalezeno: C 59,17; H 6,71 N 34,68. IČ (ATR) ν_{\max} = 2977; 2935; 2230; 1568; 1527; 1500; 1425; 1346; 1306; 1280; 1195; 1089; 1080; 1026; 1000 cm⁻¹. ¹HNMR (300MHz, CDCl₃) δ (ppm) 3,75 (q, 8H, *J*=7,1Hz, CH₂); 1,25 (t, 12H, *J*=7,1Hz, CH₃). ¹³CNMR (75MHz, CDCl₃) δ (ppm) 13,3; 44,0; 114,3; 125,9; 144,0; 148,5.

Příprava 6,11,11-trimethyl-6,7,8,9-tetrahydro-6,9-methanopyrazino[2,3b]chinoxalin-2,3-dikarbonitrilu (13)



K látce **8** (80 mg, 0,58 mmol) byl přidán kamforchinon (90 mg, 0,56 mmol). Reakce probíhala v prostředí kyseliny octové 96% (5 ml) po dobu 48 hodin pod zpětným chladičem. Reakce byla sledována pomocí tenkovrstvé chromatografie, jako mobilní fáze byla použita směs chloroform/aceton/toluen v poměru 2:1:1. Na základě tenkovrstvé chromatografie bylo zjištěno, že reakce vůbec neprobíhá. Ke změně nedošlo ani po následném přidání 35% HCl (1,5 ml)

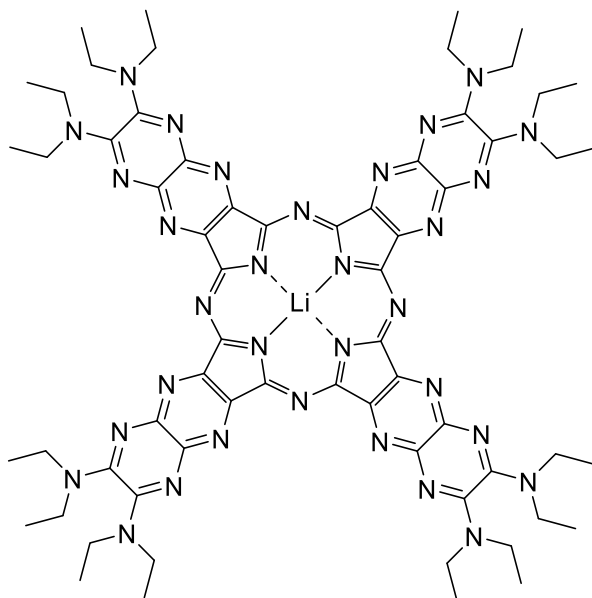
**Příprava 3,4,12,13,21,22,30,31-oktakis(2,6-diisopropylfenyloxy)-
1,2,5,6,10,11,14,15,19,20,23,24,28,29,32,33-hexadekaaza-
naftalocyaninatózinečnatého komplexu (14)**



K látce **11** (0,15 g, 0,46 mmol) byl přidán octan zinečnatý (0,10 g, 92 mmol) a směs byla rozpuštěna v bezvodém dimethylformamidu (50 ml). Reakce probíhala v bezvodém prostředí pod argonem, po dobu 1 hodiny při teplotě 160°C. Poté byl DMF odpařen na rotační vakuové odparce. Produkt byl přečištěn pomocí sloupcové chromatografie v mobilní fázi toluen/chloroform/tetrahydrofuran/pyridin v poměru 15:15:1:1. Bylo získáno 82 mg (53%) zelené pevné látky.

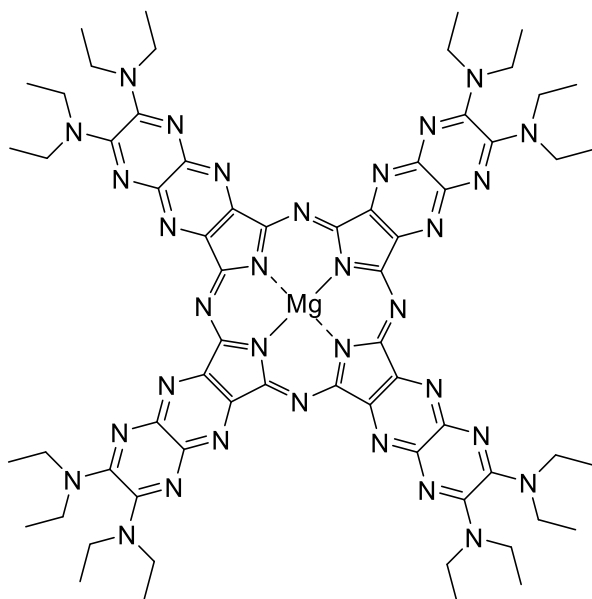
Elementární analýza. (%) pro $C_{128}H_{136}N_{24}O_8Zn + 1H_2O$ – C 68,08; H 6,34; N 14,89; nalezeno: C 68,13; H 6,92; N 14,33. IČ (ATR) $\nu_{max} = 2965; 2870; 1403; 1320; 1253; 1220; 1158; 1144; 1105; 1094\text{ cm}^{-1}$. MS (MALDI TOF) vypočteno pro $C_{128}H_{136}N_{24}O_8Zn$ 2201,03 nalezeno: 2201,09 $[M]^+$; 2224,03 $[M+Na]^+$; 2240,01 $[M+K]^+$. 1H NMR (300Hz, $CDCl_3$ /pyridin- d_5) δ (ppm) 7,69-7,62 (m, 8H, ArH); 7,58-7,52 (m, 16H, ArH); 3,37 (hept, 16H, $J=6,8\text{Hz}$, CH); 1,46 (s, 48H, CH_3); 1,40(s, 48H, CH_3). ^{13}C NMR (75MHz, $CDCl_3$ /pyridin- d_5) δ (ppm) 22,1; 23,2; 27,6; 124,2; 126,9; 139,7; 143,4; 146,8; 149,2; 150,0; 152,3. UV/Vis (THF): $\lambda_{max}(\epsilon) = 669,640,615$.

Příprava 3,4,12,13,21,22,30,31-oktakis(diethylamino)-1,2,5,6,10,11,14,15,19,20,23,24,28,29,32,33-hexadekaaza-naftalocyaninato lithného komplexu (15)



Látka **12** (10 mg, 0,007 mmol) byla smíchána s butanolem a míchána při teplotě 120°C pod zpětným chladičem. Poté bylo přidáno kovové lithium (70 mg, 0,18 mol) a směs byla dále míchána po dobu 180 minut při teplotě 120°C. Reakce byla kontrolována UV/Vis spektrofotometrií, ale dle zcela chybějícího pásu v oblasti okolo 700 nm zřejmě nedošlo k cyklotetramerizaci.

***Příprava 3,4,12,13,21,22,30,31-oktakis(2,6-diisopropylfenyloxy)-
1,2,5,6,10,11,14,15,19,20,23,24,28,29,32,33-hexadekaaza-naftalocyaninato
hořečnatého komplexu (16)***

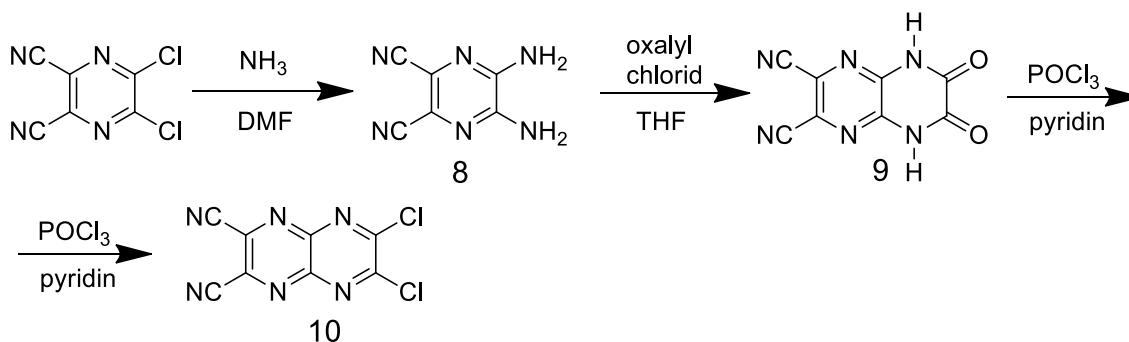


Hořík (0,84 mg, 0,035 mmol) se nechal reagovat za teploty varu rozpouštědla pod zpětným chladičem v bezvodém butanolu (2 ml) s malým krystalkem jodu po dobu tří hodin. K vytvořenému butanolátu hořečnatému byla přidána látka **12** (10 mg, 0,0045 mmol). Reakční směs byla dále míchána po 24 hodin při teplotě 120 °C. Reakce byla kontrolována UV/vis spektrofotometrií, ale dle zcela chybějícího pásu v oblasti okolo 700 nm zřejmě nedošlo k cyklotetramerizaci.

Výsledky a diskuze

Základem mé diplomové práce byla syntéza azapftalocyaninů, jejichž základní skelet byl tvořen disubstituovanými pyrazinopyraziny přikondezovanými k porfyrzinu. Tyto látky nebyly ještě nesyntetizovány. Jejich rozšířený konjugovaný systém vazeb o jedno pyrazinové jádro zaručuje absorpci světla o vyšší vlnové délce, které je potřebné pro větší průnik do tkání. Z tohoto důvodu jsme zkoušeli syntézu těchto AzaPc.

Příprava prekurzorů



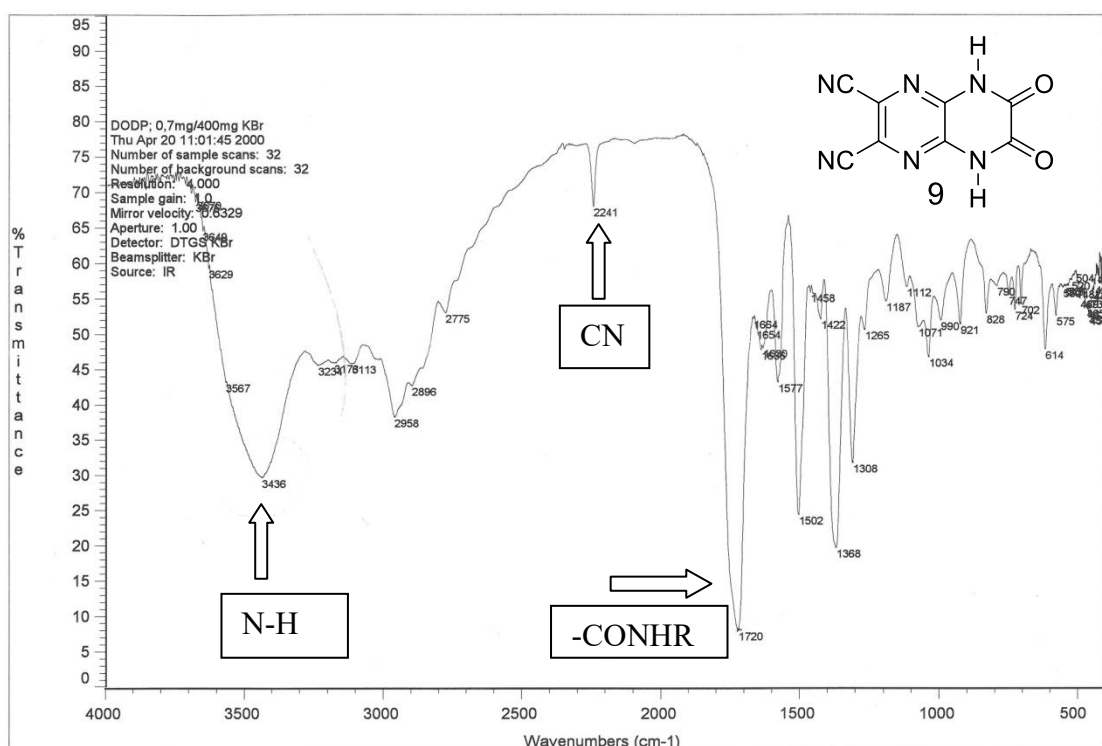
Obrázek 15. Schéma syntézy látky 10

Prvním krokem při přípravě prekurzorů (Obr. 15), byla příprava látky 8. Jedná se o nukleofilní substituci na aromatickém jádře, kdy dochází k záměně chloru za amin. Reakce probíhala bez problémů s výtěžkem kolem 67% a poskytla žluté krystaly produktu. Produkt byl kontrolován pomocí tenkovrstvé chromatografie se vzorkem, který byl již dříve nasyntetizována v laboratoři.

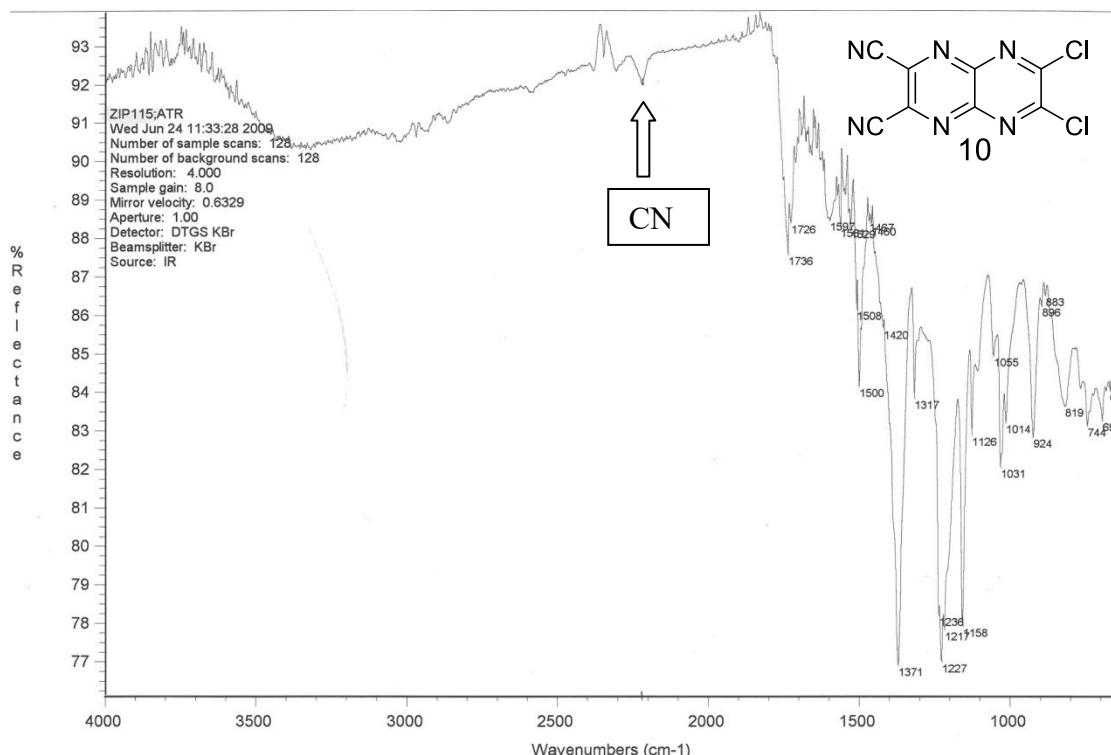
Dalším krokem byla syntéza látky 9. Začal jsem suspendováním látky 8 do bezvodého THF. Po přidání trojnásobku oxalylchloridu došlo téměř ihned ke kondenzační reakci. Suspenze se po přidání oxalylchloridu změnila v čirý roztok. Po následné rekrystalizaci z vody s výtěžkem okolo 60%, byla látka pomocí TLC zkontrolována s látkou která již byla dříve nasyntetizována v laboratoři.

Syntéza látky 10 začala přidáním chloračnického činidla chloridofosforylu k látce 9, což provázelo zahřátí směsi a bylo nutné reakci celou dobu ochlazovat. Po následném přidání pyridinu jsme směs zahřívali po dobu 6 hodin pod zpětným chladičem. Po ukončení reakce jsme odpařili POCl_3 a produkt jsme promývali vodou. Dostali jsme hnědo-černou amorfni látku. Látka je nerozpustná v běžných laboratorních rozpouštědlech (např. chloroformu, toluenu, acetonu, ethanolu, ethyl-acetátu apod.).

Zkoušeli jsme rozpustnost látky **10** v THF, přičemž jsme směs ponořili do ultrazvuku na 15 minut. I tak došlo ke vzniku mikrosuspence. Myslíme si, že problémy s rozpustností jsou způsobeny vysokou agregací molekul k sobě, jelikož se jedná o planární molekulu. Problémy s rozpustností měli za následek, že jsme nebyli schopni látku dostatečně vyčistit a charakterizovat. Jediný důkaz proběhlé chlorace je výrazná změna rozpustnosti a rozdílné pásy v IČ spektrech (Obr. 16) a (Obr. 17) látek **9** a **10**. Z IČ spekter lze vyčíst, že pásy pro karbonyl a sekundární skupinu, které jsou jasně zřetelné u látky **9** zcela chybí v IČ spektru chlorované látky **10**. Pás typický pro kyano skupinu v oblasti 2240 cm^{-1} zůstal zachován v obou případech.

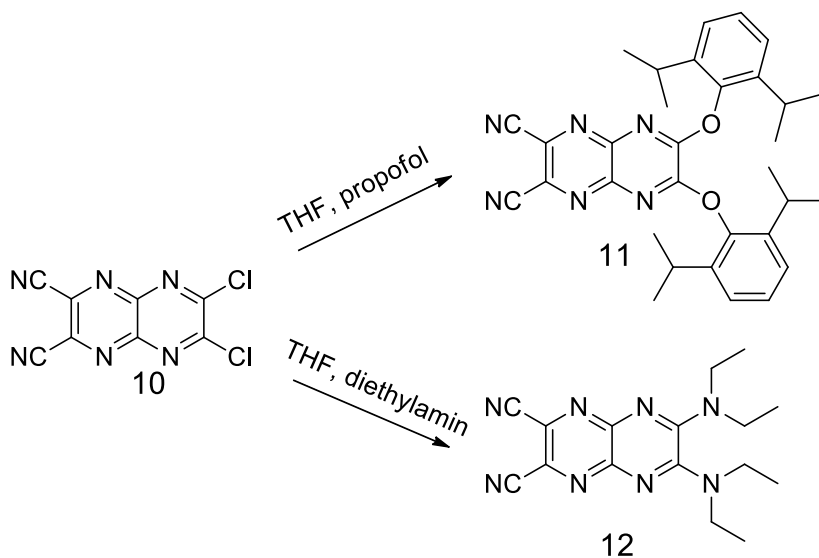


Obrázek 16. IČ spektrum látky **9**



Obrázek 17. IČ spektrum látky 10

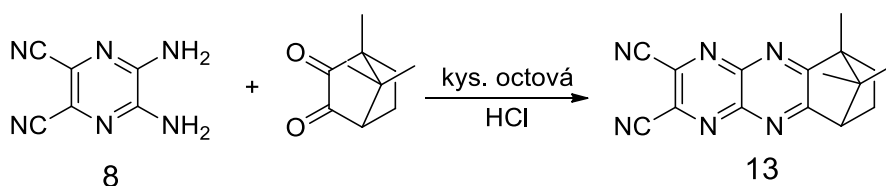
Následně jsme přikročili k syntéze prekurzorů s různými substituenty v polohách 6 a 7 z látky **10**, přičemž každý substituent je navázán přes jiný heteroatom. Jak již bylo řečeno výše, látka **10** byla velmi problematická, co se týče rozpustnosti a čištění. Ale při její nukleofilní substituci, kdy došlo k záměně na periferii látky **10** různými substituenty, došlo ke změně fyzikálních vlastností.



Obrázek 18. Schéma syntézy látek 11 a 12

Jako první jsem syntetizoval látku **11**. V THF jsme rozpustili 2,6-diisopropylfenol a odděleně jsme látku **10** suspendovali do THF. K první směsi jsme přidali hydroxid sodný, za vzniku fenolátu. Následně jsme přidali suspendovanou látku **10**. I přes problémy s rozpustností výchozí látky proběhla reakce víceméně okamžitě a produkt **11** byl získán ve výtěžku 49%.

Syntézu látky **12** jsme začali smícháním látky **10** a šestinásobek diethylaminu v prostředí THF. Podstatou reakce je nukleofilní substituce. Reakce probíhala za varu pod zpětným chladičem po dobu 3 hodin. Ale už po 90 minutách nedocházelo k žádné viditelné změně. Po vyčištění sloupcovou chromatografií jsme získali produkt **12** ve výtěžku 85%. Úspěšná syntéza látek **11** a **12** v poměrně vysokých výtěžcích zpětně potvrdila strukturu látky **10**, která nemohla být lépe charakterizována (Obr. 18).



Obrázek 19. Schéma syntézy látky 13

Poslední syntéza prekurzoru se lišila tím, že nešlo o nukleofilní substituci látky **10**, nýbrž o kondenzaci látky **8** s příslušným diketonem (Obr. 19). Jako reakční prostředí jsme použili kyselinu octovou s následným přidáním 35% kyseliny chlorovodíkové. Reakce probíhala po dobu 48 hodin za vary pod zpětným chladičem. Průběh reakce jsme sledovali pomocí TLC, ale zjistili jsme, že nedošlo téměř k žádným změnám ani po 48 hodinách. Z tohoto důvodu jsme se rozhodli reakci ukončit.

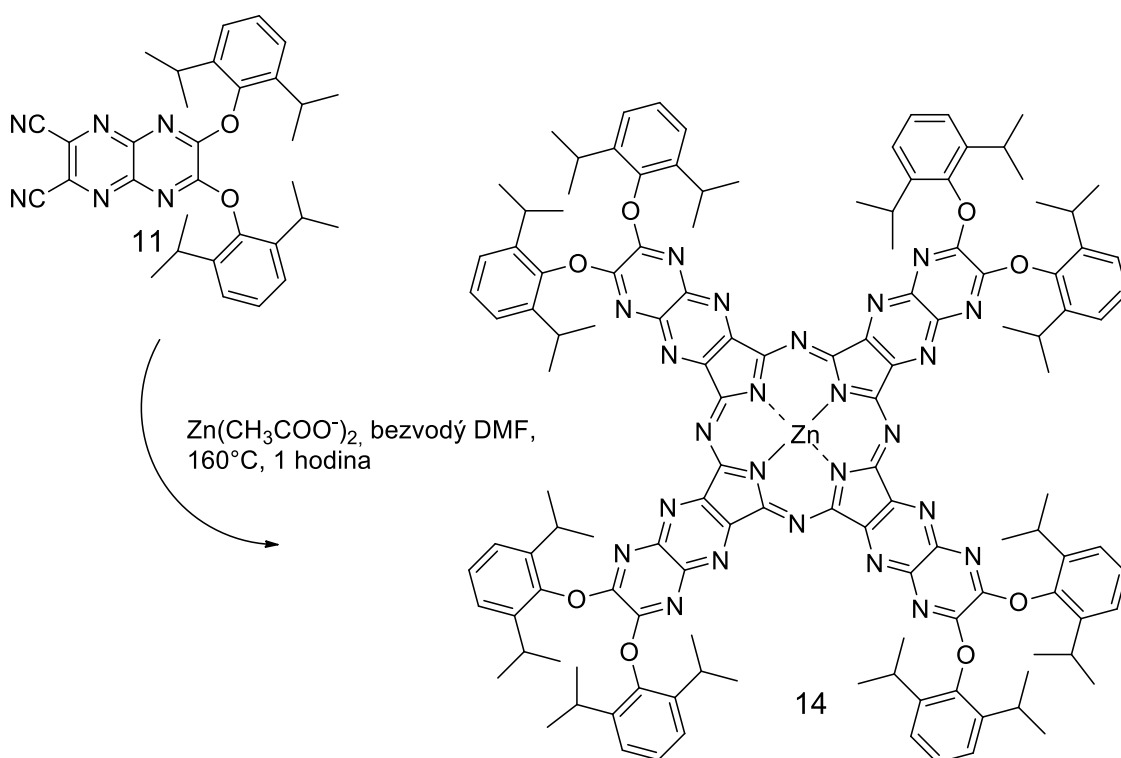
Cyklotetramerizace prekurzorů

Principiálně existují dvě metody cyklotetramerizace. První metoda využívá tzv. templátového efektu, kdy dochází seskupení 4 jednotek prekurzorů kolem centrálního kationtu atomu kovu. Po zahřátí dochází k tvorbě AzaPc jádra. Z tohoto důvodu musí probíhat reakce za vyšších teplot a je potřeba zvolit rozpouštědlo s vyšším bodem varu.

Druhá metoda využívá alkoholáty, a to především butanolát (použit v naší syntéze) nebo pentanolát, k ataku elektrondeficitních nitrilových uhlíků. Dojde ke vzniku karboximidátů, které pak napadají další nitrilové uhlíky, až dojde ke konečnému zacyklení za tvorby makrocyclického jádra. Ke tvorbě AzaPc dochází postupně.

Ve druhé fázi pokusů jsme se soustředili na cyklotetramerizaci našich prekurzorů. Z předešlých syntéz jsme měli k dispozici dva prekurzory vhodné k přípravě AzaPc. Byly to látky **11** a **12**.

U látky **12** jsme zkoušeli oba typy cyklotetramerizace (viz výše Experimentální část), ale ani jeden nevedl k úspěšnému výsledku.



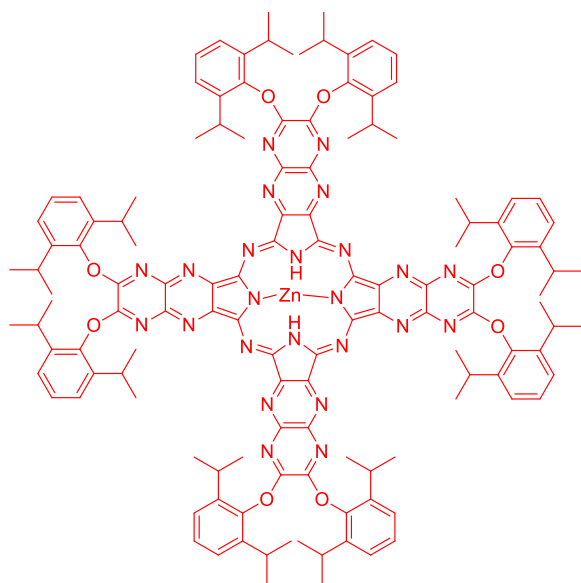
Obrázek 20. Cyklotetramerizace látky **11**

U syntézy látky **14** cyklotetramerizací prekurzoru **11** jsme využili templátovou metodu (Obr. 20). Použití druhého typu je v tom případě nevhodné, protože alkoholát by primárně atakoval éterické skupiny na periférii a došlo by k jejich záměně za alkoxy skupiny alkoholátu. Tuto reakci jsme zkoušeli několikrát a to z důvodu optimalizace reakčních podmínek. Jako cyklotetramerizační činidlo jsme zvolili octan zinečnatý a jako rozpouštědlo jsme použili bezvodý DMF. První fází optimalizace bylo stanovení

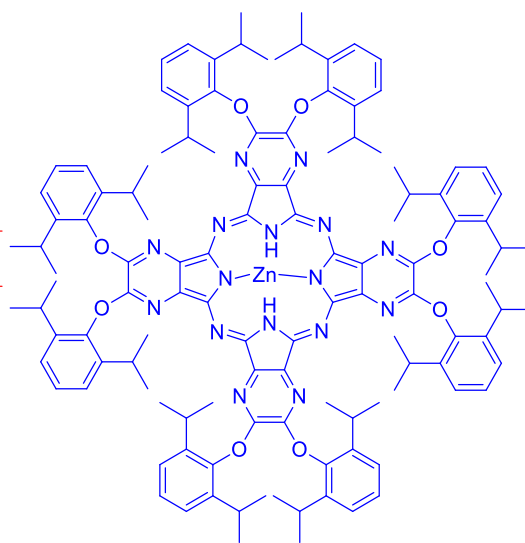
poměru octanu zinečnatého a prekursoru (látky 11). Vyzkoušeli jsme čtyři různé poměry – octan zinečnatý/látka : 1:1; 2:1; 4:1; 1:2. Jako nejlepší se ukázal poměr 2:1 pro octan zinečnatý. Zároveň s tím jsme, ale přišli na to, že je nutné, aby reakce probíhala v absolutně bezvodém prostředí. V další fázi jsme stanovili, že teplota 160°C jako nejvhodnější, protože teplota 120 °C byla nedostatečná pro průběh reakce. Jako poslední jsme určovali dobu reakce. Reakci jsme nechali probíhat 5 hodin a v rozmezí 20 minut jsme odebírali vzorky na UV/Vis spektrofotometrii. Dle intenzity Q-pásu, kde absorbuje pouze produkt, jsme monitorovali průběh reakce. Zjistili jsme, že stačí 1 hodina jako reakční doba. Po uplynutí této doby již nedochází ke zvyšování množství produktu.

Po úspěšné syntéze jsme měřili absorpční spektra a porovnali je s analogickou látkou s pouze pyrazinovými jednotkami v cyklu.

Zde je uveden příklad dvou molekul AzaPc a jejich rozdíl v absorpčním maximu pokud se jedná o pyrazinopyrazinový (Obr. 21) a pyrazinový (Obr. 22) skelet.

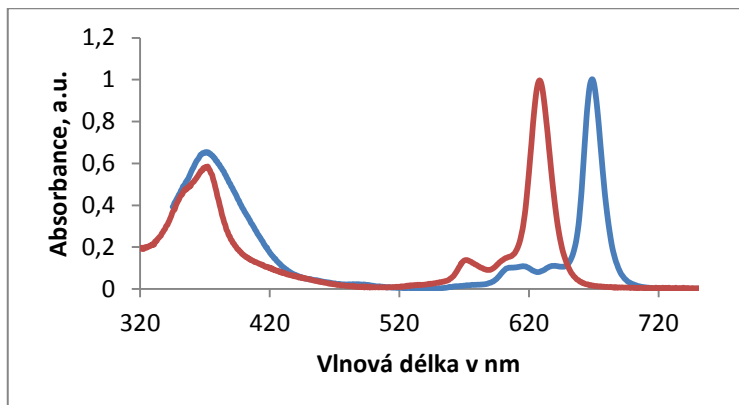


Obrázek 21. Pyrazinopyrazinový skelet



Obrázek 22. Pyrazinový skelet

Tento graf poukazuje na rozdíl v absorpčních maximech (Obr. 23). 630 nm pro pyrazinový skelet a 680 nm pro pyrazinopyrazinový skelet.



Obrázek 23. Graf zobrazující rozdíl v absorpčních maximech dvou různých skeletů

Závěr

Tématem mé práce byla příprava azaftalocyaninů, jejichž základní jednotkou jsou pyrazinopyraziny. Tyto látky byly zatím publikovány velmi málo. Jejich rozšíření o pyrazinový cyklus rozšiřuje systém konjugovaných vazeb a tím posunuje maximální absorpční hodnoty okolo 680 nm. Na periferii jsou substituovány prostorově objemné substituenty, které snižují agregaci molekul AzaPc k sobě. Zkoušeli jsme cyklotetramerizaci dvou prekurzorů a to 6,7-bis(diisopropylfenoxy)pyrazino[2,3-*b*]pyrazin-2,3dikarbonitrilu a 6,7-diethylaminpyrazino[2,3-*b*]pyrazin-2,3dikarbonitrilu. Podařilo se nám cyklotetramerizovat pouze jeden prekurzor a to 6,7-bis(diisopropylfenoxy)pyrazino[2,3-*b*]pyrazin-2,3dikarbonitril.

Seznam použité literatury

¹ RAAB, O. Ueber die Wirkung fluorescirender Stoffe auf Infusorien. *Z. Biol.* 1900, **39**, s. 524-546

² MACDONALD, I, J; DOUGHERTY, T, J. Basic principles of photodynamic therapy. *J. Porphyrins Phthalocyanines*. 2001, **5**, s. 105–129

³ POLICARD, A. Etudes sur les aspects offerts par des tumeurs experimentales examinee a la lumiere de Woods. *C. R. Seances Soc. Biol. Ses Fil.* 1924, **91**, s. 1423–1424

⁴ FIGGE, F, H, J. The relationship of pyrrol compounds to carcinogenesis. *In Moulton FR, AAAS Research Conference on Cancer*. 1945, s. 117–128

⁵ FIGGE, F, H, J. Editorial, on the etiology of cancer carcinogenic agents. *Ann. Int. Med.* 1947, **24**, s. 143–146

⁶ FIGGE, F, H, J; WEILAND, G, S., MANGANIELLO, L, O, J. Cancer detection and therapy. Affinity of neoplastic, embryonic and traumatized regenerating tissues for porphyrins and metalloporphyrins. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1948, **68**, s. 143–146

⁷ RASMUSSEN-TAXDAL, D; WARD, D; FIGGE, F. Fluorescence of human lymphatic and cancer tissue following high doses of intravenous hematoporphyrin. *Cancer*. 1955, **8**, s. 78–81

-
- ⁸ HENDERSON, B, W, et al. Historical perspective. In *Photodynamic Therapy: Basic Principles and Clinical Applications*. Henderson BW, Dougherty TJ. (eds). Marcel Decker: New York. 1992, s. 1–15
- ⁹ DOUGHERTY, T, J. A brief history of clinical photodynamic therapy at Roswell Park Cancer Institute. *J. Clin. Laser Med. Surg.* 1996, **14**, s. 219–221
- ¹⁰ LEONARDO, M, M; FÁBIO, V, S. Photodynamic Therapy: Porphyrins and Phthalocyanines as photosensitizers. *Aust. J. Chem.* 2008, **61**, s. 741-754
- ¹¹ KALKA, K; MERK, H; MUKHTAR, H. Photodynamic therapy in dermatology. *J. Am. Acad. Dermatol.* 2000, **42**, s. 389-413
- ¹² OSCHNER, M. Photophysical and photobiological processes in the photodynamic therapy of tumours. *J. Photochem. Photobiol., B.* 1997, **39**, s. 1-18
- ¹³ GILBERT, A; BAGGOTT, J. Molecular photochemistry. *Essentials of Molecular Photochemistry*: CRC Press: BocaRaton, 1991, s. 91-144
- ¹⁴ BILSKI, P, et al. The photooxidation of diethylhydroxylamine by rose bengal in micellar and nonmicellar aqueous solutions. *Photochem Photobiol.* 1993, **58**, s. 11-8.
- ¹⁵ FOOTE, C. Mechanisms of photo-oxygenation. In *Porphyrin Localization and Treatment of Tumors*. Doiron DR, Gomer CJ. (eds). Alan R. Liss: New York. 1984, s. 3–18

¹⁶ HENDERSON, B; DOUGHERTY, T, J. How does photodynamic therapy work? *Photochem. Photobiol.* 1992, **55**, s. 147–157

¹⁷ GILBERT, A; BAGGOTT, J. Molecular photochemistry. *Essentials of Molecular Photochemistry*: CRC Press: Boca Raton, 1991, s. 1–10

¹⁸ CASTANO, A; DEMIDOVA, T. Mechanisms in photodynamic therapy: part one- photosensitizers, photochemistry and cellular localization. *Photodiagn. Photodyn. Ther.* 2004, **1**, s. 279-93

¹⁹ CASTANO, A; DEMIDOVA, T. Mechanisms in photodynamic therapy: part two- cellular signaling, cell metabolism and modes of cell death. *Photodiagn. Photodyn. Ther.* 2005, **2**, s. 1-23

²⁰ CASTEDO, M, et al. Cell death by mitotic catastrophe: a molecular definition. *Oncogene.* 2004, **23**, s. 2825-37

²¹ BIZIK, J, et al. Cell-cell contacts trigger programmed necrosis and induce cyclooxygenase-2 expression. *Cell Death Differ.* 2004, **11**, s. 183-95

²² ABELS, C. Targeting of the vascular system of solid tumours by photodynamic therapy (PDT). *Photochem. Photobiol. Sci.* 2004, **3**, s. 765-71

²³ STAR, W, M, et al. Destruction of rat Mammary tumor and normal tissue microcirculation by hematoporphyrin derivative photoradiation observed in vivo in sandwich observation chambers. *Cancer Res.* 1986, **46**, s. 2532-40

²⁴ HENDERSON, B, W; FINGAR, V, H. Relationship of tumor hypoxia and response to photodynamic treatment in an experimental mouse tumor. *Cancer Res.* 1987, **47**, s. 3110-4

²⁵ FINGAR, V, H, et al. The effects of thromboxane inhibitors on the microvascular and tumor response to photodynamictherapy. *Photochem. Photobiol.* 1993, **58**, s. 393-9

²⁶ FINGAR, V, H, et al. The effects of photodynamic therapy using differently substituted zinc phthalocyanines on vessel constriction, vessel leakage and tumor response. *Photochem. Photobiol.* 1993, **58**, s. 251-8

²⁷ GILISSEN, M, J, et al. Effect of photodynamic therapy on the endothelium-dependent relaxation of isolated rat aortas. *Cancer Res.* 1993, **53**, s. 2548-52

²⁸ FINGAR, V, H; WIEMAN, T, J; DOAK, K, W. Role of thromboxane and prostacyclin release on photodynamic therapy induced tumor destruction. *Cancer Res.* 1990, **50**, s. 2599-603

²⁹ JIANG, H. *et al.* Selective depletion of a tymocyte subset *in vitro* with animmuno modulátory photosensitizer. *Clin. Immunol.* 1999, **91**, s. 178-187

-
- ³⁰ HUNT, D, W; LEVY. J. G. Immunomodulatory aspects of photodynamic therapy. *Expert Opin. Investig. Drugs.* 1998, **7**, s. 57-64
- ³¹ STEUBING, R, W. *et al.* Activation of macrophages by Photofrin II during photodynamic therapy. *J. Photochem. Photobiol. B.* 1991,**10**, s. 133-145
- ³² EVANS, S, *et al.* Effect of photodynamic therapy on tumor necrosis factor production by murine macrophages. *J. Natl. Cancer Inst.* 1990, **82**, s. 34-39
- ³³ ALLISON, M, D, *et al.* Photosensitizers in clinical PDT. *Photodiagn. Photodyn. Ther.* 2004, **1**, s. 27-42
- ³⁴ ZIMCIK, P; MILETIN, M. Fotodynamická terapie jako nová perspektivní metoda léčby nádorových onemocnění. I přehled fotosenzitizérů. *Ceska a Slov. Farm.* 2004, **6**, s. 271-279
- ³⁵ DOUGHERTY, T, J. Studies on the structure of porphyrins contained in Photofrin II. *Photochem. Photobiol.* 1987, **46**, s. 569-73
- ³⁶ KENNEDY, J, C; POTTIER, R, H. Endogenous protoporphyrin IX, a clinically useful photosensitizer for photodynamic therapy. *J. Photochem. Photobiol B.* 1992, **14(4)**, s. 275-92
- ³⁷ HOULE, J, M; STRONG, A. Clinical pharmacokinetics of verteporfin. *J. Clin. Pharmacol.* 2002, **42(5)**, s. 547-57

³⁸ SESSLER, J, L; MILLER, R, A. Texaphyrins: new drugs with diverse clinical applications in radiation and photodynamic therapy. *Biochem. Pharmacol.* 2000, **59(7)**, s. 733-9

³⁹ BONNETT, R, et al. Hydroporphyrins of the meso-tetra(hydroxyphenyl)porfyrin series as tumors photosensitizers. *Biochem. J.* 1989, **261**, s. 277-80.

⁴⁰ OSCHNER, M. Photophysical and photobiological processes in the photodynamic therapy of tumours. *J. Photochem. Photobiol., B.* 1997, **39**, s. 1-18

⁴¹ POTTIER, R; KENNEDY, J, C. New trends in photobiology (invited review) the possible role of ionic species in selective biodistribution od photochemotherapeutic agents toward neoplastic tissue. *J. Photochem. Photobiol. B.* 1990, **8**, s. 1-16

⁴² CHEN, B, et al. Vascular and cellular targeting for photodynamic therapy. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* 2006, **16**, s. 279-305

⁴³ MOAM, J; SOMMER, S. Uptake of the components of hematoporphyrin derivative by cells and tumours. *Cancer Lett.* 1983, **21**, s. 167-174

⁴⁴ WIKE-HOOLEY, J, L; HAVEMAN, J; REINHOLD, H, S. The relevance of tumour pH to the treatment of malignit dinase. *Radiother. Oncol.* 1984, **2**, s. 343-366

⁴⁵ MØRKVED, E, H; OSSLETTEN, H; KJØSEN, H; BJØRLO, O. Syntheses of Octa(2-heteroaryl) Azaphtalocyanines. *J.Prakt.Chem.-Chem.Ztg.* 2000, **342**, s. 83-86

-
- ⁴⁶ROTHKOPF, H, W, et al. Di- und Tetracyanpyrazine. *Chem. Ber.* 1975, **108**, s. 875-886
- ⁴⁷MØRKVED, E, H; AFSETH, N, K; ZIMCIK, P. Azaphthalocyanines with extended conjugation through heteroaryl and aryl substituents. Photochemical and photophysical properties. *J. Porphyrins Phthalocyanines*. 2007, **11**, s. 130-138
- ⁴⁸RICHARDS, J, et al. Pyrazinacenes: Aza Analogues of Acenes. *J. Org. Chem.* 2009, **74**, s. 8914-8923
- ⁴⁹SONG, CH, J, et al. Synthesis and spectral characterisation of dicyanopyrazine-related cyanoheterocycles. *J. Chem. Res.* 2013, **5**, s. 268-272
- ⁵⁰JAUNG, J; FUKUNISHI, K. Syntheses and Spectral properties of 2,3,7,8-Tetracyano-5,10dihydrodipyrazino[2,3-*b*:2',3'-*e*]pyrazine. *J. Heterocyclic Chem.* 1997, **34**, s. 653- 654
- ⁵¹MØRKVED, E, H, et al. Thiophen-2-yl and bithienyl substituted pyrazine-2,3-dicarbonitriles as precursors for tetrasubstituted zinc azaphthalocyanines. *Polyhedron*. 2013, **54**, s. 201-210
- ⁵²MUSIL, Z. Diplomová práce, Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové. *Syntéza potenciálních fotodynamicky aktivních látek typu dusíkatých analogů ftalocyaninů I*. 2004, s. 1-57