

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



DIPLOMOVÁ PRÁCE

Syntéza azaftalocyaninů periferně substituovaných zbytkem
odvozeným od trimesinové kyseliny



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 27. 4. 2015

.....

Rád bych poděkoval mému školiteli doc. PharmDr. Petru Zimčíkovi, Ph.D. za pomoc, cenné rady a vedení při vzniku této práce. Doc. PharmDr. Veronice Novákové, Ph.D. bych rád poděkoval za odborné rady a za fotofyzikální a fotochemické měření. Za biologické testování děkuji Mgr. Miloslavovi Macháčkovi. Za příjemné pracovní prostředí a přátelskou atmosféru děkuji celému kolektivu laboratoře. Práce vznikla za finanční podpory projektů Specifického vysokoškolského výzkumu (SVV 260 183) a Grantové agentury Univerzity Karlovy (GA UK 1182313/2013).

Za změření dat bych rád poděkoval následujícím pracovníkům: Doc. PharmDr. Jiří Kuneš, CSc. (NMR spektra), Iva Vencovská (IČ spektra), Věnceslava Hronová (elementární analýzy), PharmDr. Juraj Lenčo, Ph.D. (MS spektra).

ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv

Autor: **Jan Kollár**

Školitel: **Doc. PharmDr. Petr Zimčík, PhD.**

Název diplomové práce: **Syntéza azaftalocyaninů periferně substituovaných zbytkem odvozeným od trimesinové kyseliny**

Cílem této práce byla syntéza nových fotosenzitizérů ze skupiny ve vodě rozpustných azaftalocyaninů (AzaPc) s potenciálním použitím ve fotodynamické terapii.

Výchozí sloučeninou pro syntézu byla kyselina trimesinová, která byla esterifikována ethanolem. Triester byl částečně hydrolyzován na monokarboxylovou kyselinu. Následně byla volná karboxylová skupina selektivně redukována na hydroxyl a poté oxidací převedena na aldehyd. Benzoinovou kondenzací tohoto aldehydu se získal příslušný acyloin, který byl oxidován na tetraethylester kyseliny 5,5'-oxalyldiisofthalové. Substituovaný pyrazin-2,3-dikarbonitril, prekurzor pro AzaPc, se získal kondenzací diaminomaleonitrilu s tímto vicinálním diketonem. Cyclotetramerizací za použití butanolátu hořečnatého jako iniciátoru byl pak získán hořečnatý komplex AzaPc substituovaný šestnácti butoxykarbonylovými skupinami. Hořečnatý komplex byl převeden na bezkovový AzaPc v kyselém prostředí a následně reakcí s bezvodým octanem zinečnatým na zinečnatý komplex.

V případě syntézy AzaPc s volnými karboxylovými skupinami byl výše uvedený diketon hydrolyzován na produkt se čtyřmi volnými karboxylovými skupinami. Substituovaný pyrazin-2,3-dikarbonitril se získal opět kondenzací diaminomaleonitrilu s tímto vicinálním diketonem. Zinečnatý AzaPc substituovaný šestnácti volnými karboxylovými skupinami byl syntetizován templátovou reakcí s octanem zinečnatým v pyridinu. AzaPc byl převeden na sodnou sůl a produkt se poté čistil gelovou chromatografií. Fotodynamická účinnost a toxicita zinečnatých AzaPc byla poté testována *in vitro* na nádorových HeLa buňkách.

ABSTRACT

Charles University in Prague

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmaceutical Chemistry and Drug Control

Author: **Jan Kollár**

Supervisor: **Doc. PharmDr. Petr Zimčík, PhD.**

Title of diploma thesis: **Synthesis of azaphthalocyanines substituted with moieties derived from trimesic acid**

Aim of this work was a synthesis of new photosensitizers from the group of water-soluble azaphthalocyanines (AzaPc) with future potential to be used in PDT.

The starting compound for synthesis, trimesic acid, was esterified by ethanol and the triester was partially hydrolysed to mono carboxylic acid. Subsequently, the carboxyl group was selectively reduced to hydroxyl followed by oxidation to aldehyde. Benzoin condensation of this aldehyde gave acyloin that was oxidized to tetraethyl 5,5'-oxalyldiisophthalate. Substituted pyrazine-2,3-dicarbonitrile, a precursor for AzaPc, was obtained by condensation of diaminomaleonitrile with this vicinal diketone. Cyclotetramerization using magnesium butoxide as initiator gave magnesium(II) AzaPc substituted with sixteen butoxycarbonyl groups. Magnesium complexes were converted to metal-free AzaPc in acidic medium and then to zinc(II) AzaPc by reaction with anhydrous zinc acetate.

Tetraethyl 5,5'-oxalyldiisophthalate was also hydrolyzed to diketone with four free carboxylic groups. Substituted pyrazine-2,3-dicarbonitrile, a precursor for AzaPc, was obtained by condensation of diaminomaleonitrile with this vicinal diketone. AzaPc substituted with sixteen free carboxylic groups was synthesized in a template reaction with zinc(II)acetate in pyridine. This zinc(II) AzaPc was converted into the sodium salt and product was then purified by gel chromatography. The photodynamic activity and toxicity of both zinc(II) AzaPcs were tested *in vitro* on HeLa cancer cells.

Obsah

1. SEZNAM ZKRATEK	8
2. CÍL PRÁCE	9
3. TEORETICKÁ ČÁST	10
3.1. Úvod	10
3.2. Historie	10
3.3. Mechanismus účinku	11
3.4. Biologická odezva na PDT	12
3.5. Fotosenzitizéry.....	12
3.5.1. Fotosenzitizéry a jejich vlastnosti.....	13
3.5.2. Rozdělení fotosenzitizérů z pohledu generací	13
4. METODICKÁ ČÁST	21
4.1. Katalyzátory.....	21
4.1.1. Soli kyanidů.....	21
4.1.2. <i>N</i> -heterocyklické karbeny	23
4.2. Příprava nesymetrického acyloinu.....	27
5. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	29
5.1. Příprava triethylesteru kyseliny trimesinové (1).....	30
5.2. Příprava diethylesteru kyseliny trimesinové (2).....	31
5.3. Příprava diethylesteru kyseliny 5-(hydroxymethyl)benzen-1,3- dikarboxylové (3)	32
5.4. Příprava diethylesteru kyseliny 5-formyl-1,3-dikarboxylové (4).....	33
5.5. Příprava tetraethylesteru kyseliny 5, 5'-oxalyldiisoftalové (5)	34
5.6. Příprava tetraethylesteru kyseliny (5,6-dikyanopyrazin-2,3-diyl) diisoftalové (6).....	35
5.7. Příprava 2,3,9,10,16,17,23,24-oktakis[3,5-bis(butoxykarbonyl)fenyl] tetrapyrazinoporfyrazináto hořečnatého komplexu (7)	36

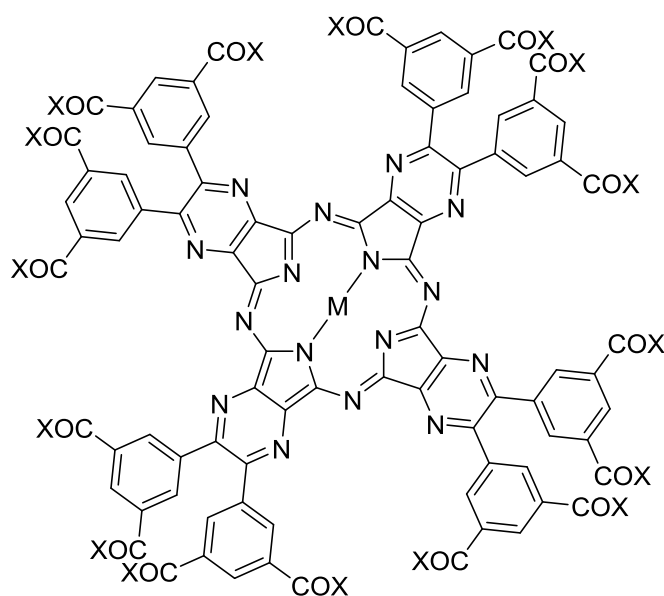
5.8. Příprava 2,3,9,10,16,17,23,24-oktakis[3,5-bis(butoxykarbonyl)fenyl] tetrapyrazinoporfyrazinu (8).....	37
5.9. Příprava 2,3,9,10,16,17,23,24-oktakis[3,5-bis(butoxykarbonyl)fenyl] tetrapyrazinoporfyrazináto zinečnatého komplexu (9).....	38
5.10. Příprava 5,5'-oxalyldiisoftalové kyseliny (10)	39
5.11. Příprava 5,5'-(5,6-dikyanopyrazin-2,3-diyl)diisoftalové kyseliny (11).....	40
5.12. Příprava sodné soli 2,3,9,10,16,17,23,24-oktakis(3,5dikarboxylátófenyl) tetrapyrazinoporfyrazináto zinečnatého komplexu (12).....	41
5.13. Příprava mikroemulze s látkou 9	42
5.14. Příprava roztoků s látkou 12	42
5.15. Biologické testování	42
5.16. Měření závislosti fotofyzikálních vlastností na změně pH.....	43
6. VÝSLEDKY A DISKUZE.....	44
6.1. Příprava azaftalocyaninů	44
6.2. UV/VIS spektra	50
6.3. Fotofyzikální vlastnosti	52
6.4. Biologické testy	53
7. ZÁVĚR.....	58
8. CITOVANÁ LITERATURA	59

1. SEZNAM ZKRATEK

ALA	kyselina 5-aminolevulová
AzaPc	azaftalocyanin
DBU	1,8-diazabicyklo[5.4.0]undec-7-en
DIPEA	<i>N,N</i> -diisopropylethylamin
FDA	americký Úřad pro potraviny a léčiva (Food and Drug Administration)
HpD	derivát hematoporfyrinu
KOtBu	<i>tert</i> -butylalkoholát draselný
NHC	<i>N</i> -heterocyklické karbeny
Nc	naftalocyanin
Pc	ftalocyanin
PDT	fotodynamická terapie
PPIX	protoporfyrin IX
PS	fotosenzitizér
<i>p</i> -TSA	<i>p</i> -toluensulfonová kyselina
THF	tetrahydrofuran
TLC	tenkovrstvá chromatografie

2. CÍL PRÁCE

Cílem mé diplomové práce bylo připravit azaftalocyaniny odvozené od kyseliny trimesinové s potenciálním využitím jako fotosenzitizéry pro fotodynamickou terapii. Tyto látky nesou na periférii karboxylové skupiny, které jsou po ionizaci (převedení na sůl) předpokladem pro rozpustnost ve vodě. Na základě elektrostatických odpuzivých sil by mělo dojít také k zabránění agregace. Pro porovnání byla cílem práce i syntéza derivátů obsahujících esterové skupiny. U těchto látek byly dále měřeny fotofyzikální vlastnosti a na závěr byla testována biologická aktivita *in vitro*. (Obr. 1)



X= OBU nebo O⁻Na⁺

Obr. 1 Obecná struktura připravovaných látek

3. TEORETICKÁ ČÁST

3.1. Úvod

Fotodynamická terapie (PDT) se skládá ze tří esenciálních komponent: fotosenzitizér (PS), světlo a kyslík, které jsou samostatně netoxické. Vzájemnou interakcí dochází k fotochemické reakci a ke vzniku silně reaktivního singletového kyslíku. Ten napadá okolní buněčné organely, což může vést k buněčné smrti nekrotickou nebo apoptózou.⁽¹⁾

PDT je neinvazivní, vysoce selektivní metoda používaná při destrukci nežádoucích buněk a tkání. Tato metoda byla klinicky schválena před více než čtvrt stoletím a v dnešní době kromě protinádorové terapie nachází uplatnění v různých dalších oborech (kardiologie, urologie, imunologie, stomatologie, dermatologie a kosmetika).⁽²⁾

Selektivita této metody je založena na schopnosti PS přednostně se hromadit v nemocné tkáni a po ozáření efektivně generovat singletový kyslík nebo jiné účinné látky s výrazně lokalizovaným účinkem. PS je podáván do těla buď systémově, nebo topicky za nepřítomnosti světla. Po dostatečné době od podání PS dojde k ozáření požadovaného místa dostatečným množstvím světla o dané vlnové délce, čímž dojde k aktivaci PS a produkci cytotoxických agens.⁽³⁾

3.2. Historie

Počátek PDT se začíná datovat od roku 1900, kdy německý student medicíny Oscar Raab popsal smrtící účinky akridinové červeně a světla na nálevníky, zatímco oboje je samostatně neškodné. Lékaři Jesionek a von Tappeiner z Mnichova provedli v roce 1903 léčbu kožních nádorů eosinem a bílým světlem. V roce 1904 von Tappeiner a Jodlbauer popsali, že kyslík je nedílnou součástí fotosenzitivní reakce a zavedli pojem "fotodynamická akce", což bylo v roce 1970 experimentálně ověřeno. V roce 1924 francouzský lékař Policard popsal zvýšenou fluorescenci endogenních porfyrinů (v současné době nejpoužívanějších PS) v nádorové tkáni. Toto následně potvrdili o 20 let později Figge a Rasmussen-Taxdal. Na začátku 20. století se Fisher zabýval

metabolismem porfyrinů a léčbou porfyrií, za což dostal Nobelovu cenu. Objevil potenciál porfyrinů pro použití v PDT, i když je nezavedl do klinické praxe. Tento krok udělal až Meyer-Betz v roce 1913, kdy na sobě otestoval účinky hematoporfyrinu po ozáření světlem a vyzkoušel tak účinky fotodynamické reakce navozené porfyriny.

V roce 1950 Schwartz a Lipson navázali na práci Fishera a Meyer-Betze a zvýšili podíl aktivní formy hematoporfyrinu ve směsi, kterou poté nazvali hematoporfyrinový derivát (HpD) a testovali jej na použití pro diagnostiku lidských nádorů. Později Dougherty použil HpD v kombinaci s červeným světlem k léčbě rakoviny kůže u 25 pacientů s pozitivním výsledkem na léčbu. Po jeho úspěchu následovaly další studie s HpD, např. k léčbě rakoviny plic, jícnu, tlustého střeva, nádoru mozku. Jejich objevy a zkušenosti zahájily moderní éru PDT a hledání nových fotosenzitizérů s lepšími vlastnostmi. ⁽⁴⁾

3.3. Mechanismus účinku

Po ozáření je PS excitován ze základního stavu (S_0) do prvního excitovaného stavu (S_1), následuje konverze na tripletový stav (T_1) přes mezisystémový přechod. Životnost tripletového stavu ovlivňuje interakce excitovaného PS s okolními molekulami. Obecně se přijímá, že k tvorbě cytotoxických produktů dochází během PDT v této chvíli. Excitovaný tripletovaný stav (T_1) může reagovat dvěma různými fotoprocesy definovanými jako typ I a typ II.

Mechanismus typu I zahrnuje odštěpení atomu vodíku nebo přenos elektronu mezi excitovaným stavem PS a substrátem (např. biologický materiál, rozpouštědlo, atd.) za vzniku volných radikálů a radikálových iontů. Volné radikály jsou velmi reaktivní a reagují s molekulárním kyslíkem za vzniku reaktivních částic (superoxidové anionty, hydroxylové radikály) nebo mohou způsobit nevratné biologické poškození.

Naproti tomu při fotoprocesu typu II dochází k přenosu energie mezi excitovaným tripletovým stavem PS a molekulou kyslíku v základním stavu za vzniku singletového kyslíku. Ten pak může interagovat s okolními biologickými substráty a vyvolat poškození buněk až buněčnou smrt. ⁽⁵⁾ Doba života singletového kyslíku je velmi krátká (přibližně 10 - 320 ns, v závislosti na rozpouštědle) a tím je limitována jeho difúze v buňce přibližně na 10 - 55 nm. ⁽¹⁾

3.4. Biologická odezva na PDT

Byly popsány tři hlavní mechanismy, kterými PDT zprostředkovává destrukci nádorů.

Prvním je přímý letální účinek singletového kyslíku a ostatních reaktivních forem kyslíku, který vede k přímému poškození buněk. Za přímé poškození buněk může poškození subcelulárních struktur, nejčastěji mitochondrií nebo lysozomů, kde se PS kumuluje. Plazmatická membrána není obvyklým cílem PDT, PS jsou zde lokalizovány obvykle jen na začátku podávání. Nicméně není snadné určit jen jednu cílovou strukturu, protože PS může svou lokalizaci po ozáření měnit. Obecně platí, že hydrofobní látky difundují přes plazmatickou membránu prostou difuzí. Zato látky méně hydrofobní až hydrofilní se do buňky dostávají endocytózou a nacházejí se většinou v lysozomech. Poškození mitochondrií, jako zdroje ATP pro buňku, vede k energetické nerovnováze.

PDT může také aktivovat imunitní systém a vyvolat reakci proti nádorovým buňkám. Tento mechanismus není primárním důvodem, který vede ke smrti buněk, ale může pomoci při dlouhodobé kontrole nad nádorem. Mechanismus aktivace zahrnuje uvolnění cytokinů, zánětlivých a chemotaktických signálů, z léčené tkáně a následně vede k invazi neutrofilů, žírných buněk, mastocytů a makrofágů do tkáně.

Mezi důležitou cestu ničení nádorů patří poškození krevního zásobení, které je důležité pro přívod kyslíku a živin. Zničení cévního zásobení vede k lokální hypoxii, anoxii a nedostatku živin pro nádor. Mechanismus účinku závisí na typu použitého PS (např. porfimer sodný a hydrofobní ftalocyaniny vyvolávají zúžení cév). Nejvyšší efekt na cévy je docílen při aktivaci PS krátce po podání, kdy je ještě stále v krevním řečišti. Tady je i výrazný rozdíl od přímého účinku PDT na buňky, u kterého je třeba počkat delší dobu, než PS pronikne v dostatečné koncentraci do cílových tkání a až poté dochází k ozáření.⁽⁴⁾

3.5. Fotosenzitizéry

PS jsou látky schopné absorbovat světlo o specifické vlnové délce a přeměňovat ho na využitelnou energii. Pro PDT je důležité, aby docházelo k tvorbě letálních

cytotoxických produktů. Klíčovou charakteristikou těchto látek je, že se více či méně kumulují v cílové tkáni a produkují cytotoxické produkty pro biologický efekt. ⁽⁵⁾

3.5.1. FOTOSENZITIZÉRY A JEJICH VLASTNOSTI

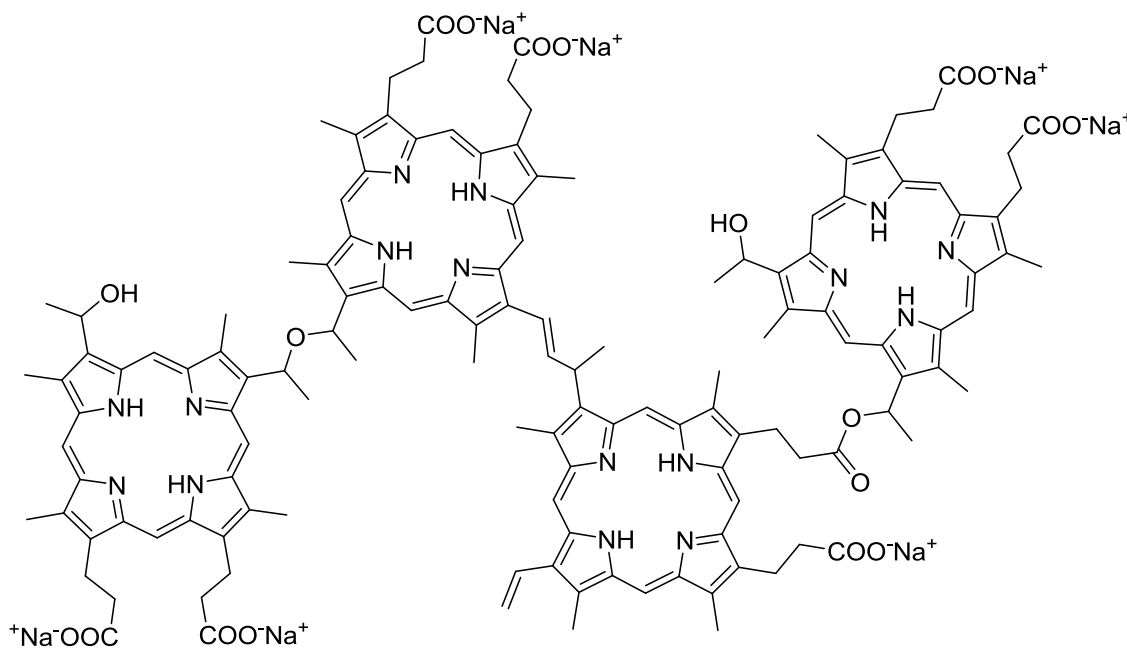
Ideální PS by měl mít tyto vlastnosti:

- chemicky čistá látka s konstantním složením
- minimální toxicita ve tmě (dark toxicita) a vysoký cytotoxický účinek po ozáření světlem
- cílené vychytávání v nádorové tkáni
- rychlé vylučování z organismu a minimální systémová toxicita
- vysoká produkce singletového kyslíku a ostatních reaktivních forem kyslíku.
- silná absorpce při vlnových délkách 600-800 nm, kdy dochází k optimální penetraci světla přes kůži a k dostatečné produkci singletového kyslíku ⁽⁵⁾

3.5.2. ROZDĚLENÍ FOTOSENZITIZÉRŮ Z POHLEDU GENERACÍ

3.5.2.1. První generace

Deriváty hematoporphyrinu



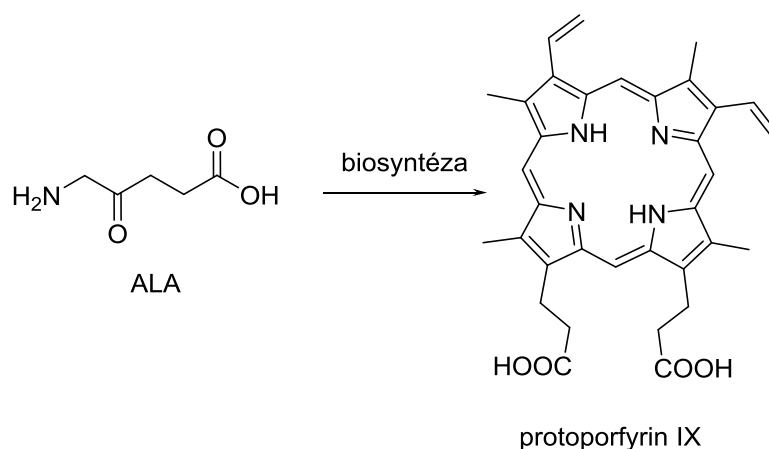
Obr. 2 Struktura jednoho z oligomerů porfimeru sodného

První generaci PS tvoří deriváty hematoporfyrinu (HpD) (Obr. 2) neboli porfimer sodný (registrován pod komerčním názvem Photofrin[®]). Získávaly se reakcí hematoporfyrinu s 5% kyselinou sírovou v kyselině octové za pokojové teploty. Vzniklá směs byla zneutralizována hydroxidem sodným. To vedlo ke vzniku komplexní směsi dimerů a oligomerů tvořené převážně estery a ethery. Následně byla tato směs čištěna vysokoúčinnou kapalinou chromatografií a gelovou chromatografií a oligomerní (účinné) frakce zakoncentrovány. ⁽⁵⁾ I přesto je to stále směs asi šedesáti látek. Americký Úřad pro potraviny a léčiva (Food and Drug Administration, FDA) schválil jeho použití pro léčbu časně a pozdní endobronchiální léze, Barretova jícnu a obstrukce jícnu lézemi. V mnoha zemích je schválen pro další aplikace, např. léčba rakoviny močového měchýře. Photofrin[®] je neúčinný u pigmentovaných melanomů, kdy dochází k překrytí jeho absorpčního spektra s melaninem, což má za následek sníženou absorpci světla. ⁽⁶⁾ Photofrin[®] je podáván ambulantně v dávce 2 mg/kg a po 48 hodinách dochází k ozáření. Důležité je vyhýbat se 4 - 6 týdnů slunečnímu záření. ⁽⁷⁾

3.5.2.2. Druhá generace

Hematoporfyriny mají dvě významné nevýhody. První je, že látky se deponují dlouho v kůži (až 10 týdnů po podání), což má za následek nežádoucí kožní fotosenzitivitu. Druhou nevýhodou je, že Photofrin[®] má slabou absorpci pouze při 630 nm. Tato vlnová délka je příliš krátká pro účinný průnik světla hlouběji do tkání, protože dochází k absorpci endogenními chromofory. ⁽⁵⁾ Navíc je to stále směs látek, která nemá jednoznačně potvrzené složení. Z těchto důvodů byla do praxe zavedena řada látek tzv. II. generace PS, které mají zlepšené ať již absorpční, fotofyzikální nebo farmakokinetické vlastnosti. Navíc se jedná o chemicky jasně definované látky.

Kyselina 5-aminolevulová



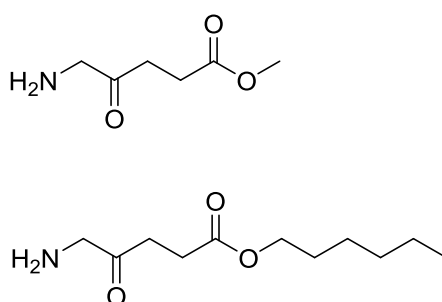
Obr. 3 Kyselina 5-aminolevulová

Jednou z látek II. generace je 5-aminolevulová kyselina (ALA), která je prekurzorem pro tvorbu endogenního fotosenzitizéru (Obr. 3). Přírodní porfyrin, hem, je syntetizován ve všech buňkách a je prostetickou skupinou v hemoglobinu, myoglobinu a ostatních hematoproteinech. ⁽⁵⁾ Všechny typy buněk kromě červených krvinek jsou schopny této syntézy. První krok syntézy je reakce glycinu a sukcinyl CoA. Syntéza ALA pomocí ALA-syntetázy je zpětně regulována obsahem hemu v buňce. Posledním, relativně pomalým, krokem je zabudování železa do protoporphyrinu IX (PPIX), který je účinným PS, za vzniku fotodynamicky neúčinného hemu. Přidáním exogenní ALA se zvyšuje množství PPIX, který není buňka schopna rychle převádět na hem, a dochází k nadbytku PPIX v buňce, která se tak stává citlivou na ozáření světlem. PPIX vzniká v mitochondriích, ale rychle difunduje do jiných intracelulárních míst buňky. ⁽⁸⁾

ALA byla v USA schválena FDA k neonkologické léčbě aktinické keratózy v roce 1999. Absorpční maximum PPIX je velmi nízké (630-635 nm) ale výhodou je, že je metabolizován během 48 hodin, čímž se snižuje riziko senzibilizace kůže. Jeho potenciální aplikace v PDT je na Bowenovu nemoc, karcinom bazálních buněk a další nemoci. Dalším využitím tohoto fotosenzitizéru může být k detekci nádorů močového měchýře, plic, kůže a gastrointestinálního traktu. ⁽⁹⁾

ALA může být podávána orálně, intravenózně, nebo topicky, ale v současné době je registrována pouze pro topickou aplikaci. Existuje několik hypotéz, proč rakovinné buňky syntetizují více PPIX než normální buňky - větší exprese enzymů účastnících se biosyntézy hemu (porfobilinogen deamináza, koproporphyrinogen oxidáza

nebo snížená exprese ferrochelatózy). Při lokální aplikaci může hrát roli i zvýšený příjem ALA nádory. Pro zvýšení účinku ALA se testovalo i současné podání s chelátory železa, které vychytávají železo, které je nutné pro tvorbu hemu. Další možností je podávat ALA ve formě esteru (methyl, pentyl, hexyl, benzyl), které mají vyšší průnik do buněk díky vyšší lipofilitě. ⁽⁸⁾ Methyl ester ALA (Metvix[®]) byl schválen FDA v roce 2004 pro léčení aktinické keratózy. Hexyl ester ALA (Hexvix[®]) byl schválen v roce 2010 FDA k diagnóze rakoviny močového měchýře. Tento ester je převáděn na PPIX 50-100 krát účinněji než ALA (Obr. 4). ⁽⁹⁾

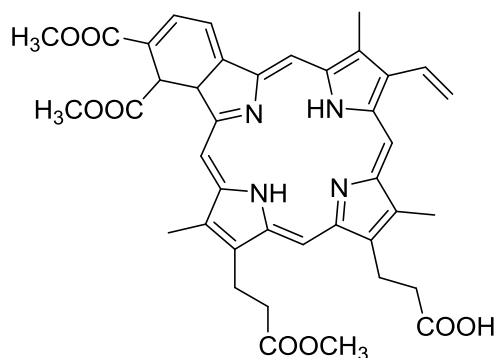


Obr. 4 Metylester a hexylester ALA

Chloriny a bakteriochloriny

Chloriny se od porfyrinů liší redukcí dvojně vazby v jedné pyrolové jednotce, čímž dochází ke snížení symetrie konjugovaného makrocyklu, což vede k prodloužení vlnové délky absorpce do oblasti 650 - 680 nm. ⁽³⁾

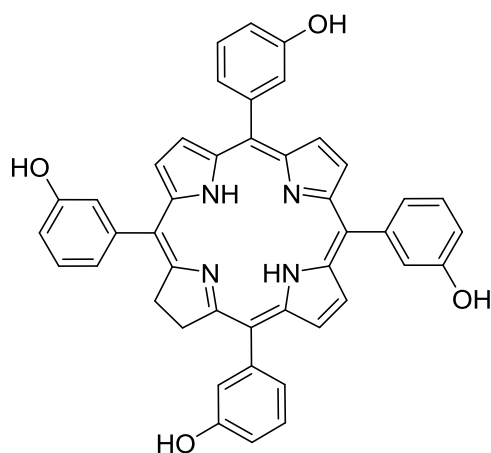
Verteporfin



Obr. 5 Verteporfin

Verteoporfin (Obr. 5) patří do rodiny chlorinů. Jedná se o benzoporfyrinový derivát. ⁽³⁾ Verteoporfin má silnou absorpci při 690 nm, kde dochází k lepší penetraci světla kůží. Má rychlou distribuci v organismu, optimální hladina pro ozařování je za 30 - 150 minut po intravenózním podání. ⁽⁵⁾ Hlavní efekt je na cévní zásobení cílové tkáně. Vyznačuje se rychlou farmakokinetikou, čímž dochází k nižší fototoxicitě kůže. V roce 1999 FDA schválila použití verteoporfinu (Visudyne[®]) v oftalmologii pro léčbu vlhké formy věkem podmíněné makulární degenerace. ⁽⁹⁾

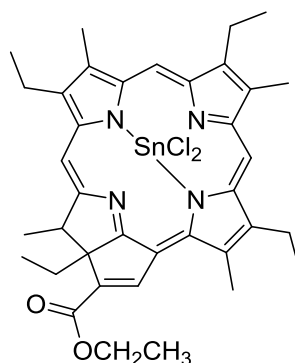
Temoporfin



Obr. 6 Temoporfin

Temoporfin je tetra(*m*-hydroxyfenyl)chlorin (Obr. 6), známý pod obchodní názvem Foscan[®]. Temoporfin má kvantový výtěžek singletového kyslíku srovnatelný s ostatními chlorinovými PS, ale je potřeba menší dávky léčiva a světla (přibližně 0,1 mg/kg a 5 J/cm²) k fotodynamické reakci v porovnání s porfimerem (2–5mg/ kg a 100–200 J/cm²). Proto je temoporfin 100× účinnější než porfimer. Jednou z nevýhod je dlouhá fotosenzitivita po aplikaci (až 20 dní), kterou lze řešit použitím nižší dávky. Temoporfin našel klinické využití v oblasti léčby nádorů krku a hlavy. ⁽³⁾

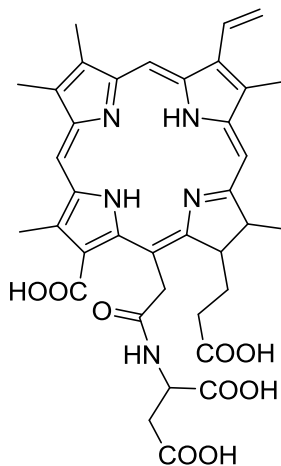
Rostaporfin



Obr. 7 Rostaporfin

Cíničitý etiopurpurin, neboli rostaporfin (Obr. 7), byl vyvíjen pod obchodním názvem Purlytin[®]. Rostaporfin má bathochromně posunuté absorpční maximum přibližně o 20-30 nm (v porovnání s porfimerem). Fotosenzitivita po podání je relativně dlouhá, činí 7-14 dní. Rostaporfin prošel II. fází klinických studií v USA pro léčbu kožního metastatického karcinomu prsu a Kaposiho sarkomu u pacientů s AIDS. Rostaporfin byl také úspěšně testován k léčbě nemaligně ovlivněné lupénky a restenózy.⁽³⁾

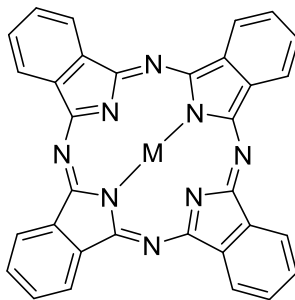
Talaporfin



Obr. 8 Talaporfin (chlorin)

Talaporfin (Obr. 8) je polosyntetický PS, který je odvozen od struktury chlorofylu a. Lze jej použít pro potenciální PDT léčbu fibrosarkomů, jater, nádorů v ústech. V roce 2003 byl schválen v Japonsku pro léčbu rakoviny plic.⁽⁹⁾

Ftalocyaniny

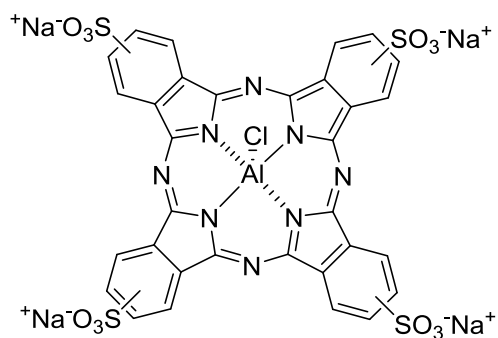


Obr. 9 Obecná struktura ftalocyaninu

Ftalocyaniny (Pc, Obr. 9) jsou tetrapyrrolové makrocycly odvozené od porfyrinu. Mají dusíkatý spojovací řetězec, který spojuje jednotlivé pyrrolové jednotky namísto methinových můstků. Benzenová jádra přikondenzovaná po obvodu zesilují absorpci ve vyšších vlnových délkách.⁽⁵⁾

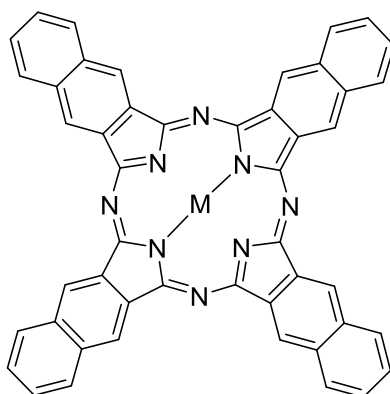
Pc mají atraktivnější vlastnosti (fotofyzikální i fotochemické) než hematoporfyrinové deriváty. Monomerní Pc mají silný absorpční B-pás okolo 350 nm. Dále mají silnou absorpci při 680 nm (Pc $\lambda_{\max} = 680$ nm; HpD, $\lambda_{\max} = 630$ nm). Vyznačují se vyšším extinkčním koeficientem než HpD (Pc: $\epsilon = 10^5$ M⁻¹ cm⁻¹; HpD $\epsilon = 10^3$ M⁻¹ cm⁻¹). Tyto vlastnosti pak vedou k lepším fotofyzikálním a fotochemickým vlastnostem, které lze upravit periferní substitucí nebo axiálním ligandem na chelatovaném centrálním kationtu.⁽⁶⁾

Na rozdíl od HpD a některých dalších látek porfyrinové povahy je přítomnost centrálního kationtu (zejména Zn, Al, Si) výhodná pro jejich fotodynamickou účinnost. Pc mají nepříznivou vlastnost, která ovlivňuje jejich fotodynamickou aplikaci. Vzhledem k rozšíření π -elektronového systému, vykazují silnou tendenci k agregaci ve formě dimerů a oligomerů. Tuto vlastnost lze ovlivnit zavedením centrálního kationtu umožňujícího axiální substituci, zavedením objemných substituentů na periferii, případně zavedením nabitých substituentů na periferii. Od roku 2001 je v Rusku používán Photosens (Obr. 10) k léčbě nádorů žaludku, kůže, rtů, dutiny ústní. Nicméně Photosens má kožní fotosensitivitu 4-6 týdnů a nejedná se o jednotnou látku, ale o směs Pc s různým stupněm sulfonace benzenových jader.⁽⁴⁾



Obr. 10 Photosens

Naftalocyaniny



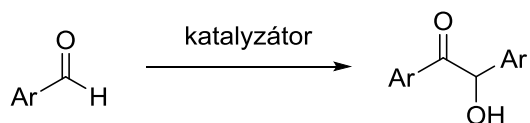
Obr. 11 Obecná struktura naftalocyaninu

Naftalocyaniny (Nc, Obr. 11) jsou rozšířené deriváty Pc. Na obvodu mají připojenou ke každé isoindolové podjednotce další benzenové jádro. Nc mají posunutou absorpci k delším vlnovým délkám (přibližně 740 až 780 nm) než Pc (670 - 680 nm). Díky posunu do blízké infračervené oblasti jsou vhodnými kandidáty na PDT u vysoce pigmentovaných nádorů včetně melanomů, které představují problém z důvodu neprůchodnosti viditelného světla. Nc mají také mnoho nevýhod, jsou méně stabilní než Pc, snadno se rozkládají v přítomnosti světla a kyslíku. Komplexy Nc s kationty, které nemají axiální ligandy, mají tendenci tvořit agregáty v roztoku (agregáty jsou fotoaktivní).⁽³⁾ Relativně velká molekula může být limitující pro přestup přes biologické membrány.⁽⁴⁾

4. METODICKÁ ČÁST

Velkou část mé diplomové práce jsem se věnoval přípravě acyloinu benzoinovou kondenzací, proto se budu touto problematikou zabývat v metodické části.

Benzoinová kondenzace je skupinová reakce, kdy dochází k reakci dvou aromatických aldehydů za vzniku α -hydroxy ketonů (acyloinů)⁽¹⁰⁾, které jsou cennými meziprodukty pro syntézu celé řady přírodních a syntetických látek.⁽¹¹⁾ (Obr. 12)



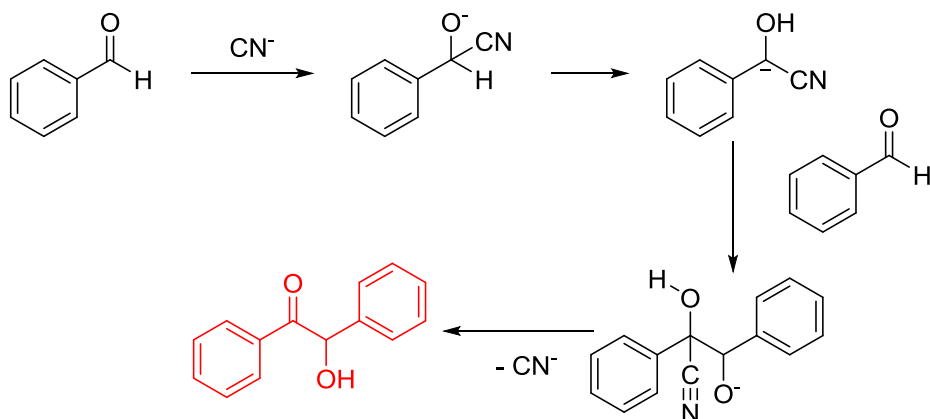
Obr. 12 Schéma přípravy acyloinu benzoinovou kondenzací

Při přípravě acyloinu benzoinovou kondenzací se používají nejčastěji dvě skupiny katalyzátorů. První skupinu tvoří tradiční katalyzátory ze skupiny kyanidů. Druhou skupinu potom tvoří látky ze skupiny *N*-heterocyklických karbenů.

4.1. Katalyzátory

4.1.1. SOLI KYANIDŮ

V roce 1832 Wöhler a Liebig popsali benzoinovou kondenzaci katalyzovanou kyanidem ve vodném roztoku ethanolu.⁽¹²⁾ Kyanidový aniont zvyšuje kyselost aldehydového vodíku, a tím, že se aduje na molekulu aldehydu, vytváří konjugovanou bázi kyanhydria, která následně reaguje s druhou molekulou aldehydu.⁽¹³⁾ Reakce je ukončena odštěpením kyanidového aniontu (Obr. 13).

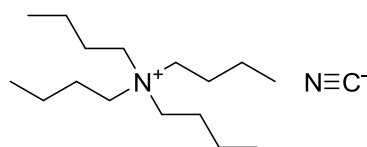


Obr. 13 Mechanismus benzoinové kondenzace katalyzované kyanidovým aniontem

Kyanidové anionty jsou výhodné pro tento typ reakcí z několika důvodů:

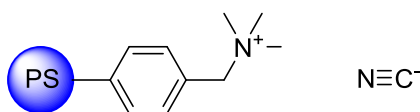
1. jedná se o dobré nukleofily
2. usnadňují přenos protonu
3. mají schopnost stabilizovat záporný náboj na aktivovaném meziproduktu
4. kyanidový aniont je dobrá odstupující skupina

Tradičně jsou používány kyanidy alkalických kovů (kyanid draselný a kyanid sodný). Byly ale popsány i kyanidy s kationtem tvořeným organickou látkou (tetrabutylammonium-kyanid) (Obr. 14), kdy reakce probíhala v tetrahydrofuranu s benzaldehydem s výtěžkem reakce 81 % .⁽¹⁴⁾



Obr. 14 Struktura kyanidu tetrabutylamonia

Další možností je požití polymerního nosiče katalyzátoru na bázi kyanidu (Obr. 15). Výhodou tohoto katalyzátoru je, že reakce může probíhat ve vodě a je šetrná pro životní prostředí. Navíc je možné použít katalyzátor minimálně $3\times$ bez výrazné změny aktivity.⁽¹⁵⁾

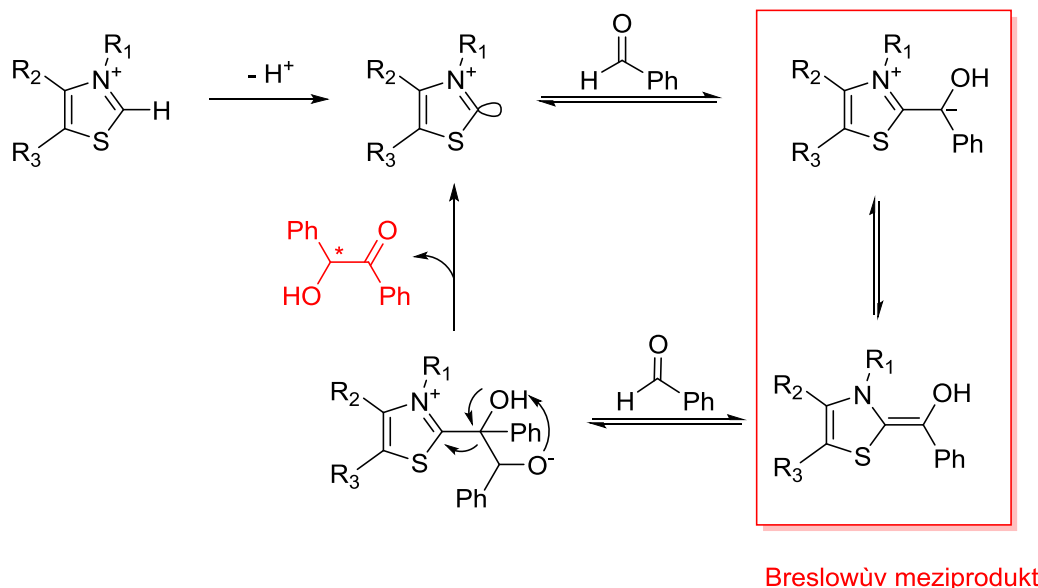


Obr. 15 Kyanidový katalyzátor vázaný na polymerní nosič

4.1.2. N-HETEROCYKlickÉ KARBENY

N-heterocyklické karbeny (NHC) jsou jedny z nejvíce studovaných ze skupiny nukleofilních karbenů. Jsou obecně známé jako vynikající ligandy pro organokovovou katalýzu. Tyto látky nacházejí ovšem rozsáhlé uplatnění také jako organokatalyzátory mimo katalýzu komplexy kovů (např. v benzoinové kondenzaci), díky tomu, že vedou často k ekonomičtějším a šetrnějším reakcím k životnímu prostředí.⁽¹⁶⁾ Mezi NHC můžeme zařadit látky odvozené od thiazoliových, triazoliových, imidazoliových nebo benzimidazoliových solí.⁽¹⁷⁾

V roce 1958 Breslow navrhl mechanismus benzoinové kondenzace katalyzované thiazoliovou solí. (Obr. 16) Aktivním katalyzátorem je thiazolin-2-yliden, karbenová sloučenina, která vzniká deprotonací z thiazoliové soli *in situ*. Breslow předpokládal, že thiazoliová sůl je deprotonována na nejvíce kyselém uhlíku, kde dochází ke tvorbě thiazolin-2-ylidenu. Nukleofilním atakem na karbonylovou skupinu aldehydu se vytváří adukt thiazoliové soli s aldehydem. Deprotonace/reprotonace vede k aktivnímu aldehydu ve formě rezonančně stabilizovaného enaminolu, tzv. Breslowova meziprojektu. Tento meziprojekt dále reaguje jako nukleofilní acylační činidlo s elektrofilním substrátem, karbonylovou skupinou druhé molekuly aldehydu. Finální meziprojekt uvolňuje acyloin a dochází k regeneraci původního karbenového katalyzátoru.⁽¹²⁾



Obr. 16 Mechanismus benzoinové kondenzace katalyzované thiazoliovou solí

V dalších podkapitolách uvádím příklady některých NHC, které lze použít při benzoinové kondenzaci.

4.1.2.1. Thiazoliové soli

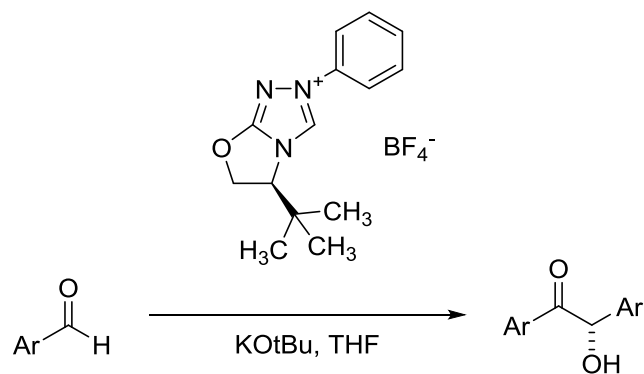
Stetter a kol. použili thiazoliové soli jako katalyzátory pro přípravu acyloinu. Ukázalo se, že alifatické aldehydy nejlépe reagují s katalyzátorem **a** (Obr. 17), zatímco aromatické substráty reagují nejlépe s katalyzátorem thiazoliové soli **b** nebo **c**.⁽¹⁸⁾



Obr. 17 Příklad thiazoliové soli jako katalyzátoru při benzoinové kondenzaci

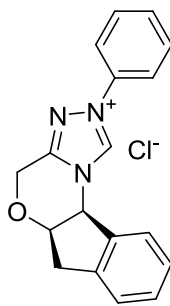
4.1.2.2. Triazoliové soli

Příkladem chirální bicyklické triazoliové soli může být látka, která poskytuje vysoké výtěžky acyloinu (80-100 %) u různě substituovaných aldehydů a ve většině reakcí vzniká i enantioselektivní produkt (Obr. 18). Aktivní katalyzátor vzniká deprotonací s *tert*-butylalkoholátem draselným (K⁺O⁻tBu), jakožto silnou bází. Vyšší množství katalyzátoru vede k vyšším výtěžkům.⁽¹⁹⁾



Obr. 18 Schéma reakce s využitím bicyklické triazoliové soli

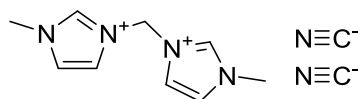
Další příklad triazoliové soli, kterou lze použít při intramolekulárních benzoinových kondenzacích, popsal Pellissier v roce 2007. (Obr. 19)⁽²⁰⁾



Obr. 19 Triazoliová sůl využívaná při intramolekulární benzoinové kondenzaci

4.1.2.3. Imidazoliové soli

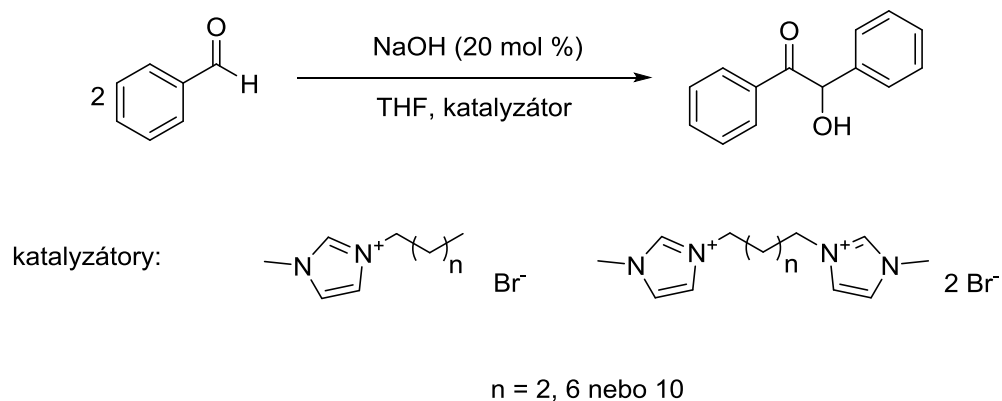
3,3'-metylen-bis(1-methyl-1*H*-imidazol-3-ium-kyanid) (Obr. 20) je příkladem imidazoliové soli, u které byla také zjištěna katalytická schopnost u různě substituovaných aldehydů.⁽²¹⁾



Obr. 20

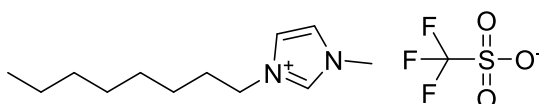
M. E. Mavis a kol. zkoumali jaký vliv má struktura imidazoliového katalyzátoru na benzoinovou kondenzaci. K porovnání vlastností použili mono- a dikationtovou imidazoliovou sůl. Dikationtová imidazoliová sůl s dlouhým spojovacím řetězcem

($n = 10$) mezi imidazoliiovými kruhy byla účinnější než monokationtová sůl se stejně dlouhým řetězcem. S rostoucí délkou uhlíkatého řetězce došlo ke zvýšení výtěžku reakce a reakční rychlosti. (Obr. 21) ⁽²²⁾



Obr. 21 Struktury mono a dikationtových imidazoliiových solí

A. Aupoix a kol. zkoumali vliv mikrovlnného záření na průběh benzoinové kondenzace. Nejlepších výsledků dosáhli při použití imidazoliového katalyzátoru (Obr. 22), 1,8-diazabicyklo[5.4.0]undec-7-enu (DBU) jako silné báze, bez přítomnosti rozpouštědla, za teploty 80 °C během 1 hodiny. ⁽²³⁾

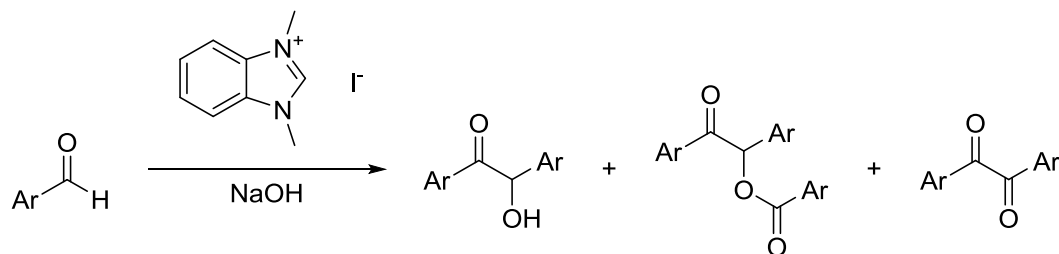


Obr. 22 Struktura katalyzátoru benzoinové kondenzace ovlivněné mikrovlnným zářením

4.1.2.4. Benzimidazoliové soli

V. Hahnvajawong a kol. porovnávali vliv rozpouštědla na benzoinovou kondenzaci katalyzovanou *N,N*-dimethylbenzimidazolium-jodidem v přítomnosti hydroxidu sodného jako báze. Série reakcí byla prováděna buď v iontové kapalině (1-butyl-3-methylimidazolium-hexafluorofosfátu), ve vodě, nebo v nepřítomnosti rozpouštědla. Při použití iontové kapaliny jako rozpouštědla byly výtěžky 60-83 %, přičemž vedlejší produkty (aroylaroiny) vznikají mezi 9-19 %. Při reakci benzaldehydu nebo *p*-toluenaldehydu ve vodném roztoku s 20 % *N,N*-dimethylbenzimidazolium-jodidem v 0,2 M NaOH vznikaly acyloiny kvantitativně. Při kondenzaci *p*-chlorobenzaldehydu byl výtěžek jen 34 %, zato docházelo ke vzniku vedlejšího

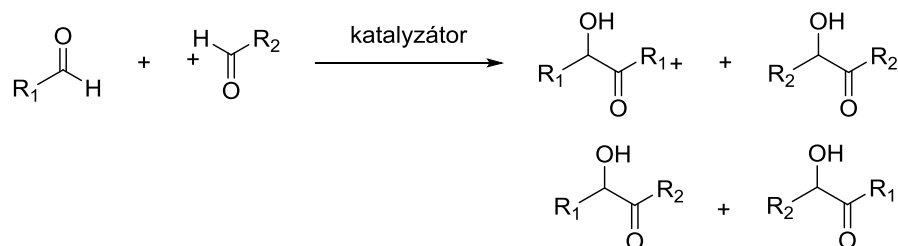
produktu - diketonu (59 %). V reakci, kde nebylo použito žádné rozpouštědlo, byly výtěžky acyloinů nižší než při použití vody a docházelo k vyšším výtěžkům vedlejšího produktu - diketonu (Obr. 23).⁽²⁴⁾



Obr. 23 Obecné schéma reakce

4.2. Příprava nesymetrického acyloinu

Obecně lze předpokládat, že při reakci dvou rozdílných aldehydů vzniknou dva symetrické a dva nesymetrické acyloiny viz Obr. 24.⁽¹⁰⁾



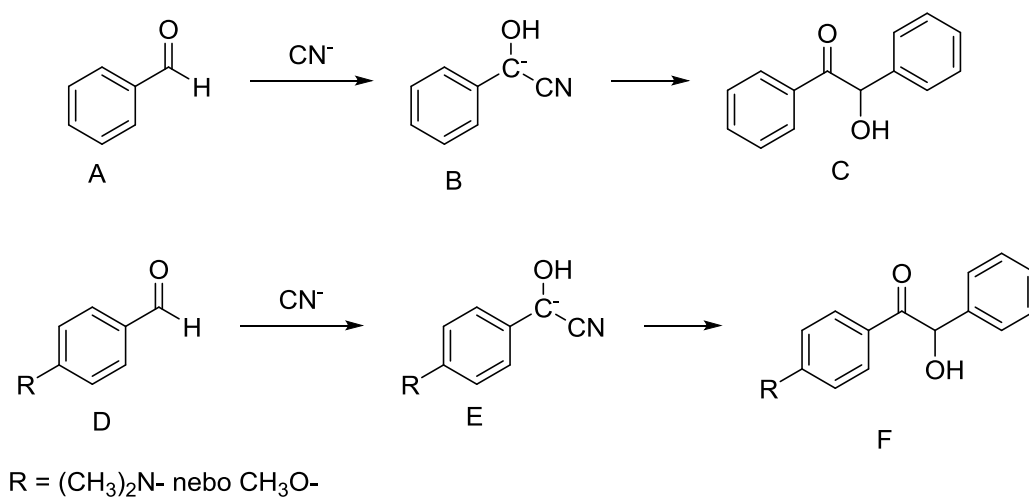
Obr. 24 Obecné struktury acyloinů při reakci dvou různých aldehydů

Jak již bylo uvedeno, benzoinová kondenzace zahrnuje dva postupné nukleofilní ataky. Kyanidový anion bude jako první reagovat s aldehydem, kde karbonylová skupina má menší elektronovou hustotu. Pokud bude reagovat benzaldehyd s 4-methoxybenzaldehydem (nebo *p*-dimethylaminobenzaldehydem), v důsledku elektron donorových vlastností methoxy skupiny (dimethylaminové skupiny) bude nejnižší elektronová hustota na karbonylové skupině u benzaldehydu. Oba meziproducty (**B** a **E**) budou vznikat, ale s vyšší dominancí pro ten odvozený od benzaldehydu (**B**). Dalším krokem je nukleofilní atak mezi nukleofilním meziproductem od benzaldehydu (**B**) a meziproductem od druhého aldehydu (**E**) a substrátem. Elektron donorové vlastnosti *p*-methoxy skupiny (nebo *p*-dimethylanimino skupiny) budou hrát klíčovou roli. Zvýšená elektronová hustota na uhlíku v meziproductu **E** bude mít za následek, že bude

upřednostňováno párování nukleofilních substrátů **E** + **A**. Naopak párování **B** + **D** nebude probíhat vůbec.

To vysvětluje, proč při reakci benzaldehydu s 4-methoxybenzaldehydem při benzoinové kondenzaci dochází k tvorbě dvou acyloinů, a proč asymetrický benzoin s karbonylovou skupinou s nejvyšším elektronovým nedostatkem tvoří část obsahující skupinu CHOH a karbonylová skupina s nejvyšší elektronovou hustotou vytváří v benzoinu karbonylovou skupinu (C=O).

Pouze jeden typ smíšeného acyloinu získáme při reakci dvou aldehydů s rozdílnou elektronovou hustotou. Naopak pokud jsou elektronové hustoty podobné, získáme směs acyloinů. (Obr. 25) ⁽²⁵⁾

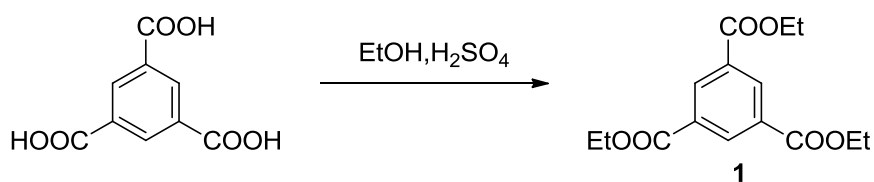


Obr. 25 Schéma přípravy asymetrického acyloinu

5. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

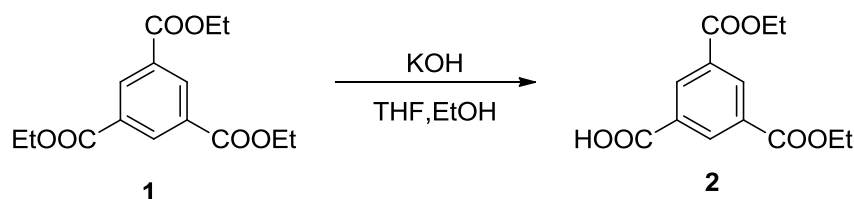
Výchozí látky a rozpouštědla pro reakce byly zakoupeny od firem Lach-Ner, Penta, Sigma-Aldrich nebo Acros. Teplota tání sloučenin byla měřena pomocí digitálního přístroje ELECTROTHERMAL IA9200. Průběh reakcí a čistota výsledných produktů byly sledovány pomocí tenkovrstvé chromatografie (TLC) na deskách Merck Kieselgel 60 F254, detekce UV lampou probíhaly při vlnové délce 254 nm nebo 366 nm. Čištění produktů bylo prováděno pomocí sloupcové chromatografie na stacionární fázi Merck Kieselgel 60 (0,040-0,063 mm). Mobilní fáze, které byly použity, jsou popsány u jednotlivých reakcí níže. Infračervená spektra byla měřena IČ spektrofotometrem Nicolet 6700 v ATR módu na Katedře anorganické a organické chemie. ^1H NMR a ^{13}C NMR spektra byla měřena na přístroji Varian Mercury Vx BB 300 nebo VNMR S500 na Katedře anorganické a organické chemie. Elementární analýza byla provedena pomocí přístroje Automatic Microanalyser EA1110CE. Spektra UV/VIS byla měřena pomocí přístroje Shimadzu UV-2600PC spectrophotometer. Fluorescenční spektra byla získána na AMINCO-Bowman Series 2 Luminescence Spectrometer na Katedře biofyziky a fyzikální chemie. Hmotnostní spektrometrie (MALDI-TOF) byla provedena na přístroji AB Sciex 4800 MALDI TOF/TOF spectrometer. Přístroj byl kalibrován externě pětibodovou kalibrační metodou pomocí Peptide Calibration Mix1 (LaserBioLabs, Sophia-Antipolis, France). Roztok měřeného vzorku v dichlormethanu (přibližně 10 μM , 1,5 μl) byl smíchán s matricí (*trans*-2-[3-(4-*tert*-butylfenyl)-2-metyl-2-propenyliden]-malononitril) v dichlormethanu, nanesen na destičku a důkladně vysušen.

5.1. Příprava triethylesteru kyseliny trimesinové (1)



Kyselina trimesinová (20 g, 95,2 mmol) byla rozpuštěna v bezvodém ethanolu (145 ml) a směs byla zahřata pod zpětným chladičem k teplotě varu. Vzniklá suspenze se rozpustila až za tepla. Po rozpuštění byla přidána 96% (v/v) kyselina sírová (3,2 ml) a směs byla dále zahřívána při teplotě varu rozpouštědla 6 hodin. Po hodině a půl byl vyměněn chladič a oddestilovalo se cca 75-80 ml, poté se opět pokračovalo v zahřívání pod zpětným chladičem. Po třech hodinách se objevila bílá sraženina. Po šesti hodinách byla suspenze ochlazená a zneutralizována nasyceným roztokem hydrogenuhličitanu sodného (10% roztok). Bílá sraženina byla odsáta a promyta vodou. Analytický vzorek byl překrystalizován z ethanolu. Látka byla připravena dle publikovaného postupu.⁽²⁶⁾
Výtěžek: 23,9 g bílé krystalické látky (85 % teoretického výtěžku).
T. t. 132,2-133,1 °C (dle literatury 136 °C).⁽²⁶⁾

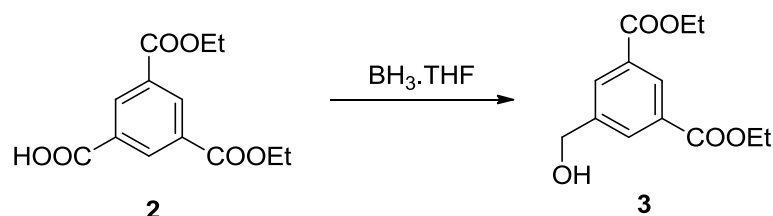
5.2. Příprava diethylesteru kyseliny trimesinové (2)



Triethylester kyseliny trimesinové **1** (36,1 g, 122,7 mmol) byl rozpuštěn v tetrahydrofuranu (THF) (75 ml). Směs byla zahřívána při teplotě varu pod zpětným chladičem, dokud se krystaly nerozpustily. Po rozpuštění byl přidán bezvodý ethanol (120 ml) a práškový 85% hydroxid draselný (8,9 g, 134,82 mmol). Po 24 hodinách se roztok nechal ochladit. Na vakuové odparce byla rozpouštědla odpařena do sucha a byla přidána destilovaná voda (400-500 ml). Vodný roztok byl třikrát vytřepán s dichlormethanem. Organická fáze byla vysušena bezvodým síranem sodným, přefiltrována a odpařena do sucha, čímž bylo získáno 6,3 g (17,4 %) nezreagovaného triethylesteru kyseliny trimesinové. Vodná fáze byla okyselena koncentrovanou kyselinou chlorovodíkovou. Vysrážený produkt byl odsát a promyt vodou. Dále byl produkt překrystalizován z ethanolu za zisku 15,38 g bílé krystalické látky **2** (47 % teoretického výtěžku). Matečný louh byl dále zahuštěn a ochlazen v mrazničce. Vypadlé krystaly byly odsáty za zisku 4,2 g směsi mono a diesteru trimesinové kyseliny. Průběh a čistota reakce byly průběžně kontrolovány pomocí tenkovrstvé chromatografie (TLC). Jako mobilní fáze byla použita směs hexan:ethyl-acetát:kyselina octová (6:3:1). Látka byla připravena dle publikovaného postupu, totožnost byla ověřena změřením NMR spekter. ⁽²⁷⁾

¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm) 10,94 (1H, bs, COOH), 8,98-8,84 (3H, m, ArH), 4,45 (4H, q, *J* = 7,1 Hz, CH₂), 1,44 (6H, t, *J* = 7,1 Hz, CH₃). ¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ (ppm) 170,4, 164,8, 135,4, 135,0, 131,7, 130,2, 61,8, 14,3.

5.3. Příprava diethylesteru kyseliny 5-(hydroxymethyl)benzen-1,3-dikarboxylové (3)

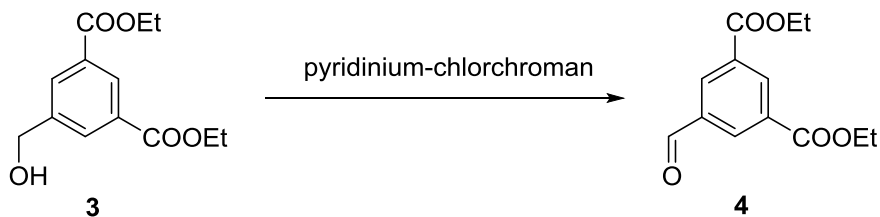


Diethylester kyseliny trimesinové **2** (17,6 g, 66,1 mmol) byl rozpuštěn v bezvodém THF (100 ml) v tříhrdlé baňce opatřené míchadlem, septem a děličkou pod argonovou atmosférou. Baňka byla ochlazena v lázni s ledem a za chlazení byl přidáván děličkou 1M roztok $\text{BH}_3\text{-THF}$ (100 ml, 100 mmol) po dobu 1 hodiny za intenzivního míchání, přičemž docházelo ke vzniku bílé sraženiny. Reakční směs byla dále míchaná za pokojové teploty 5 hodin a následně byla reakce ukončena přidáním po kapkách 150 ml směsi THF:voda (1:1) za chlazení ledem. Tetrahydrofuran byl odpařen za sníženého tlaku na rotační vakuové odparce a vodný zbytek byl vytřepán do ethyl-acetátu. Organická vrstva byla oddělena, vysušena bezvodým síranem sodným a odpařena. Látka byla dále přečištěna sloupcovou chromatografií (350 g silikagelu). Jako mobilní fáze byla použita směs hexan:ethyl-acetát (1:1). Analytický vzorek byl překrytalizován ze směsi ethanol/voda. Látka byla připravena dle publikovaného postupu, totožnost byla ověřena změřením NMR spekter a teploty tání.⁽²⁶⁾

Výtěžek: 13,4 g bílé krystalické látky (79 % teoretického výtěžku).

T.t. 82,3-83,1 °C (dle literatury 82-83 °C).⁽²⁶⁾ ^1H NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz) δ (ppm) 8,36-8,27 (1H, m, ArH), 8,16-8,09 (2H, m, ArH), 5,49 (1H, t, $J= 5,7$ Hz, OH), 4,62 (2H, d, $J= 5,7$ Hz, CH_2OH), 4,33 (4H, q, $J= 7,1$ Hz, CH_2O), 1,33 (6H, t, $J= 7,1$ Hz, CH_3). ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 75 MHz) δ (ppm) 165,2, 144,5, 131, 3, 130,5, 128,0, 62,0, 61,3, 14,3.

5.4. Příprava diethylesteru kyseliny 5-formyl-1,3-dikarboxylové (4)

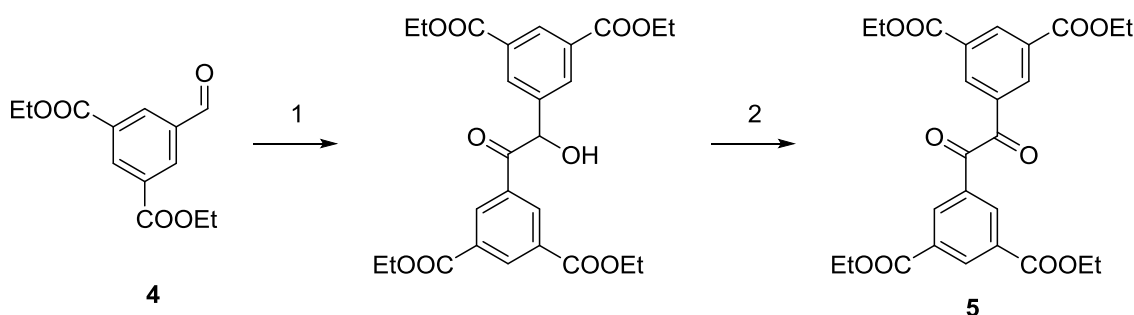


Baňka s alkoholem **3** (13,4 g, 53,1 mmol) byla naplněna argonem a byl přidán bezvodý chloroform stabilizovaný amylenem (120 ml). Krystaly se ihned rozpustily. Za míchání byl postupně přidáván pyridinium-chlorochroman (28,6 g, 132,75 mmol). Vznikla hnědočerná suspenze, která byla dále míchána za pokojové teploty. Postupně se vysrážela černá sraženina po stěnách baňky. Průběh reakce byl sledován pomocí TLC s mobilní fází hexan:ethyl-acetát (3:1). Po čtyřech hodinách byla reakce ukončena. Obsah baňky byl dekantován do diethyletheru. Černá sraženina po stěnách baňky byla promyta etherem a oba etherové roztoky byly přefiltrovány přes vrstvu hlínky (CELITE) na fritě. Filtrát byl odpařen. Látka byla dále přečištěna sloupcovou chromatografií (180 g silikagelu), jako mobilní fáze byla použita směs hexan:ethyl-acetát (1:1). Vznikla bílá krystalická látka. Látka byla připravena dle publikovaného postupu, totožnost byla ověřena změřením NMR spekter a teploty tání. ⁽²⁸⁾

Výtěžek: 11,8 g (89 % teoretického výtěžku).

T. t. 88,0-88,9 °C (dle literatury 90 °C) ⁽²⁹⁾. ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm) 10,12 (1H, s, CHO), 8,90 (1H, t, *J*= 1,7 Hz, ArH), 8,69 (2H, d, *J*= 1,8 Hz, ArH), 4,44 (4H, q, *J*= 7,1 Hz, CH₂), 1,43 (6H, t, *J*= 7,1 Hz, CH₃). ¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ (ppm) 190,5, 164,7, 136,7, 135,6, 134,1, 132,1, 77,4, 77,0, 76,6, 61,8, 14,3.

5.5. Příprava tetraethylesteru kyseliny 5, 5'-oxalyldiisofthalové (5)



1. thiazoliová sůl, DBU, EtOH
2. $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, NH_4NO_3 , CH_3COOH

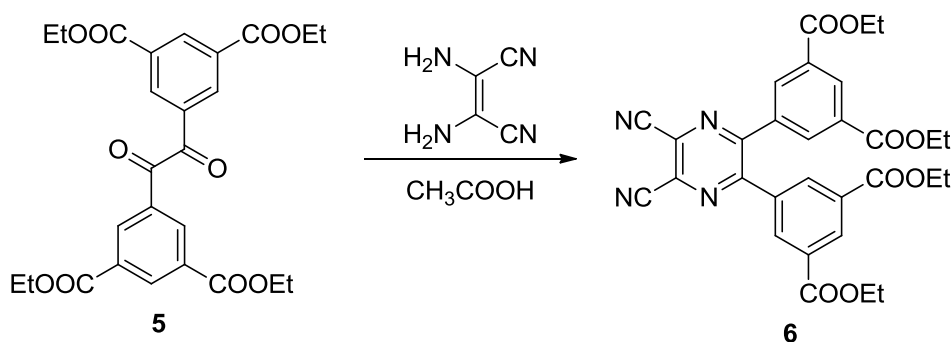
Do tříhrdlé baňky s aldehydem **4** (11,8 g, 47,2 mmol) byl přidán bezvodý ethanol (200 ml) a roztok byl probublán argonem. Směs byla dále zahřívána pod zpětným chladičem k teplotě varu, až byl aldehyd rozpuštěn. Následně byla přidána thiazoliová sůl (5-(2-hydroxyethyl)-3,4-dimethylthiazol-3-ium-jodid) (670 mg, 2,35 mmol) a DBU (350 μl , 2,3 mmol). Roztok se zbarvil do červena. Reakce probíhala dále za teploty varu rozpouštědla. Průběh reakce byl sledován pomocí TLC, kde jako mobilní fáze byla použita směs hexan:ethyl-acetát (3:10). Po 3 hodinách bylo zahřívání ukončeno, byl odpařen ethanol a byla přidána destilovaná voda. Následně byl produkt vytřepán do ethyl-acetátu. Organická fáze byla vysušena síranem sodným a odpařena do sucha. Vzniklý acyloin nebyl izolován, ale byl ihned dále oxidován na diketon.

Produkt z předchozí reakce byl rozpuštěn v kyselině octové (200 ml), byl přidán dusičnan amonný (2,36 g, 29,5 mmol) a octan měďnatý (47 mg, 258,24 mmol) a směs byla zahřívána 2 hodiny za teploty varu rozpouštědla pod zpětným chladičem. Poté byla kyselina octová odpařena a produkt byl vyextrahován tetrahydrofuranem. Tetrahydrofuranový roztok byl přefiltrován a filtrát byl odpařen do sucha. Produkt reakce byl dále čištěn sloupcovou chromatografií, při které byla jako mobilní fáze použita směs hexan:ethyl-acetát (4:1). Z reakce bylo získáno 1,45 g (12,3 %) původního aldehydu **4** a 9 g produktu **5** (76 % teoretického výtěžku) jako bílá krystalická látka.

T. t.: 127,3-127,6 °C. ^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz) δ (ppm) 8,96 (2H, t, $J= 1,6$ Hz, ArH), 8,81 (4H, d, $J= 1,7$ Hz, ArH), 4,44 (8H, q, $J= 7,1$ Hz, CH_2), 1,43 (12H, t, $J= 7,1$ Hz, CH_3). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 125 MHz) δ (ppm) 14,3; 62,0; 132,2; 133,2; 134,6; 136,2;

164,5; 190,9. IČ (ATR): $\nu = 3088, 2988, 2941, 1729$ (CO), 1682 (CO), 1599, 1445, 1371, 1323, 1242, 1184, 1106, 1024 cm^{-1} . Elementární analýza pro $\text{C}_{26}\text{H}_{26}\text{O}_{10}$ (%): C 62,65; H 5,26; nalezeno: C 62,21; H 5,38.

5.6. Příprava tetraethylesteru kyseliny (5,6-dikyanopyrazin-2,3-diyl)diisoftalové (6)

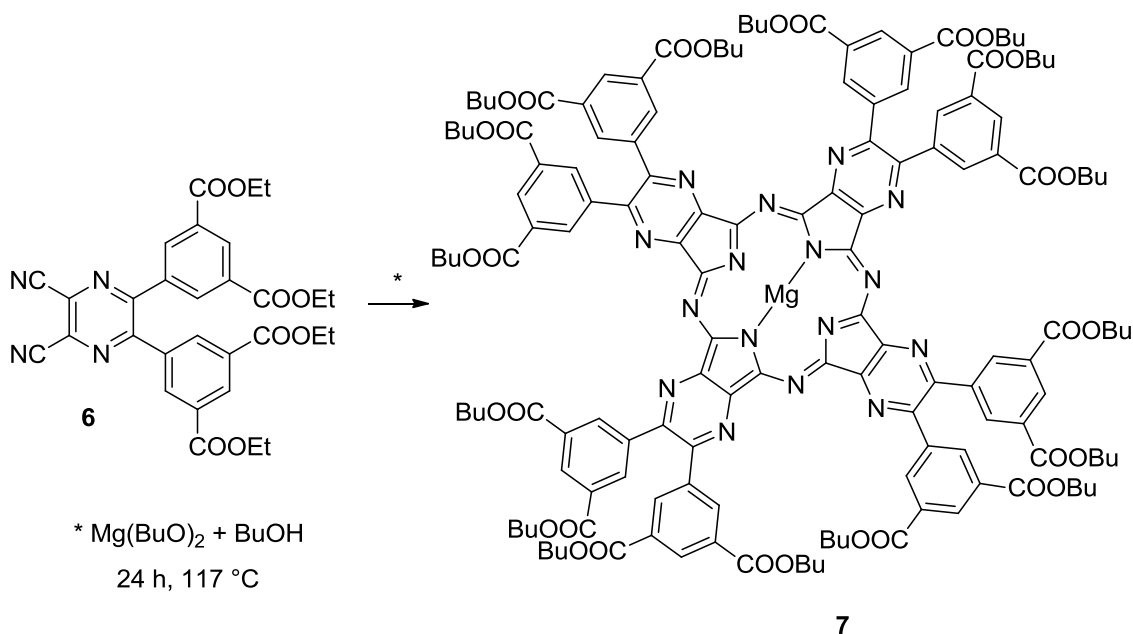


Diketon **5** (100 mg, 0,2 mmol) byl rozpuštěn v kyselině octové (5 ml) a byl přidán diaminomaleonitril (26 mg, 0,24 mmol). Reakce probíhala za teploty varu rozpouštědla pod zpětným chladičem. Po 1 hodině byla baňka ochlazená a kyselina octová byla odpařena. Průběh a čistota reakce byly sledovány pomocí TLC, kde byla použita jako mobilní fáze směs hexan:ethyl-acetát (3:1). Látka byla dále přečištěna sloupcovou chromatografií, jako mobilní fáze byla použita směs hexan:ethyl-acetát (3:1). Byla získána žlutá krystalická látka.

Výtěžek: 97,7 mg (86 % teoretického výtěžku). V další reakci ve větším měřítku se vycházelo z 2 g diketonu **5** a bylo získáno 1,75 g produktu **6** (76 % teoretického výtěžku).

T. t.: 145,4-146,7 °C. ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm) 8,75 (2H, t, $J = 1,7$ Hz, ArH), 8,41-8,30 (4H, m, ArH), 4,36 (8H, q, $J = 7,2$ Hz, CH_2), 1,35 (12H, t, $J = 7,1$ Hz, CH_3). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz) δ (ppm) 14,2; 61,9; 112,6; 130,8; 132,0; 132,9; 134,5; 135,2; 153,6; 164,4. IČ (ATR): $\nu = 3089, 2988, 2910, 1719$ (CO), 1600, 1365, 1314, 1246, 1212, 1140, 1097, 1029 cm^{-1} . Elementární analýza pro $\text{C}_{30}\text{H}_{26}\text{N}_4\text{O}_8$ (%): C 63,15; H 4,59; N 9,82 nalezeno: C 63,09; H 5,16; N 9,86.

5.7. Příprava 2,3,9,10,16,17,23,24-oktakis[3,5-bis(butoxykarbonyl)fenyl]tetrapyrazinoporfyrazináto hořečnatého komplexu (7)



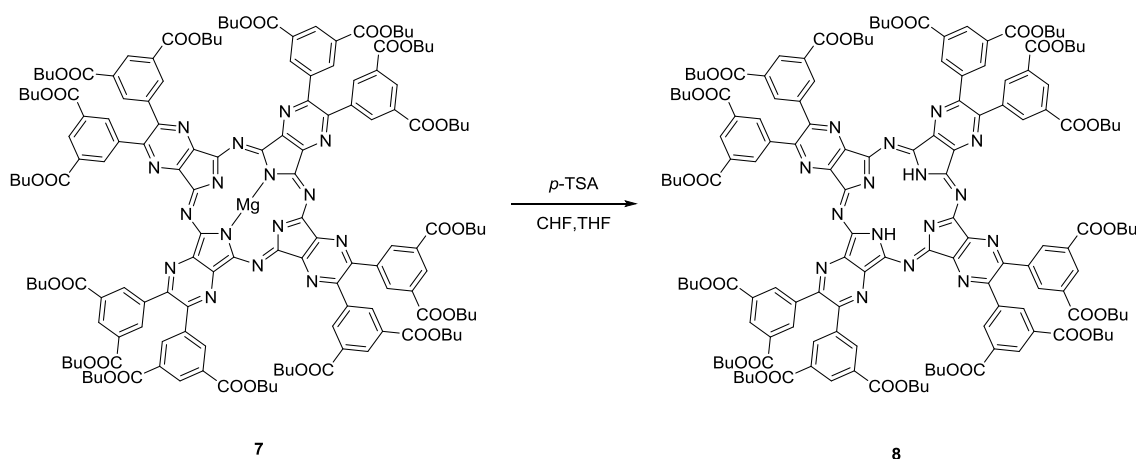
Do baňky s bezvodým butanolem (20 ml) byl přidán hořčík (0,300 g, 12,5 mmol) a pár krystalů jódu. Směs byla míchána pod zpětným chladičem při teplotě varu rozpouštědla, dokud veškerý hořčík nezreagoval na butanolát hořečnatý (přibližně 5 hodin). Poté byl přidán dikarbonitril **6** (1 g, 1,75 mmol) a reakce dále pokračovala pod zpětným chladičem při teplotě varu rozpouštědla. Po 24 hodinách byla baňka ochlazena, obsah baňky byl částečně odpařen na vakuové odparce a byl převeden do kádinky se směsí voda:methanol:kyselina octová (10:10:1, 300 ml). Suspenze byla míchána půl hodiny při pokojové teplotě. Vysrážený produkt byl odsát na fritě a promyt vodou a methanolem. Pevná látka byla následně rozpuštěna v chloroformu a roztok byl přefiltrován. Filtrát byl zahuštěn a nakapal se do methanolu, kde došlo k vysrážení produktu. Následně byl tento postup několikrát opakován. Byla získána zelená pevná látka.

Výtěžek: 840 mg (59 % teoretického výtěžku).

^1H NMR ($\text{CDCl}_3/\text{pyridin-}d_5$ 3:1, 300 MHz) δ (ppm) 9,0 (8H, t, $J= 1,6$ Hz, ArH), 8,94 (16H, d, $J= 1,7$ Hz, ArH), 4,47 (32H, t, $J= 6,6$ Hz, OCH_2), 1,94-1,71 (32H, m, OCH_2CH_2), 1,65-1,45 (32H, m, CH_2CH_3), 1,07 (48H, t, CH_3) ^{13}C NMR

(CDCl₃/pyridin-d₅ 3:1, 75MHz) δ (ppm) 13,9; 19,4; 30,8; 65,5; 131,6; 131,8; 136,0; 139,7; 151,3; 153,4; 165,3. IČ (ATR): ν = 2962, 2873, 1724, 1603, 1541, 1459, 1386, 1279, 1240, 1141, 1091 cm⁻¹. Elementární analýza pro C₁₅₂H₁₆₈MgN₁₆O₃₂·3H₂O (%): C 64,98; H 6,24; N 7,98 nalezeno: C 64,87; H 6,79; N 8,04. UV/VIS (pyridin): λ_{\max} (1 μ M) (ϵ) = 663 (287 900), 601 (33 800), 373 nm (127 100 mol⁻¹dm³cm⁻¹). MS (MALDI-TOF): m/z: 2752,9 [M, 100%]⁺, 2724,9 [M-OBu+OEt, 25%]⁺.

5.8. Příprava 2,3,9,10,16,17,23,24-oktakis[3,5-bis(butoxykarbonyl)fenyl]tetrapyrazinoporfyrazinu (8)



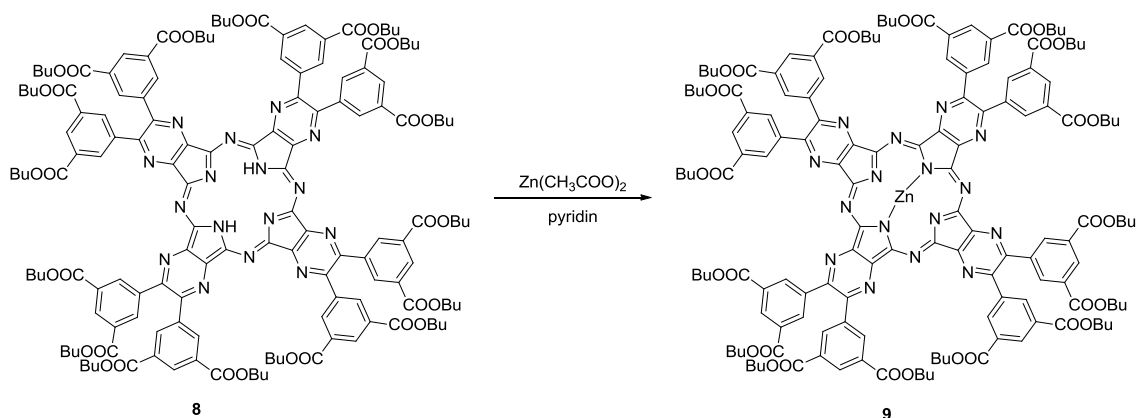
Hořčnatý komplex **7** (700 mg, 0,254 mmol) byl rozpuštěn v chloroformu (30 ml) a byla přidána kyselina *p*-toluensulfonová (*p*-TSA) (480 mg, 2,53 mmol) rozpuštěná v THF (50 ml). Směs byla míchána při pokojové teplotě. Po 1 hodině byla přidána další kyselina *p*-toluensulfonová (480 mg, 2,53 mmol) rozpuštěná v THF (40 ml). Průběh a čistota reakce byly sledovány pomocí TLC, kde byla použita mobilní fáze směs chloroform:THF (10:1). Po 6 hodinách byla směs odpařena na vakuové odparce do sucha a promyta vodou. Suspenze byla odsáta na fritě a promyta methanolem. Produkt reakce byl čištěn sloupcovou chromatografií, při které byla jako mobilní fáze použita směs chloroform:THF (30:1). Získaný produkt (zelená pevná látka) byl promyt hexanem a odpařen do sucha.

Výtěžek: 561 mg (81 % teoretického výtěžku).

¹H NMR (CDCl₃/pyridin-d₅ 3:1, 300 MHz) δ (ppm) 9,13-8,19 (24H, m, ArH), 4,81-3,89 (32H, m, OCH₂), 2,13-1,68 (32H, m, OCH₂CH₂), 1,66-1,40 (32H, m, CH₂CH₃), 1,18-

0,86 (48H, m, CH₃). ¹³C NMR (CDCl₃/pyridin-d₅ 3:1, 75 MHz) δ (ppm) 13,66; 13,81; 13,86; 13,90; 13,93; 19,28; 19,34; 19,40; 30,71; 30,82; 30,85; 30,88; 65,36; 65,41; 65,53; 131,50; 131,82; 136,06; 139,09; 140,00; 140,11; 140,20; 152,61; 153,92; 154,00; 164,83; 164,90; 164,92; 165,14; 165,18; 165,35; 165,43. IČ (ATR): ν = 3084, 2960, 2873, 1724, 1603, 1541, 1458, 1280, 1241, 1139, 1093 cm⁻¹. Elementární analýza pro C₁₅₂H₁₇₀N₁₆O₃₂·5H₂O (%): C 64,67; H 6,45; N 7,94 nalezeno: C 64,88; H 6,45; N 7,89. UV/VIS (pyridin): λ_{max} (1 μM) (ε)= 666 (200 400), 607 (29 500), 373 nm (100 300 mol⁻¹ dm³ cm⁻¹). MS (MALDI-TOF): m/z: 2731,1 [M, 100%]⁺, 2703,1 [M-OBu+OEt, 25%]⁺.

5.9. Příprava 2,3,9,10,16,17,23,24-oktakis[3,5-bis(butoxykarbonyl)fenyl]tetrapyrazinoporfyrizináto zinečnatého komplexu (9)

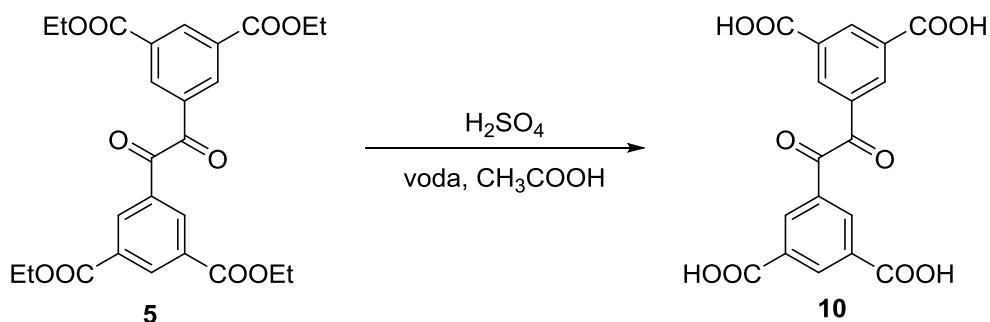


Bezkovový derivát **8** (327 mg, 0,12 mmol) byl rozpuštěn v pyridinu (50 ml) a byl přidán bezvodý octan zinečnatý (220 mg, 1,2 mmol). Směs byla zahřívána za teploty varu rozpouštědla pod zpětným chladičem. Po 2 hodinách byla baňka ochlazená a směs byla odpařena na vakuové odparce do sucha. Poté byla přidána destilovaná voda za vzniku suspenze, která byla odsáta na fritě a promyta methanolem. Získaný produkt byl třikrát rozpuštěn ve směsi chloroform/acetone, rozpouštědla byla odpařena s následným promytím methanolem a odsátím na fritě. Produkt reakce byl čištěn sloupcovou chromatografií, při které byla jako mobilní fáze použita směs chloroform:THF (20:1). Získaný produkt (zelená pevná látka) byl promyt hexanem a odpařen do sucha.

Výtěžek: 217,4 g (65 % teoretického výtěžku).

^1H NMR ($\text{CDCl}_3/\text{pyridin-d}_5$ 3:1, 300 MHz) δ (ppm) 8,67-8,63 (8H, m, ArH), 8,61-8,57 (16H, m, ArH), 4,16-4,06 (32H, m, OCH_2), 1,53-1,41 (32H, m, OCH_2CH_2), 1,24-1,09 (32H, m, CH_2CH_3), 0,75-0,65 (48H, m, CH_3). ^{13}C NMR ($\text{CDCl}_3/\text{pyridin-d}_5$ 3:1, 75 MHz) δ (ppm) 13,9; 19,4; 30,9; 65,6; 131,8; 131,9; 136,1; 139,6; 152; 154; 165,3. IČ (ATR): $\nu = 3082, 2961, 2874, 1724, 1603, 1542, 1464, 1280, 1241, 1241, 1140, 1094 \text{ cm}^{-1}$. Elementární analýza pro $\text{C}_{152}\text{H}_{168}\text{N}_{16}\text{O}_{32}\text{Zn}\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (%): C 63,25; H 6,22; N 7,76 nalezeno: C 63,21; H 6,38; N 7,81. UV/VIS (pyridin): λ_{max} (1 μM) (ϵ) = 659 (306 000), 596 (40 200), 378 nm (156 300 $\text{mol}^{-1}\text{dm}^3\text{cm}^{-1}$). MS (MALDI-TOF): m/z : 2832,1 $[\text{M}+\text{K}]^+$, 2816,1 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 2793,1 $[\text{M}, 100\%]^+$, 2765,1 $[\text{M}-\text{OBu}+\text{OEt}, 25\%]^+$.

5.10. Příprava 5,5'-oxalyldiisoftalové kyseliny (10)



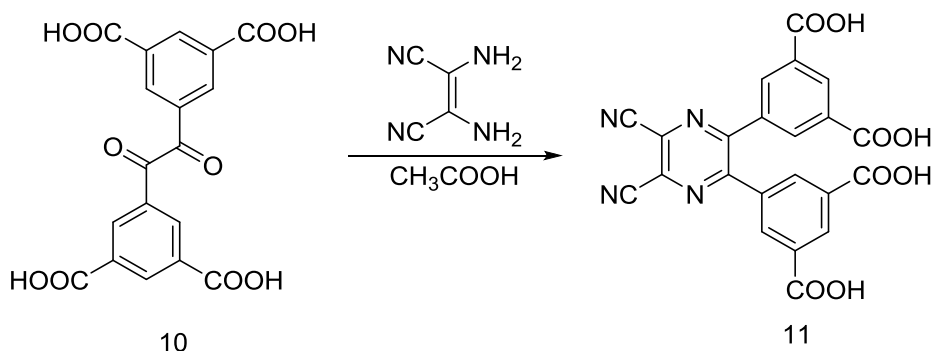
Diketon **5** (500 mg, 1 mmol) byl rozpuštěn za tepla v kyselině octové (5 ml) a byla přidána směs kyselina sírová:voda (4:1, 11 ml). Baňka se směsí byla dále zahřívána pod zpětným chladičem při teplotě lázně 140 °C. Po pár minutách se vytvořila suspenze. Po 19 hodinách se obsah baňky ochladil a kyselina octová byla odpařena. Následně byla směs ochlazena v mrazničce (2 hodiny). Vyloučené krystaly byly odsáty na fritě bez filtračního papíru a promyty vodou. Byla získána hnědá pevná látka dostatečně čistá pro další reakce. Analytický vzorek byl překrystalizován z kyseliny octové za vzniku světle žluté krystalické látky.

Výtěžek: 0,363 g (94 % teoretického výtěžku). V další reakci ve větším měřítku se vycházelo z 5,08 g diketonu **5** a bylo získáno 3,28 g produktu **10** (85 % teoretického výtěžku).

T. t. 373,5-374,5 °C (zčerná). ^1H NMR (DMSO-d_6 , 300 MHz) δ (ppm) 13,72 (4H, bs, OH), 8,77-8,70 (6H, m, ArH). ^{13}C NMR (DMSO-d_6 , 75MHz) δ (ppm) 132,3; 133,5; 134,7; 135,2; 165,9; 189,7. IČ (ATR): $\nu = 1700, 1684, 1457, 1276, 1209, 1136 \text{ cm}^{-1}$.

Elementární analýza pro $C_{18}H_{10}O_{10} \cdot 0,5H_2O$ (%): C 54,70; H 2,81; nalezeno: C 54,75; H 3,04.

5.11. Příprava 5,5'-(5,6-dikyanopyrazin-2,3-diyl)diisoftalové kyseliny (**11**)

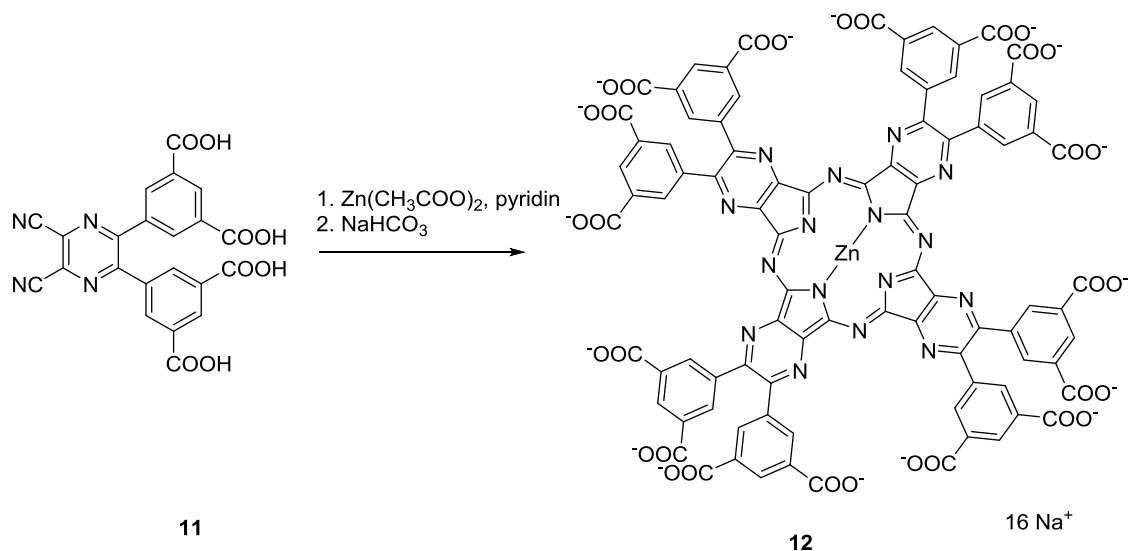


Diketon **10** (27 mg, 0,07 mmol) byl rozpuštěn za tepla v kyselině octové (3 ml) a poté byl přidán diaminomaleonitril (13 mg, 0,120 mmol). Směs byla dále zahřívána při teplotě varu rozpouštědla 3 hodiny pod zpětným chladičem. Poté byla kyselina octová odpařena na vakuové odparce do sucha. Látka byla dále opakovaně přečištěna sloupcovou chromatografií, jako mobilní fáze byla použita směs hexan:ethylacetát:kyselina octová (4:3:1). Finální produkt byl překrytalizován následujícím postupem: produkt se rozpustil v acetonu s minimálním množstvím methanolu (pár kapek) a postupně se přidával hexan až do zakalení roztoku. Poté byla směs odstavena ke krystalizaci.

Výtěžek: 7,2 mg (22,5 % teoretického výtěžku) bílých krystalů (po krystalizaci). V další reakci ve větším měřítku se vycházelo z 3,38 g diketonu **10** a bylo získáno 1,88 g produktu **11** (47 % teoretického výtěžku).

T. t. od 275 °C černá, při 305 °C rozklad. ¹H NMR (aceton-d₆, 300 MHz) δ (ppm) 8,72 (2H, t, *J*= 1,7 Hz, ArH), 8,44 (4H, d, *J*= 1,7 Hz ArH). ¹³C NMR (aceton-d₆, 75MHz) δ (ppm) 114,5; 131,9; 132,7; 133,1; 135,8; 137,4; 155,2; 165,9. IČ (ATR): ν = 1644, 1604, 1582, 1523, 1475, 1429, 1347, 1296,1242 cm⁻¹. Elementární analýza pro $C_{22}H_{10}N_4O_8 \cdot 1,5H_2O$ (%): C 54,44; H 2,70; N 11,54 nalezeno: C 54,46; H 2,65; N 11,46.

5.12. Příprava sodné soli 2,3,9,10,16,17,23,24-oktakis(3,5-dikarboxylátofenyl)tetrapyrazinoporfyrinátu zinečnatého komplexu (12)



Do baňky byl navážen pyrazin **11** (500 mg, 1,09 mmol), bezvodý octan zinečnatý (800 mg, 4,37 mmol) a byl přidán bezvodý pyridin (5 ml). Baňka byla naplněna argonem a směs byla zahřívána při teplotě varu rozpouštědla pod zpětným chladičem. Po 17 hodinách byla baňka ochlazená, zelená suspenze byla rozředěna pyridinem a pevná látka odsáta na fritě a promyta vodou a následně 1% roztokem kyseliny chlorovodíkové (v/v). Krystaly byly dále rozpuštěny v 5% roztoku hydrogenuhličitanu sodného. Směs byla zcentrifugována a zelený roztok dekantován od bílé sraženiny. Roztok byl okyselen koncentrovanou kyselinou chlorovodíkovou a nechal se ustát přibližně 2 hodiny. Poté byla získaná suspenze zcentrifugována, čirá tekutina nad sraženinou odsáta a sraženina na dně opět rozsuspendována vodou o kyselém pH (jedna kapka koncentrované HCl). Toto promytí kyselou vodou bylo zopakováno ještě jednou. Roztok nad sraženinou byl odsát, zkumavka byla doplněna čistým THF a sraženina byla opět rozsuspendována a zcentrifugována. Postup se opakoval, dokud THF nebylo čiré. Poté byla sraženina třikrát promyta acetonem. Zbylá sraženina (32 mg) byla rozpuštěna v hydrogenuhličitanu sodném (24 mg, 0,29 mmol v 0,5 ml vody) a dočištěna pomocí gelové chromatografie na Sephadexu G25 (Sigma-Aldrich). Podmínky pro gelovou chromatografii: objem Sephadexu G25 v koloně: 21 ml; mrtvý objem před produktem: 7 ml; rychlost eluce 0,3 ml/min; velikost frakce 0,5 ml. Jednotlivé frakce byly po naředění 200 nebo 500× proměřeny na UV/VIS

spektrofotometru (rozsah 200-800 nm), přičemž čistota frakcí byla hodnocena zejména tvarem spektra v oblasti 250-400 nm. Čisté frakce byly odpařeny.

Výtěžek: 15 mg (2 % teoretického výtěžku) zelené pevné látky.

^1H NMR (D_2O , 500 MHz) δ (ppm) 8,53-8,50 (16H, m, ArH), 8,50-8,48 (8H, m, ArH).

^{13}C NMR (D_2O , 125 MHz) δ (ppm) 130,7; 134; 137,7; 138,9; 149,1; 151,7; 156; 174,8.

IČ (ATR): $\nu = 3396, 1612, 1559, 1420, 1362, 1256, 1194, 1121, 1091, 1011 \text{ cm}^{-1}$. UV/VIS (voda): λ_{max} (1 μM) (ϵ) = 647 (159 800), 587 (20 900), 370 nm (92 600 $\text{mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ cm}^{-1}$). MS (MALDI-TOF): m/z: 1896,0 [M] $^-$, 2009,0 [$\text{M} + \text{CF}_3\text{COO}$] $^-$.

5.13. Příprava mikroemulze s látkou 9

Látka **9** (0,777 mg) byla rozpuštěna v chloroformu a byl přidán Cremophor[®] EL (BASF, 50 mg) a triglyceridy se střední délkou řetězce (Ecogreen oleochemicals, 20 mg) rozpuštěné v chloroformu. Následně se vše odpařilo do sucha na vakuové odparce a přidalo se buněčné médium (Dulbecco's modified Eagle's medium without Phenol Red (Lonza, Belgium)) (3 ml). Směs byla následně roztřepána na homogenní mikroemulzi, přenesena kvantitativně do odměrné baňky (5 ml) a doplněna médiem po rysku. Takto bylo připraveno 5 ml mikroemulze látky **9** o koncentraci 0,055 mM.

5.14. Příprava roztoků s látkou 12

Látka **12** ve formě soli byla rozpuštěna v buněčném mediu (Dulbecco's modified Eagle's medium without Phenol Red (Lonza, Belgie)) na základní koncentraci zásobního roztoku 0,500 mM, který byl dále ředěn dle potřeby pro jednotlivé biologické testy.

5.15. Biologické testování

Testování biologické aktivity bylo prováděno na Katedře biochemických věd Mgr. Miloslavem Macháčkem. Testování probíhalo na HeLa buňkách (karcinom děložního čípku). Buňky byly 12 hodin inkubovány s danou látkou a následně 15 minut ozařovány červeným světlem (400 W Xe-lampa, $\lambda > 570 \text{ nm}$). Po 24 hodinách od začátku pokusu byla určena viabilita buněk testem s neutrální červení.

5.16. Měření závislosti fotofyzikálních vlastností na změně pH

Toto stanovení bylo prováděno pro látku **12**, kdy byly pozorovány změny fotofyzikálních vlastností (fluorescence a absorpce) v závislosti na změně pH.

Citráto-fosfátový pufr o různých hodnotách pH byl vytvořen ze zásobního roztoku 0,2 M roztoku hydrogenfosforečnanu sodného a 0,1 M roztoku kyseliny citronové. Měření pH bylo prováděno na pH metru HANNA pH 209, který byl před měřením kalibrován na pH= 7,00 a 4,00.

Následně byl vytvořen zásobní roztok látky **12** o koncentraci 100 μM , který byl přidán k roztoku pufru o daném pH za vzniku 1 μM roztoku a byla měřena absorpční spektra a fluorescence po excitaci při vlnové délce $\lambda_{\text{ex}} = 594 \text{ nm}$.

6. VÝSLEDKY A DISKUZE

Azaftalocyaniny (AzaPc) jsou planární makrocycly, které absorbují světlo o vlnové délce 600-800 nm a díky svým fotofyzikálním vlastnostem našly uplatnění při různých aplikacích jako např. PDT, ⁽³⁰⁾ senzory ⁽³¹⁾ nebo zhášeče fluorescence. ⁽³²⁾

Nevýhodou těchto látek je, že se jedná o látky planární, které snadno podléhají agregaci, při které dochází ke ztrátě výhodných fotofyzikálních vlastností, což znemožňuje jejich použití ve výše zmíněných aplikacích. Převážně se jedná o látky hydrofobního charakteru, které jsou často rozpustné pouze v organických rozpouštědlech (THF, chloroform, pyridin atd.). Přestože jsou tyto látky většinou dobře rozpustné v organických rozpouštědlech, může i v nich docházet k tvorbě agregátů, které znemožňují jejich použití. Předpokladem pro použití těchto látek v PDT je, aby byly rozpustné ve vodě, jejich spektra byla monomerní a nedocházelo k tvorbě agregátů.

Cílem této práce bylo připravit AzaPc, které budou na periférii obsahovat karboxylové skupiny, které jsou předpokladem pro dobrou rozpustnost ve vodě a po převedení na sůl by na základě elektrostatických odpudivých sil mezi karboxylátovými ionty mělo dojít k zabránění agregace.

6.1. Příprava azaftalocyaninů

Jako výchozí látku jsem použil kyselinu trimesinovou (benzen-1,3,5-trikarboxylovou) a to z důvodu přítomnosti karboxylových skupin v polohách 3 a 5 na benzenovém jádře periferního substituentu ve finálním AzaPc.

Kyselinu trimesinovou jsem nejprve esterifikoval ethanolem za katalýzy kyselinou sírovou za vzniku triethylesteru kyseliny trimesinové **1**. Parciální hydrolýzou hydroxidem draselným jsem připravil produkt **2** s jednou volnou karboxylovou skupinou, kterou jsem selektivně redukoval boranem na hydroxy skupinu. Poté jsem produkt **3** reakcí s pyridinium-chlorchromanem oxidoval na substituovaný aldehyd **4** (Schéma 1). Tyto reakce byly již dříve popsány v odborné literatuře a výtěžky reakcí byly srovnatelné s nimi. ^{(26), (27), (28)}

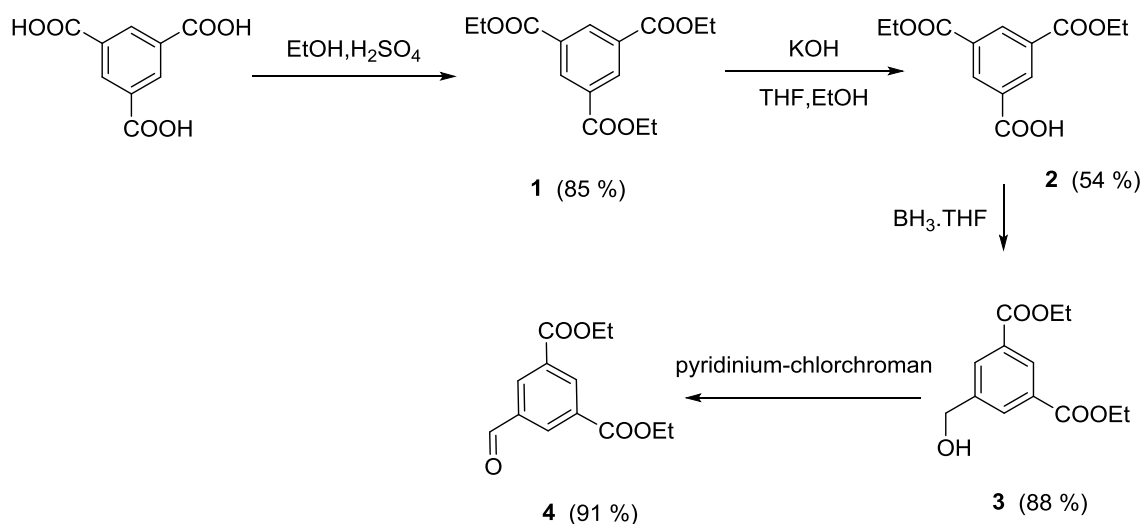


Schéma 1 Příprava látky **4**

Vhodně substituované diketony jsou obecně vhodnými prekurzory pro přípravu substituovaných pyrazin-2,3-dikarbonitrilů, z nichž se následně vytváří azaftalocyaninové jádro. Pro přípravu diketonu **5** jsem se rozhodl zvolit benzoinovou kondenzaci z aldehydu **4** s následnou oxidací (Schéma 2). První možností, kterou jsem vyzkoušel, byla benzoinová kondenzace katalyzovaná kyanidem draselným v ethanolu. Průběh reakce jsem sledoval na TLC, kdy velikost skvrny pro acyloin se postupem času nezvětšovala a v reakci stále zůstávalo velké množství výchozí látky. Proto jsem se rozhodl podmínky této reakce optimalizovat použitím různých kyanidů a různých rozpouštědel (bezvodých nebo s obsahem vody) (viz Tabulka 1). Jako alternativní možnost jsem použil jako katalyzátor thiazoliovou sůl (5-(2-hydroxyethyl)-3,4-dimethylthiazol-3-ium jodid) v bezvodém ethanolu za přítomnosti katalytického množství DBU. Podle intenzity skvrn na TLC jsem určil, které podmínky jsou pro tuto reakci nejvhodnější a ty jsem poté použil k izolaci výsledného produktu. Nejlépe reakce probíhala při použití thiazoliové soli v ethanolu a poté s použitím kyanidu draselného v bezvodém DMSO jako katalyzátoru. Největších výtěžků jsem docílil při reakci katalyzované thiazoliovou solí (42%). Z reakce se mi podařilo získat zpět také větší množství aldehydu, který byl znovu použit do další reakce.

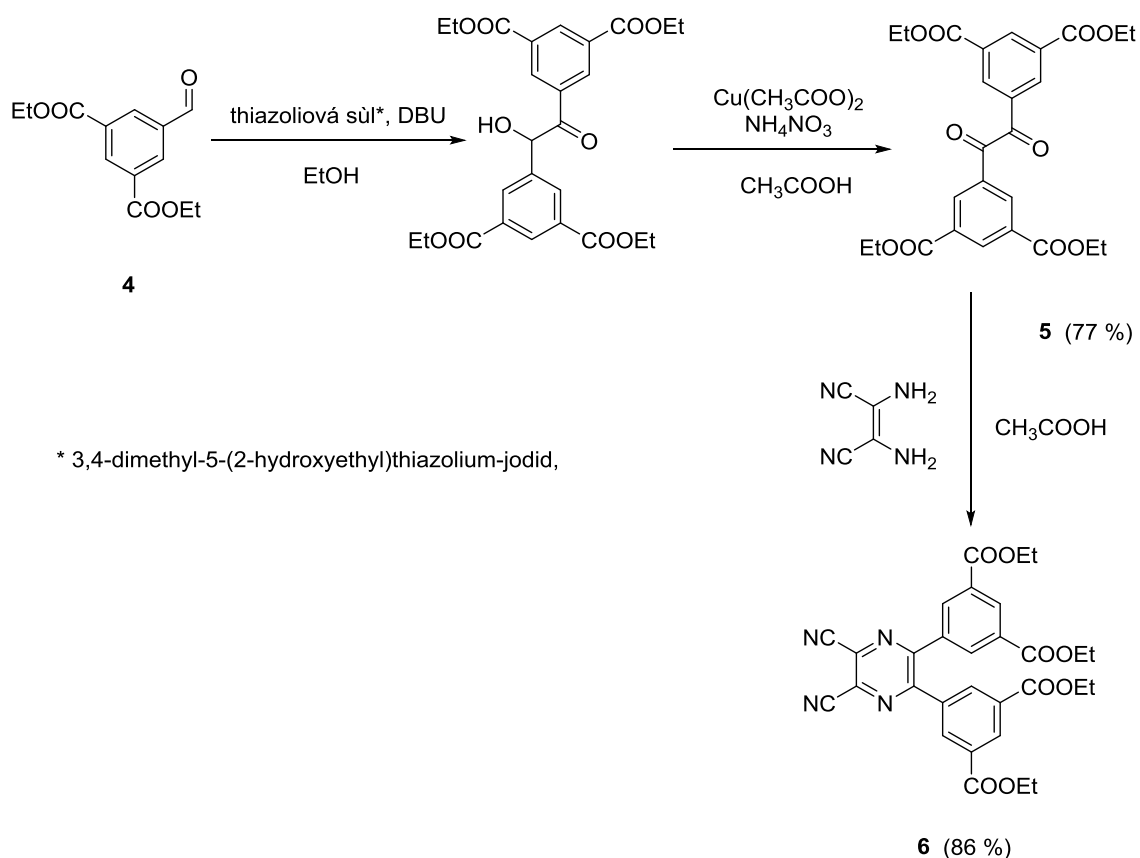


Schéma 2 Příprava prekurzoru 6

Jistou komplikací benzoinové kondenzace byla nestabilita výsledného acyloinu. Acyloin jsem ve finále neizoloval, protože při snaze vyčistit směs sloupcovou chromatografií docházelo k postupné oxidaci na diketon. Proto jsem se rozhodl acyloin převést oxidací s dusičnanem amonným a octanem měďnatým rovnou na diketon **5** a ten následně izolovat sloupcovou chromatografií.

Tabulka 1 Testované reakční podmínky pro benzoinovou kondenzaci aldehydu **4**

katalyzátor	rozpuštědlo	teplota	výtěžek diketonu
KCN	EtOH, voda	78 °C	Neizolováno
NaCN	DMSO, voda	135 °C	Neizolováno
NaCN	pyridin, voda	115 °C	Neizolováno
KCN	DMSO, voda	135 °C	Neizolováno
KCN	pyridin, voda	115 °C	Neizolováno
KCN	DMSO (bezvodý)	135 °C	18 %
KCN	DMF, voda	135 °C	Neizolováno
KCN	DMF (bezvodý)	135 °C	Neizolováno
KCN	butanol, voda	117 °C	Neizolováno
thiazoliová sůl*, DIPEA	EtOH (bezvodý)	78 °C	Neizolováno
thiazoliová sůl* , DBU	EtOH (bezvodý)	78 °C	77 %

* thiazoliová sůl = (5-(2-hydroxyethyl)-3,4-dimethylthiazol-3-ium jodid)

DIPEA = *N,N*-diisopropylethylamin

Prekurzor pro přípravu AzaPc, substituovaný pyrazin-2,3-dikarbonitril **6**, jsem získal kondenzací diaminomaleonitrilu s diketonem **5** v kyselině octové (Schéma 2) v uspokojivém výtěžku 86 %.

Při přípravě hořčnatého AzaPc **7** jsem vycházel z prekurzoru **6** a za pomoci cyklotetramerizační reakce v prostředí butanolátu hořčnatého jako iniciátoru jsem získal tento AzaPc ve výtěžku 59 % (Schéma 3). Během této reakce došlo k transesterifikaci ethylesteru na butyl ester. Transesterifikace proběhla prakticky

kvantitativně, jak bylo potvrzeno pomocí NMR a MS spekter. Hořečnatý iont není v centru AzaPc chelatován příliš silně a lze jej snadno odstranit pomocí silnějších kyselin. Bezkovový derivát **8** jsem proto připravil reakcí kyseliny *p*-toluensulfonové s hořečnatým komplexem. Do centra bezkovového AzaPc jsem zavedl zinečnatý kation reakcí s octanem zinečnatým za vzniku látky **9**. Příprava zinečnatého komplexu je výhodná z důvodu vyšší stability komplexu v kyselém prostředí a vyšší schopnosti tvořit singletový kyslík.

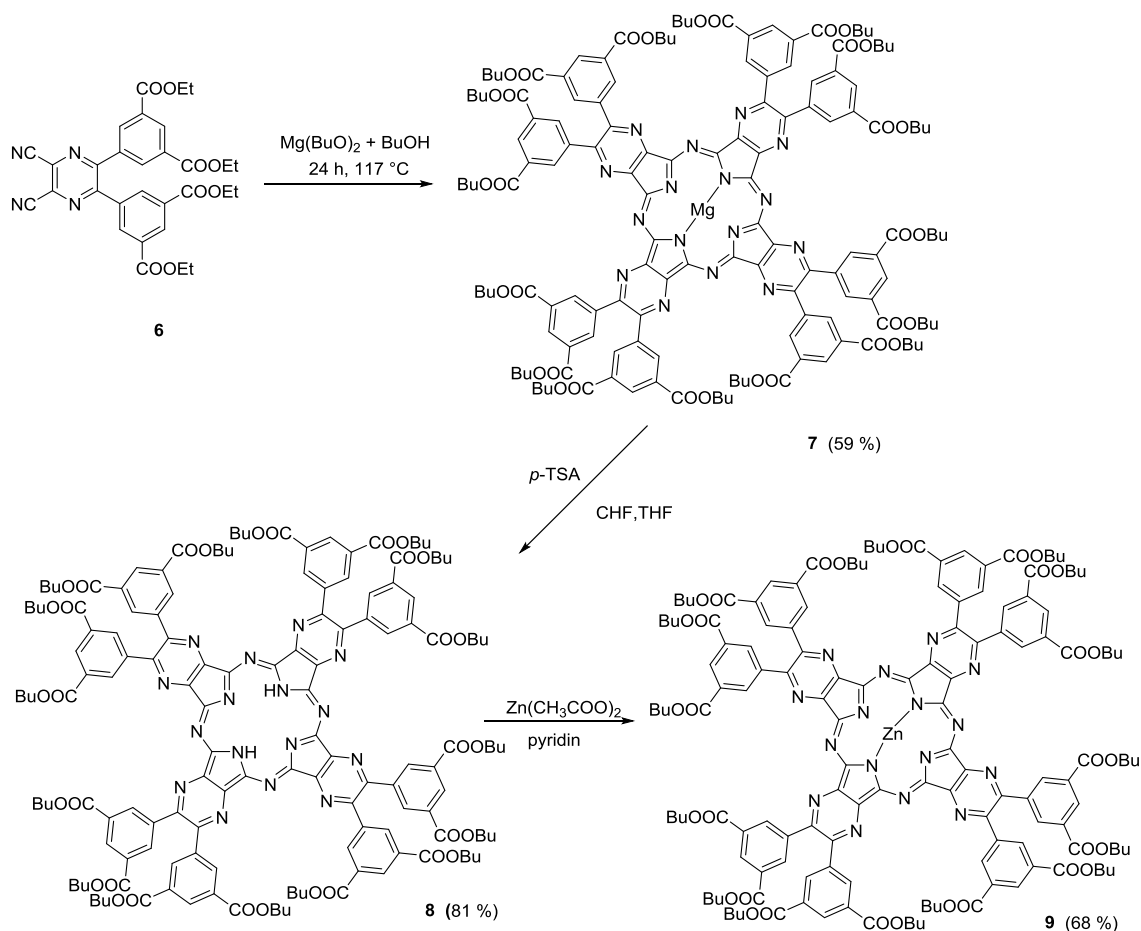


Schéma 3 Cyklotetramerizační reakce a příprava AzaPc (**7**, **8**, **9**)

Dalším krokem k přípravě AzaPc s volnými karboxylovými skupinami na periférii měla být hydrolýza esterových vazeb makrocyklu. První možnost, kterou jsem použil, byla bazická hydrolýza hydroxidem sodným, při níž ale docházelo k rozpadu makrocyklu, který jsem detekoval pomocí UV/VIS spektrometrie absencí Q pásu charakteristického pro AzaPc. Při kyselé hydrolýze kyselinou sírovou pak docházelo k neúplné hydrolýze esterových vazeb a získaný produkt se nerozpouštěl ve vodě ani po

převedení na sůl. Z tohoto důvodu se zdálo být nutné přistoupit k cyklotetramerizaci prekurzoru s volnými karboxylovými skupinami. Nejprve jsem zkoušel provést bazickou hydrolyzu na prekurzoru **6**. Tato reakce se ovšem ukázala jako nepříliš vhodná z důvodu hydrolyzy jak esterových vazeb, tak zřejmě i nitrilových skupin a při TLC chromatografii se objevilo velké množství skvrn.

Proto jsem se rozhodl hydrolyzovat diketon **5** kyselou hydrolyzou za vzniku diketonu s volnými karboxylovými kyselinami **10**. Tento diketon poté reagoval s diaminomaleonitrilem za vzniku disubstituovaného pyrazin-2,3-dikarbonitrilu **11** s volnými karboxylovými skupinami (Schéma 4).

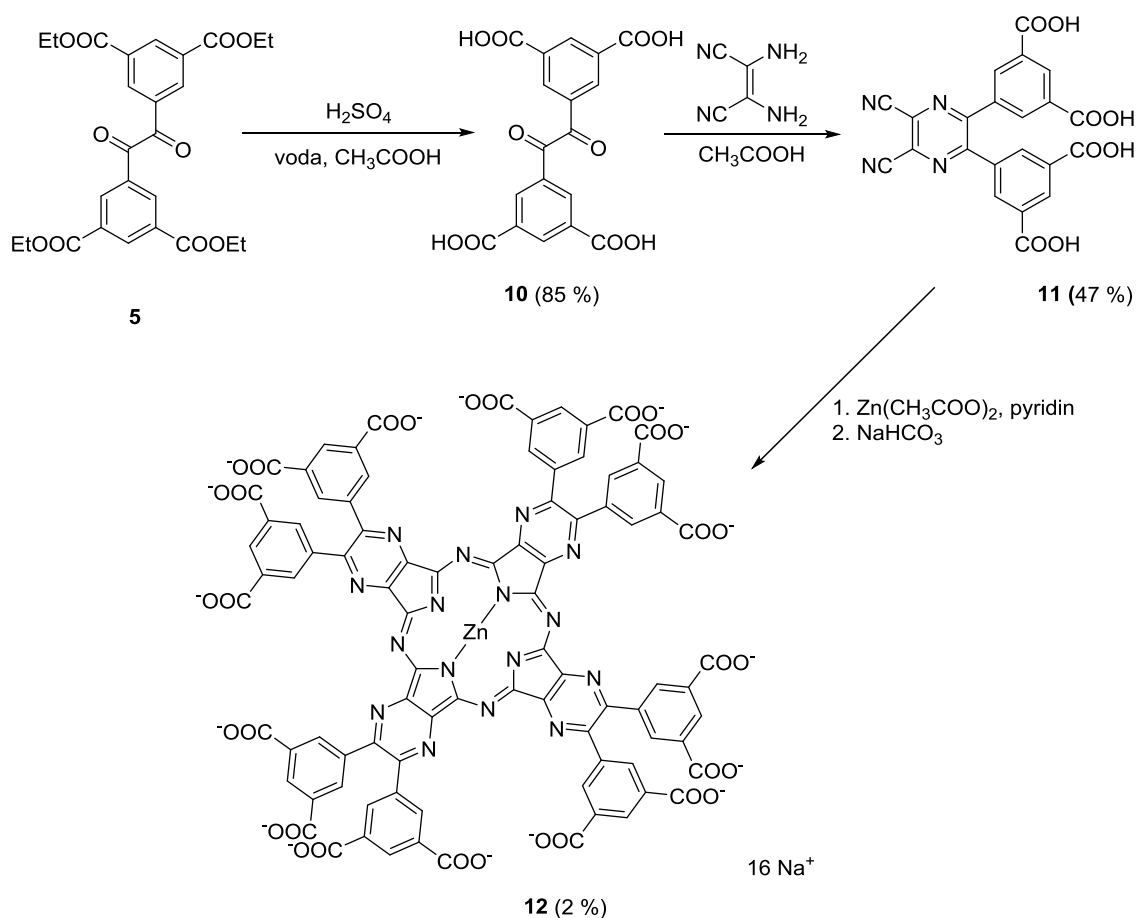


Schéma 4 Příprava AzaPc s volnou karboxylovou skupinou (látka 12)

Pro přípravu AzaPc **12** jsem opět použil cyklotetramerizační reakci. Jako iniciátor jsem použil alkoholát hořečnatý, ovšem reakce neprobíhala. Vyzkoušel jsem proto i silnější iniciátory, jako alkoholát lithný, nebo alkoholát indukovaný silnou organickou bází (DBU) (viz Tabulka 2) ovšem ani v jednom případě nedošlo k zabarvení roztoku do zelené až zelenomodré, což by naznačovalo, že reakce probíhá.

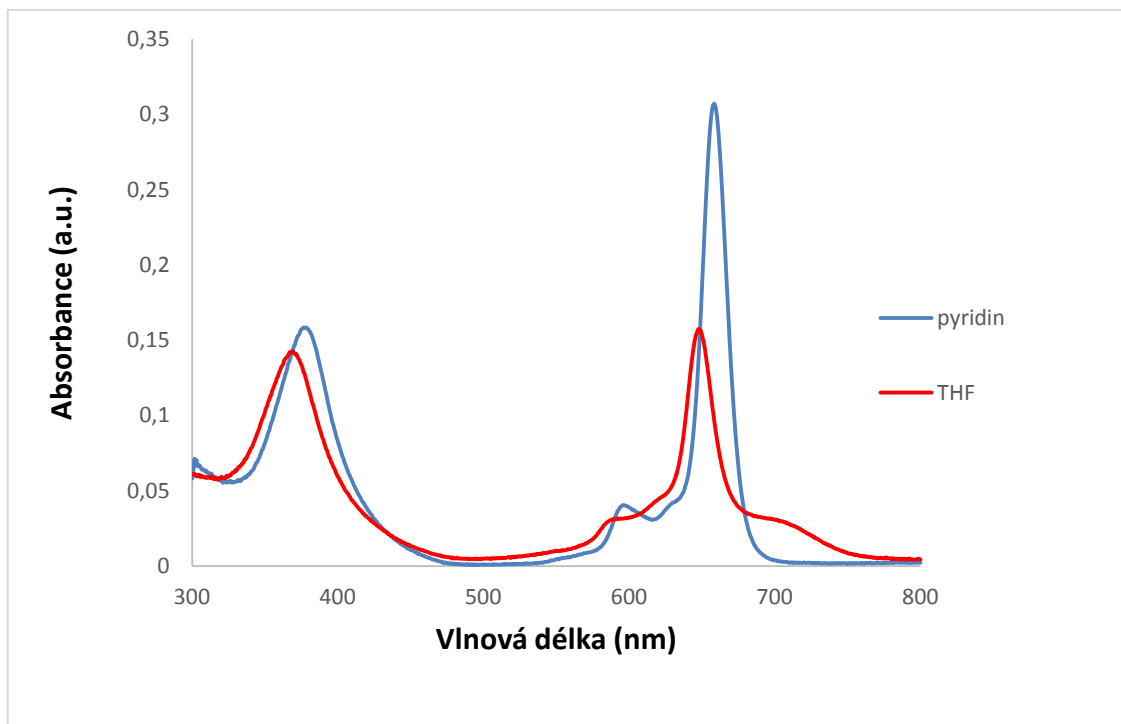
Tabulka 2 Reakční podmínky cyklotetramerizační reakce přípravy produktu **12**

iniciátor	Rozpouštědlo	teplota lázně (° C)	čas (hodiny)	
Mg	BuOH	140	5	nereaguje
Li	BuOH	140	1	nereaguje
DBU	BuOH	140	1	nereaguje
octan zinečnatý	DMF	160	7	nereaguje
octan zinečnatý	Pyridin	140	17	reaguje

Další alternativou je použít reakci se solí příslušného kovu ve výše vroucím rozpouštědle (tzv. templátová reakce), ale použití DMF nevedlo k požadovanému výsledku. Jedinou reakcí, která nakonec probíhala, byla reakce s octanem zinečnatým v bezvodém pyridinu za vzniku zelené suspenze. Získaný produkt se ihned po reakci nepodařilo rozpustit ve vodě ani v žádném organickém rozpouštědle vzhledem k tomu, že zřejmě došlo ke vzniku nerozpustné zinečnaté soli příslušného AzaPc. Proto jsem se rozhodl uvolnit karboxylové funkce pomocí kyseliny chlorovodíkové a převést je následně na sodnou sůl. Sodnou sůl AzaPc **12**, která byla již velmi dobře rozpustná ve vodě, jsem čistil pomocí gelové chromatografie na Sephadexu G-25. Produkt nebylo možné čistit na silikagelu ani oxidu hlinitém kvůli velice silné retenci (ať již ve formě volné kyseliny nebo sodné soli).

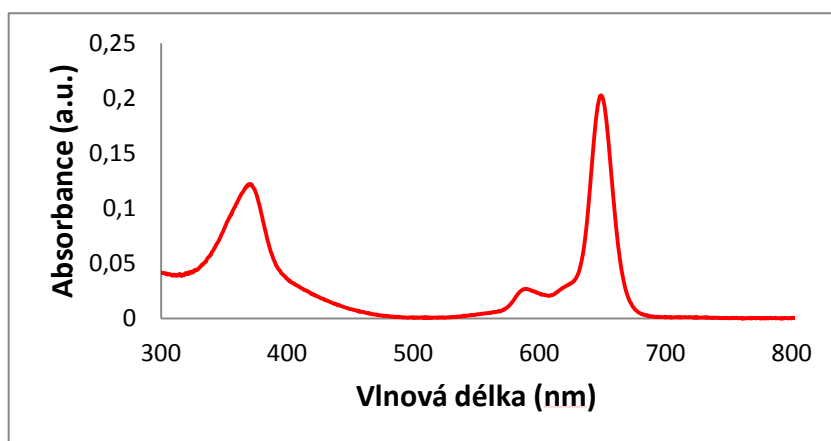
6.2. UV/VIS spektra

AzaPc **7**, **8** a **9**, které jsou ve formě esteru, jsou dobře rozpustné v organických rozpouštědlech (THF, pyridin, chloroform). Při měření jejich UV/VIS spekter v pyridinu jsem zjistil, že nedochází k žádné agregaci. V THF bylo zjištěno, že spektrum díky své nesouměrnosti vykazuje známky nějakého typu agregace, přestože se jedná o koordinační rozpouštědlo, u kterého by nemělo k agregaci AzaPc docházet (Obr. 26).

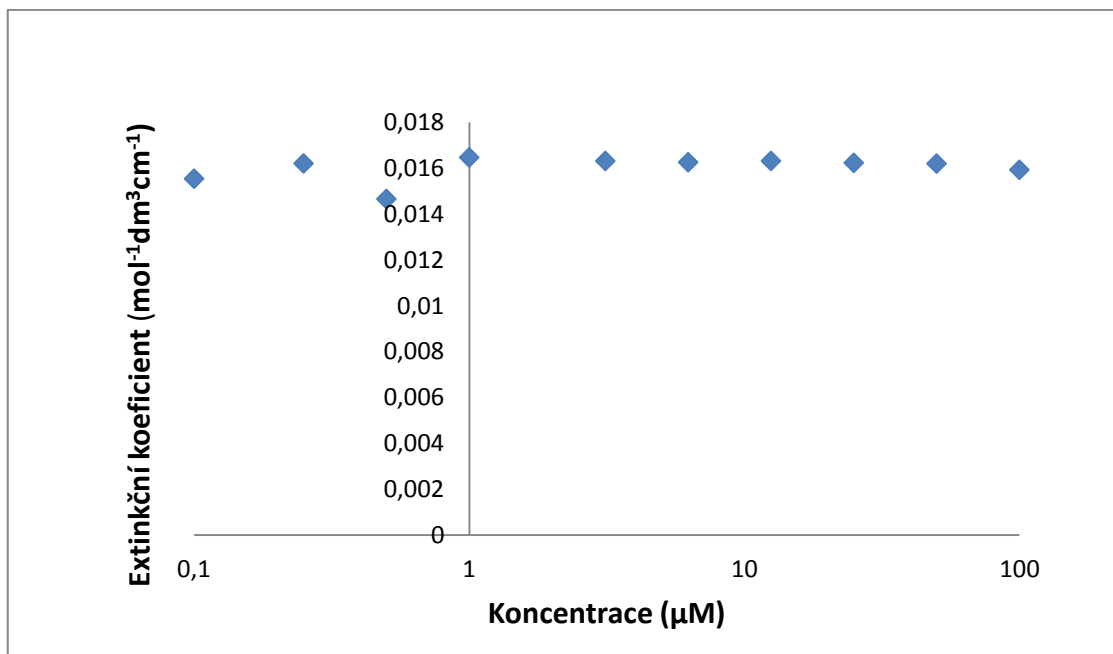


Obr. 26 Absorpční spektrum látky 9 (1 μM roztok v THF nebo pyridinu)

Produkt **12** ve formě hexadecasodné soli se dobře rozpouští ve vodě, ve které vykazuje monomerní spektrum. V jiných rozpouštědlech se tato látka nerozpouštěla vůbec. UV/VIS spektra byla měřena v řadě koncentrací (od 0,1 μM do 100 μM), kdy nedocházelo ani u nejvyšších koncentrací ke změně tvaru spektra nebo poklesu extinkčních koeficientů (Obr. 27, 28). To mi potvrdilo, že látka je monomerní ve vodě i ve vysokých koncentracích.



Obr. 27 Absorpční spektrum látky 12 o koncentraci 1 μM při pH 7,07.



Obr. 28 Závislost hodnoty extinkčního koeficientu na změně koncentrace látky 12

6.3. Fotofyzikální vlastnosti

U látek **7**, **8**, **9** a **12** byl měřen kvantový výtěžek fluorescence (Φ_F) a kvantový výtěžek singletového kyslíku (Φ_Δ). Produkce singletového kyslíku je důležitá pro vlastní cytotoxický účinek v PDT, protože právě singletový kyslík je tím nejdůležitějším aktivním agens v této terapii. Fluorescence se zase s výhodou využívá například při studiu subcelulárních lokalizací. Měření bylo prováděno kolegy z laboratoře, v pyridinu pro všechny esterové vzorky a dodatečně u produktu **8** i v THF. V pyridinu u bezkovových derivátů může docházet ke tvorbě vedlejších, částečně centrálně deprotonizovaných forem, které mohou ovlivňovat fotofyzikální chování. U AzaPc **12** byl změřen pouze kvantový výtěžek fluorescence ve vodě. U tohoto produktu jsem neměřil kvantový výtěžek singletového kyslíku, protože metoda, kterou používáme v laboratoři, je nevhodná pro měření vzorku ve vodném prostředí. Změřené hodnoty jsou uvedeny v Tabulce 3.

Tabulka 3 Výsledky měření fotofyzikálních vlastností látek 7, 8, 9, 12

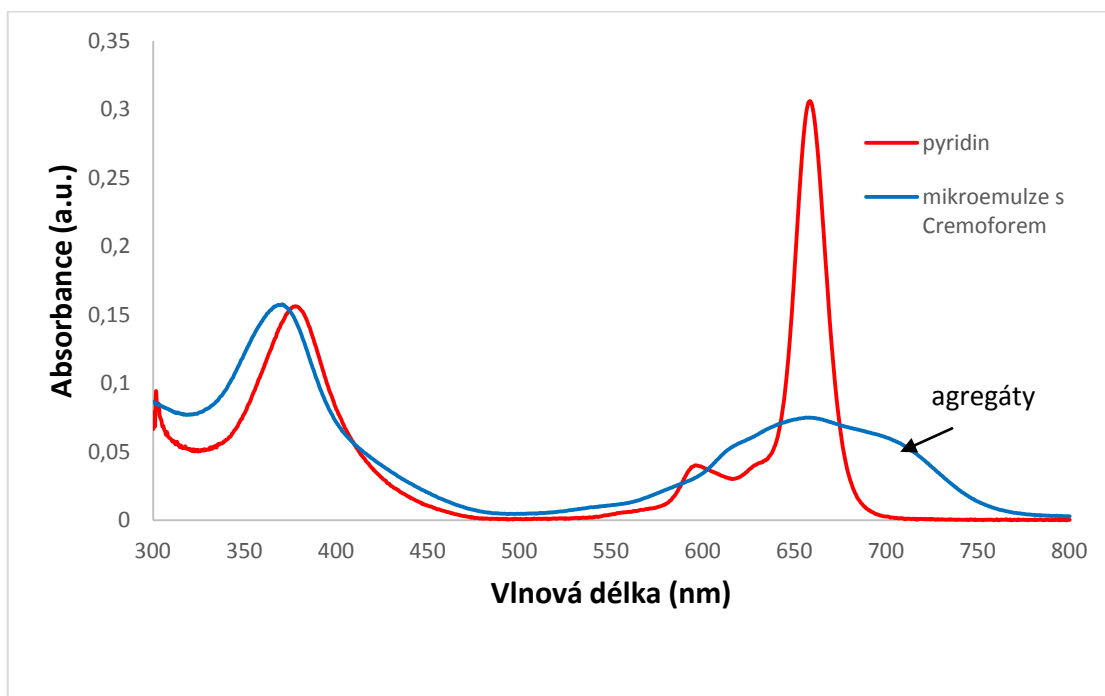
Sloučenina	Centrální atom	Rozpouštědlo	λ_{\max} (ε)	Φ_A	Φ_F
7	Mg	pyridin	663 (287 900)	0,288	0,605
8	2H	pyridin	666 (200 400)	0,367	0,223
8	2H	THF	-	0,346	0,133
9	Zn	pyridin	659 (306 000)	0,578	0,316
12	Zn	voda	647 (159 800)	-	0,36

Z výsledků vyplynulo, že centrální kation může ovlivnit poměr kvantového výtěžku singletového kyslíku a kvantového výtěžku fluorescence. Zinečnaté komplexy mají obecně vyšší produkci singletového kyslíku, naopak hořečnaté komplexy mají vyšší kvantový výtěžek fluorescence. Toto se potvrdilo i v případě mnou připravených látek. Součet kvantového výtěžku fluorescence a singletového kyslíku u látek **7** a **9** se blíží k hodnotě 1. Naopak bezkovový derivát **8** má tento součet výrazně nižší, což ukazuje na ještě další deaktivací procesy v jeho molekule. Produkt **12** má vysoký kvantový výtěžek fluorescence a jeho spektrum je ve vodě monomerní. To je dobrým předpokladem pro biologickou aplikaci, protože se dá očekávat i silná produkce singletového kyslíku.

6.4. Biologické testy

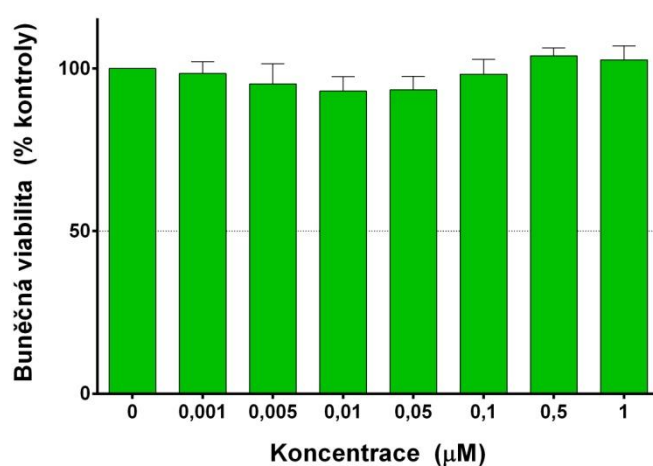
AzaPc **9** a **12** byly testovány na svou fotodynamickou aktivitu. Testování probíhalo na HeLa buňkách (karcinom děložního čípku). AzaPc **9** ve formě esteru není ve vodě rozpustný, proto ho bylo potřeba před vlastním testováním převést do aplikační formy (mikroemulze). Testování v mikroemulzi nás pak limitovalo jak její schopností pojmout produkt, tak i vlastní toxicitou tohoto aplikačního systému (toxický od

přibližně 0,2 mg/ml). Při změření UV/VIS spektra u této látky v mikroemulzi bylo navíc vidět, že spektrum je silně agregované viz Obr. 29.



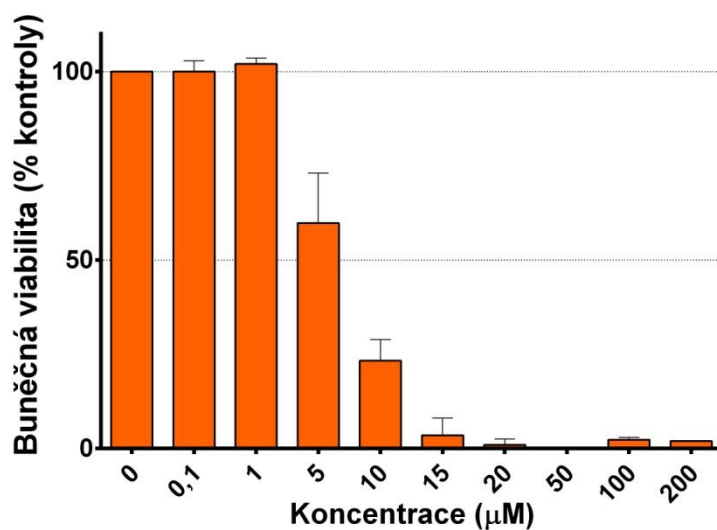
Obr. 29 Porovnání absorpčních spekter látky 9, rozpuštěné v pyridinu a ve formě mikroemulze s Cremoforem

Ve vodě rozpustný a neagregující AzaPc 12 (Obr. 27) byl rovnou aplikován na buňky ve formě roztoku zředěného na potřebnou koncentraci buněčným médiem.

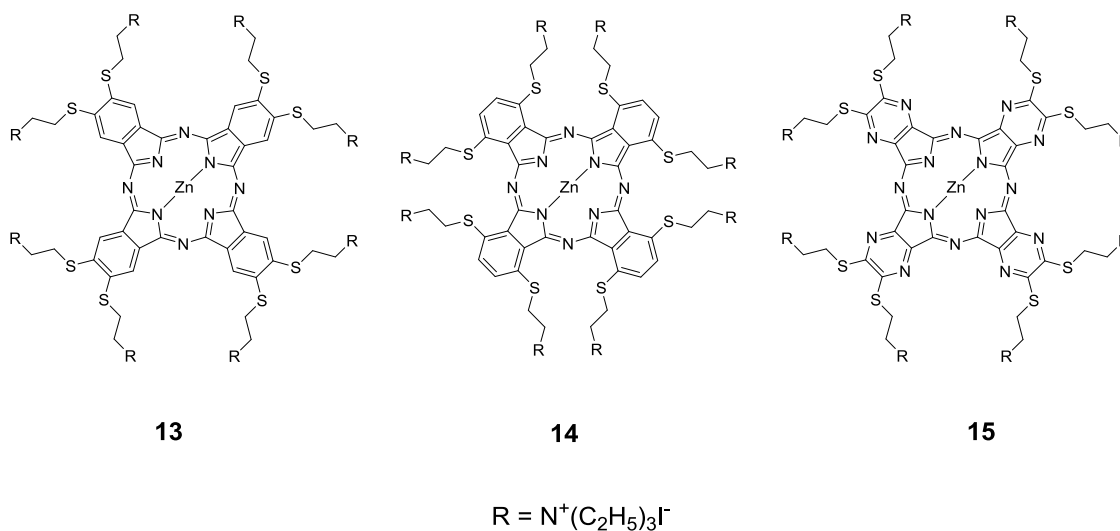


Obr. 30 Výsledky biologického testování látky 9 v mikroemulzi s Cremoforem. Na ose x je vynesena koncentrace látky 9.

Z výsledků těchto pokusů vyplynulo, že AzaPc **9** nebyl toxický až do maximální možné testovatelné koncentrace 1 μM (Obr. 30). Látka **12** má poměrně významný fotodynamický účinek (Obr. 31), hodnota $\text{IC}_{50} = 5,121 \mu\text{M}$, i při zachování relativně nízké vlastní toxicity ve tmě (tzn. bez aktivace světlem) – hodnota $\text{TC}_{50} = 163 \mu\text{M}$. V porovnání s dříve připravenými kationickými AzaPc (Obr. 32) je to účinek ovšem asi poloviční, při porovnání s kationickými Pc dokonce až řádově nižší (Tabulka 4).⁽³³⁾



Obr. 31 Výsledky fotodynamické aktivity látky **12**



Obr. 32 Struktury látek **13**, **14**, **15**

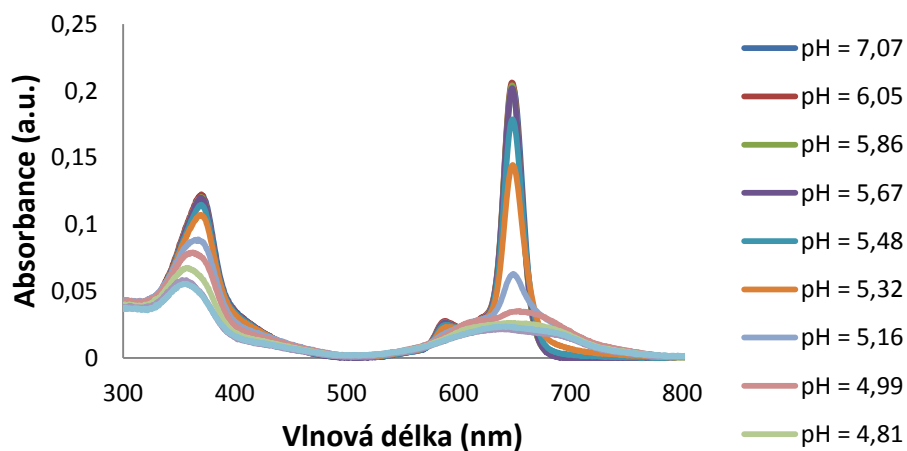
Tabulka 4 Porovnání fotodynamických účinků látek 12-15. IC₅₀ (μM) = fotodynamická účinnost, TC₅₀ (μM) = toxicita bez ozáření

sloučenina	typ jádra	typ periferní substituce	IC ₅₀ (μM)	TC ₅₀ (μM)
12	AzaPc	anionická	5,121	163
13	Pc	kationická	0,54 ± 0,090	1639 ± 110
14	Pc	kationická	0,31 ± 0,121	192 ± 14
15	AzaPc	kationická	3,70 ± 0,192	226 ± 19

Určitém vysvětlením nižší účinnosti látky **12** by mohlo být nízké pH v lysosomech. To povede k potlačení ionizace karboxylové funkce, což v důsledku způsobí agregaci na základě snížení elektrostatických odpuzivých sil karboxylátových skupin. To mě vedlo k tomu změřit, jak se mění fotofyzikální vlastnosti látky **12** v závislosti na změně pH.

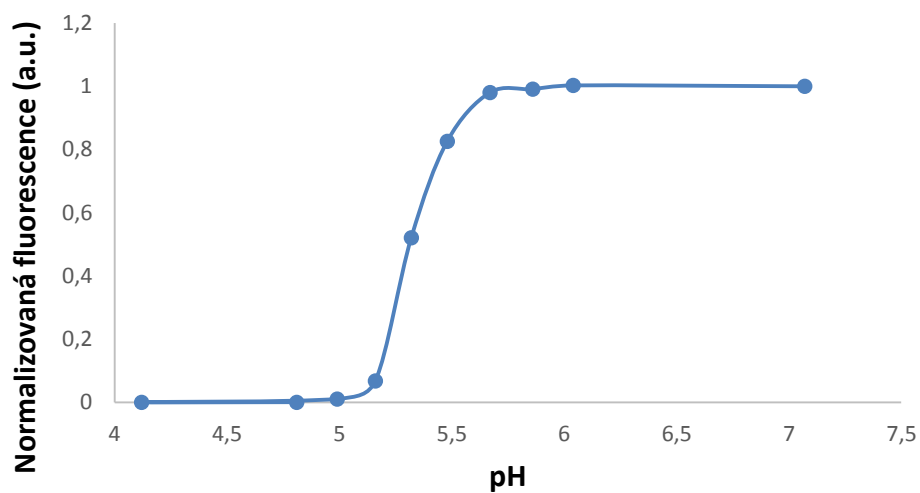
Měření se provádělo v pH rozmezí od 4 do 7 a měřil jsem absorpci a fluorescenci látky **12** (Obr. 33 a 34). Jak je vidět z Obr. 34, při pH 5,5 došlo k prudkému poklesu fluorescence a od pH 5 byla fluorescence prakticky nulová. Při měření absorpčních spekter docházelo při nižších pH k poklesu absorbance v Q pásu a k rozšíření tohoto pásu, které je typické pro tvorbu vyšších agregátů. Obě měření prokázala, že snižování pH má velmi negativní vliv na fotofyzikální vlastnosti. Při pH pod 5,5 dochází k velice silné agregaci, což prakticky eliminuje jakoukoliv fotodynamickou aktivitu (s poklesem fluorescence dochází současně i ke snížení produkce singletového kyslíku). Vzhledem k tomu, že v lysosomech je mírně kyselé pH v rozmezí 4,5-5,5, je silně pravděpodobné, že za nižší fotodynamickou aktivitou AzaPc **12** stojí právě částečná agregace indukovaná snížením pH prostředí.

Změna absorpce při změně pH



Obr. 33 Porovnání změn absorpce látky 12 o koncentraci 1 μM na změně pH

Závislost fluorescence na pH



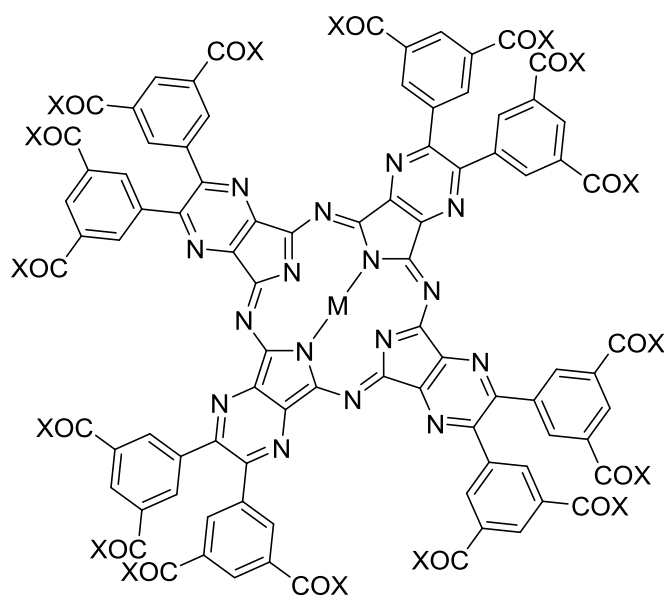
Obr. 34 Závislost změny normalizované fluorescence látky 12 o koncentraci 1 μM na změně pH. Látka byla excitovaná při λ_{ex} 594 nm.

7. ZÁVĚR

Během této práce byly připraveny dvě skupiny AzaPc odvozené od kyseliny trimesinové s rozdílnými vlastnostmi (Obr. 35).

První skupinou jsou látky **7**, **8**, **9** nesoucí na periferii esterovou vazbu. Tyto látky jsou dobře rozpustné v organických rozpouštědlech. Druhou skupinu tvoří látka **12**, ve formě hexadecasodné soli, která je rozpustná ve vodě.

Látky typu esterů jsou fotodynamicky neaktivní na HeLa buňkách *in vitro* ve zkušenských koncentracích. Na druhou stranu látka **12** vykázala fotodynamickou aktivitu, která byla ovšem nižší než u strukturně podobných kationických derivátů. Sledování fotofyzikálních parametrů v závislosti na pH naznačilo, že by důvodem nižší aktivity mohla být agregace v prostředí o nižším pH, které se nachází v lysosomech.



7	M= Mg	R= OBU
8	M= 2H	R= OBU
9	M= Zn	R= OBU
12	M= Zn	R= O ⁻ Na ⁺

Obr. 35 Struktury připravených AzaPc (látky **7**, **8**, **9**, **12**)

8. CITOVANÁ LITERATURA

1. AGOSTINIS, P.; BERG, K.; CENGEL, K. A.; FOSTER, T. H.; GIROTTI, A. W.; GOLLNICK, S. O.; HAHN, S. M.; HAMBLIN, M. R.; JUZENIENE, A.; KESSEL, D.; KORBELIK, M.; MOAN, J.; MROZ, P.; NOWIS, D.; PIETTE, J.; WILSON, B. C.; GOLAB, J. Photodynamic therapy of cancer: An update. *Ca-Cancer J. Clin.* **2011**, 61 (4), 250-281.
2. BENOVO, L. Photodynamic therapy: Current status and future directions. *Med Princ Pract.* **2015**, 24 (1), 14-28.
3. JOSEFSEN, L. B.; BOYLE, R. W. Photodynamic therapy and the development of metal-based photosensitisers. *Met.-Based Drugs.* **2008**, 2008, 1-24.
4. ZIMCIK, P.; MILETIN, M. Photodynamic therapy. ARNOLD R. LANG (ed.). *Dyes and Pigments: New Research.* New York : Nova Science Publishers, Inc., **2009**.
5. SHARMAN, W. M.; ALLEN, C. M.; VAN LIER, J. E. Photodynamic therapeutics: Basic principles and clinical applications. *Drug Discovery Today.* **1999**, 4 (11), 507-517.
6. ALLEN, C. M.; SHARMAN, W. M.; VAN LIER, J. E. Current status of phthalocyanines in the photodynamic therapy of cancer. *J. Porphyrins Phthalocyanines.* **2001**, 5 (2), 161–169.
7. ALLISON, R. R.; DOWNIE, G. H.; CUENCA, R.; HU, X.; CHLDS, C. JH; SIBATA, C. H. Photosensitizers in clinical PDT. *Photodiagn. Photodyn. Ther.* **2004**, 1 (1), 27-42.
8. CASTANO, A. P.; DEMIDOVA, T. N.; HAMBLIN, M. R. Mechanisms in photodynamic therapy: Part one-photosensitizers, photochemistry and cellular localization. *Photodiagn. Photodyn. Ther.* **2004**, 1 (4), 279—293.
9. ORMOND, A. B.; FREEMAN, H. S. Dye sensitizers for photodynamic therapy. *Materials.* **2013**, 6 (3), 817-840.
10. NOVAKOVA, V.; MØRKVED, E. H.; MILETIN, M.; ZIMCIK, P. Influence of protonation of peripheral substituents on photophysical and photochemical properties of tetrapyrazinoporphyrazines. *J. Porphyrins Phthalocyanines.* **2010**, 14 (7), 582–591.
11. HUANG, X.; YE, S. Enantioselective benzoin condensation catalyzed by bifunctional N-heterocyclic carbenes. *Chin. Sci. Bull.* **2010**, 55 (17), 1753-1757.

12. ENDERS, D.; NIEMEIER, O.; HENSELER, A. Organocatalysis by N-Heterocyclic Carbenes. *Chem. Rev.* **2007**, 107 (12), 5606–5655.
13. CERVINKA, O. *Mechanismy organických reakcí*. 2. vydání. Praha : SNTL, **1981**. 357-358.
14. WHITE, D. A.; BAIZER, M. M. Tetra-alkylammonium cyanides as nucleophilic and basic reagents. *J. Chem. Soc., Perkin Trans.* **1973**, (1), 2230-2236.
15. KIASAT, A. R.; BADRI, R.; SAYYAH, S. Polymer supported cyanide as an efficient catalyst in benzoin condensation: An efficient route to α -hydroxy carbonyl compounds. *Bull. Korean Chem. Soc.* **2009**, 30, (5), 1164-1166.
16. MARION, N.; DIEZ-GONZALEZ, S.; NOLAN, S. P. N-heterocyclic carbenes as organocatalysts. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2007**, 46 (17), 2988 – 3000.
17. SAFARI, J.; ZARNEGAR, Z.; AHMADI, M.; SEYYEDI, S. An investigation of the catalytic potential of potassium cyanide and imidazolium salts for ultrasound-assisted synthesis of benzoin derivatives. *J. Saudi Chem. Soc.* **2012**, in press, doi: 10.1016/j.jscs.2012.05.005.
18. STETTER, H.; KUHLMANN, H. Eine einfache herstellung von α -alkylacrylsäureestern. *Synthesis*. **1979**, 1979 (1), 29-30.
19. ENDERS, D.; KALLFASS, U. An efficient nucleophilic carbene catalyst for the asymmetric benzoin condensation. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, 41 (10), 1743–1745.
20. PELLISSIER, H. Asymmetric organocatalysis. *Tetrahedron*. **2007**, 63 (38), 9267–9331.
21. SAYYAH, S. Preparation and application of 1, 1'-bis-methyl-3, 3'-methylene-bisimidazolium dicyanide as a task-specific ionic liquid: An efficient catalyst in benzoin condensations. *Chem. Sci. Trans.* **2012**, 1 (1), 9-12.
22. MAVIS, M. E.; YOLACAN, C.; AYDOGA, F. An investigation of the catalytic potential of mono- and dicationic imidazolium N-heterocyclic carbenes in the benzoin condensation. *Tetrahedron Lett.* **2010**, 51 (34), 4509–4511.
23. AUPOIX, A.; PEGOT, B.; VO-THANH, G. Synthesis of imidazolium and pyridinium-based ionic liquids and application of 1-alkyl-3-methylimidazolium salts as pre-catalysts for the benzoin condensation using solvent-free and microwave activation. *Tetrahedron*. **2010**, 66 (6), 1352–1356.

24. HAHNVAJANAWONG, V.; WAENGDONGBUNG, W.; PIEKKAEW, S.; PHUNGPIS, B.; THERAMONGKOL, P. Benzoin condensation of aromatic aldehydes catalysed by N,N-dimethylbenzimidazolium iodide and NaOH under green conditions. *ScienceAsia*. **2013**, 39 (1), 50-55.
25. SIMION, C.; SIMION, A. M. On the structure of asymmetric benzoin (an old controversy). *U.P.B. Sci. Bull. Series B*, **2007**, 69 (2), 1454-2331.
26. KATHIRESANA, M.; WALDERA, L.; YE, F.; REUTERB, H. Viologen-based benzylic dendrimers: Selective synthesis of 3,5-bis(hydroxymethyl)benzylbromide and conformational analysis of the corresponding viologen dendrimer subunit. *Tetrahedron Lett.* **2010**, 51 (16), 2188–2192.
27. LEON, J. W.; KAWA, M.; FRECHET, J. M. J. Isophthalate ester-terminated dendrimers: Versatile nanoscopic building blocks with readily modifiable surface functionalities. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118 (37), 8847–8859.
28. DY, J. T.; OGAWA, K.; SATAKE, A.; ISHIZUMI, A.; KOBUE, Y. Water-soluble self-assembled butadiyne-bridged bisporphyrin: A potential two-photon-absorbing photosensitizer for photodynamic therapy. *Chem. - Eur. J.* **2007**, 13 (12), 3491–3500.
29. ASHTON, P. R.; FYFE, M. C. T.; HICKINGBOTTOM, S. K.; MENZER, S.; STODDART, J. F.; WHITE, A. J. P.; WILLIAMS, D. J. Combining different hydrogen-bonding motifs to self-assemble interwoven superstructures. *Chem. Eur. J.* **1998**, 4 (4), 577–589.
30. 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**, 62 (5), 425–433.
31. NOVAKOVA, V.; LOCHMAN, L.; ZAJICOVA, I.; KOPECKY, K.; MILETIN, M.; LANG, K.; KIRAKCI, K.; ZIMCIK, P. Azaphthalocyanines: Red fluorescent probes for cations. *Chem. Eur. J.* **2013**, 19 (16), 5025 – 5028.
32. KOPECKY, K.; NOVAKOVA, V.; MILETIN, M.; KUCERA, R.; ZIMCIK, P. Synthesis of new azaphthalocyanine dark quencher and evaluation of its quenching efficiency with different fluorophores. *Tetrahedron*. **2011**, 67 (33), 5956–5963.

33. MACHACEK, M.; CIDLINA, A.; NOVAKOVA, V.; SVEC, J.; RUDOLF, E.; MILETIN, M.; KUCERA, R.; SIMUNEK, T.; ZIMCIK, P. Far-red-absorbing cationic phthalocyanine photosensitizers: Synthesis and evaluation of the photodynamic anticancer activity and the mode of cell death induction. *J. Med. Chem.* **2015**, 58 (4), 1736–1749.