

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



DIPLOMOVÁ PRÁCE

Syntéza potenciálně fotodynamicky aktivních derivátů
tetrapyridoporfyrinů



„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 jsou řádně citovány. Práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové 2. 5. 2016

Podpis:

Poděkování

Mé poděkování v úvodu práce patří především mému školiteli Doc. PharmDr. Petru Zimčíkovi, Ph.D., který mi po celou dobu poskytoval cenné odborné rady a který mě vedl při práci v laboratoři. Dále chci poděkovat za pomoc také Doc. PharmDr. Veronice Novákové, Ph.D. a všem členům AzaPc group děkuji za velmi příjemné pracovní prostředí a přátelskou atmosféru.

Za změření dat děkuji Mgr. Miloslavu Macháčkovi (biologické testy), Doc. PharmDr. Jiřímu Kunešovi, CSc. (NMR spektra), Ivě Vencovské (IČ spektra), Věnceslavě Hronové (elementární analýzy) a PharmDr. Juraji Lenčovi, Ph.D. (MS spektra).

Za finanční podporu děkuji projektu SVV 260 291.

ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv

Kandidát **Magda Vavrečková**

Školitel **Doc. PharmDr. Petr Zimčík, Ph.D.**

Název diplomové práce Syntéza potenciálně fotodynamicky aktivních derivátů tetrapyridoporfyrasinů

Substituované tetrapyridoporfyrasiny představují nový strukturní typ potenciálních fotosenzitizérů se zajímavými vlastnosti pro oblast fotodynamické terapie. Cílem této práce bylo připravit dva typy tetrapyridoporfyrasinů s hydrofilními substituenty jako potenciální fotosenzitizéry. Fotosenzitizéry jsou látky, které mají schopnost produkovat po aktivaci světlem singletový kyslík, který je klíčovou toxickou složkou fotodynamické terapie.

V prvním kroku byl připraven kondenzací tetrakvanoethylenu a butan-2-onu 2-chlor-5,6-dimethylpyridin-3,4-dikarbonitril (**1**). Dále byl nukleofilní substitucí připojen hydrofilní substituent. První prekurzor byl připraven reakcí sloučeniny **1** s 2-merkptoethanolem v přítomnosti hydroxidu sodného. Podobně byl připraven i druhý prekurzor reakcí sloučeniny **1** s diethylaminoethanolem v přítomnosti hydridu sodného. Další krok zahrnoval cyklotetramerizaci, při které byl jako iniciátor reakce použit butanolát hořečnatý, díky kterému byly připraveny hořečnaté komplexy příslušných tetrapyridoporfyrasinů. Hořečnaté komplexy byly odkoveny a převedeny na zinečnaté komplexy. Komplex s diethylaminoethoxy substituenty byl následně kvarternizován pomocí ethyljodidu na finální sloučeninu. Finální zinečnaté komplexy byly testovány na fotodynamickou aktivitu a toxicitu na HeLa nádorových buňkách.

ABSTRACT

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department Department of Pharmaceutical Chemistry and Drug Control

Candidate **Magda Vavrečková**

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

Title of Thesis Synthesis of tetrapyrroldiporphyrines with potential photodynamic activity

Substituted tetrapyrroldiporphyrines represent new structural type of potential photosensitizers with interesting properties for application in photodynamic therapy. The aim of this work was to synthesize two types of tetrapyrroldiporphyrines with hydrophilic substituents as potential photosensitizers. Photosensitizers are substances with an ability to produce singlet oxygen after activation by light. Singlet oxygen is the key toxic species in photodynamic therapy.

2-Chloro-5,6-dimethylpyridine-3,4-dicarbonitrile (**1**) was prepared in the first step by condensation of tetracyanoethylene and butan-2-one. In the next step, a hydrophilic substituent was attached by nucleophilic substitution. The first precursor was prepared by reaction of compound **1** with 2-mercaptoethanol in the presence of sodium hydroxide. Similarly, the second precursor was obtained by reaction of compound **1** with diethylaminoethanol in the presence of sodium hydride. The third step involved cyclotetramerization with magnesium butoxide as initiator that gave magnesium complexes of corresponding tetrapyrroldiporphyrines. Magnesium complexes were converted to metal-free derivatives and then to zinc complexes. Complex with diethylaminoethoxy substituents was subsequently quaternized by ethyl iodide to the final compound. Final zinc compounds were tested for photodynamic activity and toxicity on HeLa cells.

OBSAH

1. SEZNAM ZKRATEK	8
2. CÍL PRÁCE	9
3. TEORETICKÁ ČÁST	10
3.1 Fotodynamická terapie	10
3.2 Historie	10
3.3 Princip fotodynamické terapie.....	11
3.3.1 Fotofyzika	11
3.3.2 Biologická odpověď	12
3.3.3 Cévní odpověď	12
3.3.4 Imunitní odpověď	13
3.4 Fotosenzitizéry	13
3.4.1 Vlastnosti fotosenzitizérů.....	13
3.4.2 Rozdělení fotosenzitizérů.....	14
3.4.3 Příklady fotosenzitizérů	15
3.4.4 Fotosenzitizéry třetí generace.....	16
4. METODICKÁ ČÁST	18
4.1 Syntéza 2-chlor-5,6-dimethylpyridin-3,4-dikarbonitrilu	18
4.1.1 Adiční reakce tetrakvanoethylenu	18
4.1.2 Syntéza substituovaného pyridinu	19
4.1.3 Syntéza 2-chlorpyridin-3,4-dikarbonitrilů z tetrakvanoethylenu <i>in situ</i>	19
4.2 Deriváty 5,6-dialkylpyridin-3,4-dikarbonitrilu	20
4.3 Cyklotetramerizace	20
4.3.1 Cyklotetramerizace pomocí alkoholátu alifatických alkoholů	21
4.3.2 Templátová metoda cyklotetramerizace	22
5. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	24
5.1 Syntéza 2-chlor-5,6-dimethylpyridin-3,4-dikarbonitrilu (1).....	24
5.2 Syntéza 2-(2-hydroxyethylsulfanyl)-5,6-dimethylpyridin-3,4-dikarbonitrilu (2) 25	
5.3 Syntéza 2-(2-(diethylamino)ethoxy)-5,6-dimethylpyridin-3,4-dikarbonitrilu (3)26	
5.4 Syntéza 6-(<i>tert</i> -butyl)-2-chlorpyridin-3,4-dikarbonitrilu.....	27

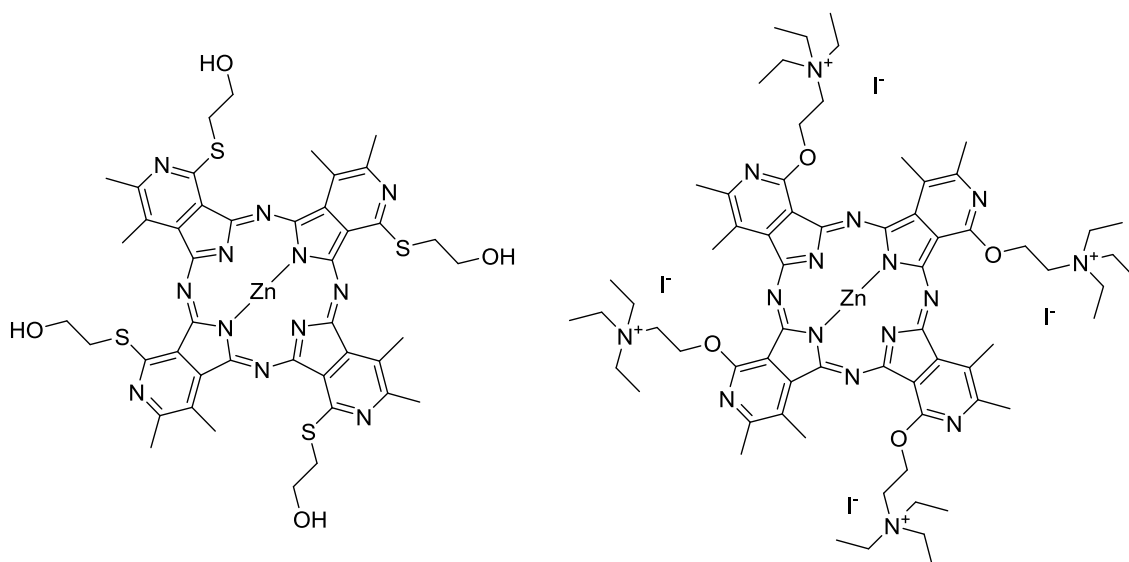
5.5	Syntéza 2-chlor-6-methylpyridin-3,4-dikarbonitrilu	28
5.6	Syntéza 1,8,15,22-tetrakis(2-hydroxyethylsulfanyl)-3,4,10,11,17,18,24,25- oktamethyltetra(3,4-pyrido)porfyrizináto hořečnatého komplexu (4Mg)	28
5.7	Syntéza 1,8,15,22-tetrakis(2-hydroxyethylsulfanyl)-3,4,10,11,17,18,24,25- oktamethyltetra(3,4-pyrido)porfyrizinu (4H ₂).....	29
5.8	Syntéza 1,8,15,22-tetrakis(2-hydroxyethylsulfanyl)-3,4,10,11,17,18,24,25- oktamethyltetra(3,4-pyrido)porfyrizináto zinečnatého komplexu (4Zn).....	30
5.9	Syntéza 1,8,15,22-tetrakis(<i>N,N</i> -diethylaminoethoxy)-3,4,10,11,17,18,24,25- oktamethyltetra(3,4-pyrido)porfyrizináto hořečnatého komplexu (5Mg)	31
5.10	Syntéza 1,8,15,22-tetrakis(<i>N,N</i> -diethylaminoethoxy)-3,4,10,11,17,18,24,25- oktamethyltetra(3,4-pyrido)porfyrizin (5H ₂).....	32
5.11	Syntéza 1,8,15,22-tetrakis(<i>N,N</i> -diethylaminoethoxy)-3,4,10,11,17,18,24,25- oktamethyltetra(3,4-pyrido)porfyrizináto zinečnatého komplexu (5Zn).....	33
5.12	Alkylace 1,8,15,22-tetrakis(<i>N,N</i> -diethylaminoethoxy)-3,4,10,11,17,18,24,25- oktamethyltetra(3,4-pyrido)porfyrizináto zinečnatého komplexu	34
6.	DISKUZE	35
6.1	Syntéza prekurzoru	35
6.2	Cyklotetramerizace	37
6.3	Absorpční spektra	40
6.4	Biologické hodnocení	42
7.	ZÁVĚR.....	45
8.	POUŽITÁ LITERATURA	46

1. SEZNAM ZKRATEK

DAMPs	damage-associated molecular patterns
DMF	dimethylformamid
DMSO	dimethylsulfoxid
IC ₅₀	koncentrace, která usmrtí 50 % buněk vystavených působení fotosenzitizéru a záření
LT	laboratorní teplota
NMP	<i>N</i> -methylpyrrolidon
PDT	fotodynamická terapie
PS	fotosenzitizér
ROS	reaktivní formy kyslíku
TC ₅₀	koncentrace, která usmrtí 50 % buněk vystavených působení fotosenzitizéru bez ozáření
THF	tetrahydrofuran
TLC	tenkovrstvá chromatografie
ZnQ ₂ Cl ₂	chlorid bis(chinolináto) zinečnatý

2. CÍL PRÁCE

Ve výzkumné skupině „Azaphthalocyanine group“ jsou již delší dobu studovány dusíkaté analogy ftalocyaninů jako potenciální fotosenzitizéry. V poslední době bylo zjištěno, že deriváty tetrapyridoporfyrazinů představují velice slibný základ pro strukturní obměny. Určitým omezením pro další vývoj v této skupině byla doposud nízká rozpustnost ve vodě, která brání rozsáhlejšímu testování nových látek. Cílem mé diplomové práce proto bylo připravit dva typy derivátů tetrapyridoporfyrazinů s hydrofilními substituenty. V prvním případě měl být periferní řetězec zakončen hydroxy skupinou a na makrocyclus měl být navázán přes síru. Druhý typ měl mít periferní řetězec s kvarterním dusíkem a na makrocyclus měl být navázán přes kyslík (Obrázek 1). Obě sloučeniny měly být připraveny cyklotetramerizací prekurzoru, na který měl být navázán požadovaný hydrofilní substituent.



Obrázek 1 Navržené struktury tetrapyridoporfyrazinů.

3. TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Fotodynamická terapie

Fotodynamická terapie (photodynamic therapy, PDT) je léčebná metoda, která se skládá se tří složek: fotosenzitizéru (PS), světla a kyslíku. Jednotlivé složky jsou samy o sobě netoxické, ovšem pokud PS absorbuje světlo o určité vlnové délce, dochází k zahájení fotochemické reakce, která vede ke vzniku singletového kyslíku. Ten poškozují přirozeně se vyskytující biomolekuly a tím navozuje buněčnou smrt. Selektivita metody je dána distribucí PS a plochou tkáně, která je osvětlena. V praxi jsou upřednostňovány PS, které se hromadí v rakovinných buňkách a světlem je ozařována jen nádorová tkáň.^{1,2} PDT se využívá především při léčbě nádorových a prekancerózních onemocnění kůže, dále také při léčbě nádorů plic, ústní dutiny a hrtanu.³ Další možností využití PDT je diagnostika, kdy PS po absorpci světla emituje fluorescenci, což se využívá pro zjištění polohy, hloubky nebo velikosti nádoru.¹

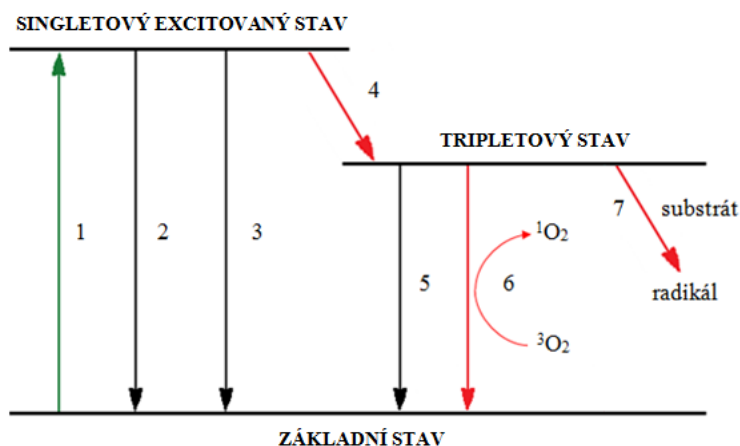
3.2 Historie

Fotochemická reakce, která způsobuje buněčnou smrt, byla poprvé zaznamenána před více než 100 lety. V roce 1900 německý student Oscar Raab zjistil, že akridin v kombinaci se světlem o určité vlnové délce je toxický pro nálevníky rodu *Paramecium*. Ve stejném roce zaznamenal francouzský neurolog J. Prime dermatitidu u pacientů, kteří byli léčeni eosinem a kteří byli vystaveni slunečnímu záření. Testování kombinací chemikálií a světla vedlo ke vzniku PDT. V roce 1913 německý lékař Friedrich Meyer-Betz provedl první studii PDT, kdy testoval hematoporfyrin na své kůži. Následovaly studie hematoporfyrinových derivátů, které zahájil roku 1960 Richard Lipson na Mayo clinic. Roku 1975 se podařilo odstranit prsní nádor a nádor močového měchýře myši a roku 1976 J. F. Kelly zahájil první pokusy PDT s deriváty hematoporfyrinu u pacientů s nádorem močového měchýře. Následovala studie T. Doughertyho, který léčil pacienty s nádorovým onemocněním kůže. Po slibných pokusech léčby rakoviny močového měchýře a kůže přišly snahy léčit pacienty s nádorem plic, jícnu, žaludku a dalších nádorových onemocněních. Úspěchy však byly limitovány především nízkou specifitou a účinností PS, což vedlo k výzkumu vhodnějších PS pro PDT.⁴

3.3 Princip fotodynamické terapie

3.3.1 Fotofyzika

Základní energetický stav PS je stav singletový, kdy jsou elektrony uspořádány v energeticky nejvýhodnějším molekulovém orbitalu a celkový spin elektronů v molekule je roven nule. Absorbací světla dojde k přesunu jednoho elektronu do vyšší energetické vrstvy a PS se dostane do singletového excitovaného stavu. Tento stav je velmi nestabilní a přebytečná energie je uvolňována ve formě tepla nebo fluorescence. Další možnou cestou uvolnění energie je mezisystémový přechod, kdy dojde k otočení spinu jednoho z vnějších elektronů a PS se tak dostane do tripletového stavu, ze kterého je dále uvolňována energie formou fosforescence, interakcí PS s okolními biomolekulami nebo interakcí PS s tkáňovým kyslíkem, což se využívá při PDT (Obrázek 2).^{5,6}



Obrázek 2 Jablonského diagram. 1. absorpce světla, 2. uvolnění energie ve formě tepla (vnitřní konverze), 3. uvolnění energie ve formě fluorescence, 4. mezisystémový přechod, 5. uvolnění energie ve formě fosforescence, 6. fotoproces typu II., 7. fotoproces typu I.

Předpokládá se, že při PDT převládá interakce PS s tkáňovým kyslíkem, při které molekulární kyslík přechází do velmi reaktivního singletového stavu, který oxiduje okolními biomolekuly. Tento proces je označován jako fotoproces typu II. Fotoprocesem typu I je nazýván děj, kdy PS v tripletovém stavu interaguje se substrátem (např. okolní biomolekuly, rozpouštědlo) za vzniku radikálů. Pomocí těchto radikálů vznikají následně reaktivní formy kyslíku (ROS). Výsledkem obou cest je oxidace biomolekul a následné vyvolání apoptózy či nekrózy.⁷

3.3.2 Biologická odpověď

Existence singletového kyslíku je velice krátká. Jeho doba života je nižší než $0,04 \mu\text{s}$ a difúzní poměr je tak menší než $0,02 \mu\text{m}$. Z toho vyplývá, že k poškození buněk dochází jen v okolí PS. Při PDT se PS váže zpravidla na plazmatickou membránu, membránu mitochondrie, do lysozomů nebo endoplazmatického retikula. Naopak je menší pravděpodobnost, že dojde k poškození DNA, protože PS se nekumuluje v buněčném jádru.⁸ Typ buněčné smrti závisí, mimo koncentrace PS a dávce světla, na typu struktury, která je poškozena. Pokud se PS hromadí v mitochondriích nebo endoplazmatickém retikulu jsou zpravidla inaktivovány proteiny rodiny Bcl-2 zodpovědné za propustnost vnější mitochondriální membrány. Následkem je uvolnění cytochromu C do cytoplazmy a aktivace kaspáz vedoucích k apoptóze buňky. Nekrotická dráha je nastartována při poškození buněčné membrány nebo lysozomu jako důsledek ztráty integrity buněčné membrány. Při poškození lysozomu dochází také k uvolnění proteáz, které mohou interakci s proteiny rodiny Bcl-2 rovněž aktivovat apoptózu.^{5,9}

Rakovinná buňka se brání poškození několika mechanismy. Bylo zjištěno, že v nádorových buňkách kolísá množství antioxidantů jak hydrofilních (některé aminokyseliny, glutathion, vitamín C) tak lipofilních (vitamín E), což způsobuje rozdílnou citlivost nádorových buněk k PDT. Druhým ochranným mechanismem je schopnost syntetizovat enzymy, které detoxikují ROS. Nebyl sice objeven žádný enzym, který inaktivuje singletový kyslík, ale jsou známy enzymy, které se zapojují do metabolismu ROS a které ovlivňují cytotoxický účinek PDT. Třetí mechanismus je založen na schopnosti nádorové buňky syntetizovat proteiny, které regulují apoptózu nebo které opravují molekuly poškozené oxidačním stresem.⁵

3.3.3 Cévní odpověď

Při PDT dochází ve tkáni k hypoxii. Je to výsledek oxidačního stresu a také mikrovaskulárního poškození (zúžení cév, tvorba trombu), které je pro PDT typické. Toxický účinek na cévy je závislý na typu PS a na čase mezi podáním PS a ozařováním. Snížený přísun kyslíku vede k indukci angiogenních růstových faktorů, hlavně vaskulárního endoteliálního růstového faktoru, cyklooxygenázy 2 a metaloproteinázy. Výsledkem této indukce je zvýšené riziko recidivy nádoru. Bylo potvrzeno, že při kombinaci PDT s inhibitory angiogeneze se zvyšuje terapeutický efekt léčby. Nejsou tím však blokovány všechny možné cesty tvorby metastáz.³

Výsledkem mikrovaskulárního poškození je v některých případech také vyšší permeabilita cév. Proto může být PDT využívána také k usnadnění distribuce makromolekulárních látek z krve do tkáně.¹⁰

3.3.4 Imunitní odpověď

K protinádorovému účinku PDT patří také aktivace imunitního systému. První reakce tkáně poškozené singletovým kyslíkem je vystavení ligandu DAMPs (Damage-associated molecular patterns) potřebného pro zahájení imunitní odpovědi. Tento děj je charakteristický hlavně pro nekrózu ovšem uvádí se, že při apoptóze nádorových buněk dochází také ke spuštění imunitní odpovědi stejným mechanismem jako u nekrózy. V tomto případě je proces označován jako imunogenní apoptóza. Dále dochází vlivem oxidačního stresu k uvolnění prozánětlivých mediátorů a k rozvoji zánětu. Mezi nejvýznamnější prozánětlivé mediátory patří tumor nekrotizující faktor, interleukin-1, interleukin-6 a proteiny komplementu. Následně jsou do tkáně infiltrovány monocyty, neutrofilů a dendritické buňky, které zahajují nespecifickou imunitní odpověď. Přechod buněk imunitního systému do tkáně může být umocněn poškozením cév, které je popsáno výše. Při zánětlivé reakci dochází k aktivaci dendritických buněk, které patří mezi antigen prezentující buňky. Poté, co se dostanou do lymfatických uzlin, začne proliferace T-lymfocytů, které zprostředkovávají specifickou imunitní reakci. Bylo dokázáno, že buňky a mediátory zánětu jsou důležité pro účinnost PDT.^{11, 12}

3.4 Fotosenzitizéry

3.4.1 Vlastnosti fotosenzitizérů

Fotosenzitizér ovlivňuje účinnost PDT a nežádoucí účinky terapie. Mezi pozitivní vlastnosti PS patří mj. vyšší kumulace v nádorové tkáni, která zajišťuje selektivitu terapie a minimalizuje poškození zdravé tkáně, které může nastat, když dojde k aktivaci PS mimo nádor. Dále je požadováno, aby PS nebyl toxický a aby nebyly toxické ani jeho metabolity. Vhodná je také rychlá eliminace, která rovněž omezuje poškození zdravé tkáně a usnadňuje celý proces léčby.¹³

Další důležitou vlastností PS je pozice absorpčního maxima. PDT je omezena schopností světla proniknout tkáněmi. Lépe prostupuje světlo s vyšší vlnovou délkou, proto je pro PDT vhodnější PS s absorpčním maximem v červené až blízké infračervené oblasti. Pokud je však hodnota vlnové délky vyšší než 800 nm, světlo již nemusí mít

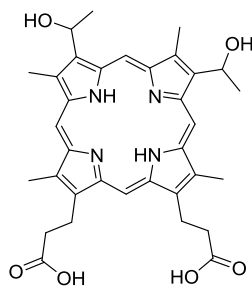
dostatečnou energii k produkci singletového kyslíku. Absorpční maximum by tedy mělo být v rozmezí 630 – 800 nm.¹⁴

Je také požadována vhodná chemická struktura PS. Přítomnost hydrofilních skupin zajišťuje distribuci krevním oběhem. Ovšem molekula musí být také dostatečně lipofilní pro přechod PS přes membránu do buňky a pro navázání na cílovou strukturu.¹⁴ Pokud má molekula ve vodném prostředí tendenci k agregaci, je třeba tomu zabránit vhodnou substitucí, protože při agregaci molekul ztrácí PS svou fotodynamickou aktivitu.¹⁵

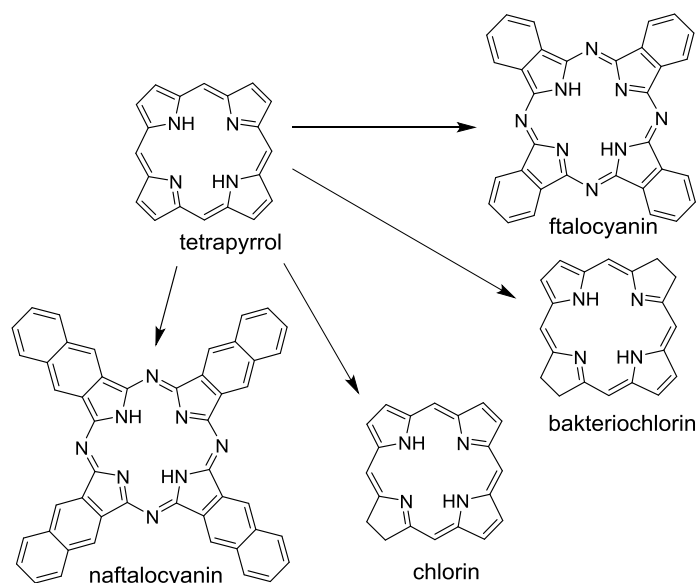
Ideální PS by tedy měl být distribuován do cílové tkáně, po aktivaci světlem by měl produkovat potřebné množství singletového kyslíku a následně by měl být eliminován, aby nedošlo k poškození zdravé tkáně. PS by rovněž neměl bránit použití dalších léčebných metod jako je chirurgie, ozařování nebo chemoterapie.¹³

3.4.2 Rozdělení fotosenzitizérů

PS se dělí do tří generací. První objevený PS hematoporfyrin (Obrázek 3) a jeho deriváty se řadí do první generace. Tyto látky mají hodnotu absorpčního maxima okolo 630 nm a vyznačují se nízkou clearance. Fotosenzitivita kůže trvá 6 až 8 týdnů. Tyto faktory omezují jejich využití při PDT. Druhou generaci představují PS s modifikovaným tetrapyrrolovým jádrem, jako jsou ftalocyaniny, naftalocyaniny, chloriny nebo bakteriochloriny (Obrázek 4). Tyto molekuly mají absorpční maximum posunuté k vyšším vlnovým délkám (650 – 850 nm). Také byly připraveny jejich komplexy s různými kationty kovů, u kterých byla pozorována vyšší afinita k nádorové tkáni. Jako třetí generace jsou označovány PS druhé generace, které jsou navázány na nosiče umožňující selektivní vychytávání PS nádorovými buňkami. Těmito nosiči jsou např. monoklonální protilátky nebo liposomy.^{13, 16, 17}



Obrázek 3 Hematoporfyrin.

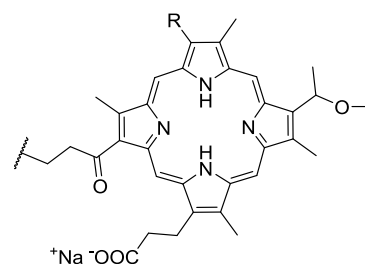


Obrázek 4 Struktury odvozené od tetrapyrrolu.

3.4.3 Příklady fotosenzitizérů

Porfimer sodný

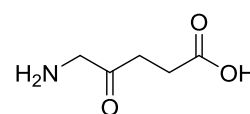
Jedná se o PS ze skupiny hematoporfyrinových derivátů. Není to jednotná látka, jedná se o směs dimerů a vyšších oligomerů. I přes nevýhody, jako je nízká selektivita a čtyřtýdenní fotosenzitivita, je porfimer sodný používán k léčbě rakoviny močového měchýře.¹³ Také byla



provedena studie, do které byli zapojeni pacienti s dlaždicovým karcinomem jícnu, u kterých selhala předchozí chemoterapie. Z 25 pacientů léčených porfimerem sodným reagovalo 19 a u 11 pacientů nebyla zaznamenána recidiva po dobu dvou let.¹⁸

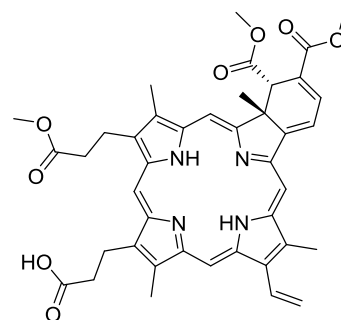
Kyselina 5-aminolevulová

Kyselina 5-aminolevulová se *in vivo* mění na fotodynamicky aktivní protoporfyrin IX, který je dále převeden na hem, který již aktivní není. Přeměna protoporfyrinu IX na hem je saturabilní, což je výhodné pro PDT, protože dochází ke kumulaci PS v nádorových buňkách. Pro hlubší průnik do tkáně jsou vhodné lipofilnější verze 5-aminolevulové kyseliny – methyl nebo hexyl estery. Penetrace se zvýší z 1 mm na 2 mm.¹⁴ Dle výsledků studií je kyselina 5-aminolevulová vhodná především pro pacienty s kožním onemocněním jako například akné¹⁹ nebo aktinická keratóza²⁰.



Verteporfin

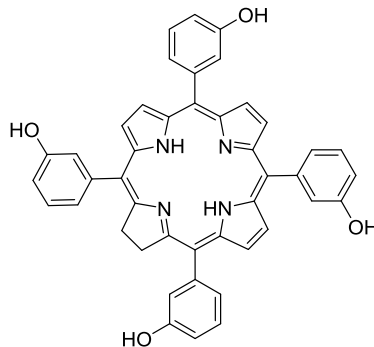
Verteporfin se řadí mezi benzoporfyrinové deriváty. Jedná se o hydrofilní PS (po hydrolýze esterů *in vivo*), který je díky své nízké rozpustnosti ve vodě podáván ve formě liposomů. Vzhledem k tomu, že jeho absorpční maximum je při 690 nm, může k aktivaci dojít i hlouběji ve tkáni.



Výhodou je také jeho rychlá eliminace. Fotosenzitivita trvá jen několik hodin. Verteporfin v místě aktivace ovlivňuje neovaskularizaci. Toho lze využít u léčby stařecké makulární degenerace, která může vést až ke slepotě. Předpokládá se, že by tento PS mohl být vhodný také pro léčbu nádorů orgánů s vysokou úrovní prokrvení.^{13, 14} Klinická studie potvrdila bezpečné použití verteporfinu u pacientů s nádorem pankreatu.²¹

Temoporfin

Temoporfin je PS odvozený od chlorinu. Po absorpci světla s vlnovou délkou 652 nm má velký kvantový výtěžek singletového kyslíku, což je výhodné pro PDT, ale vyplývají z toho i některé nevýhody. Při osvětlení nádoru musí být důsledně odstíněna zdravá tkáň, aby nedošlo k aktivaci PS mimo nádor. Vzhledem k



fotosenzitivitě, by pacient neměl být vystaven světlu po dobu 2 – 4 týdnů, protože i minimální množství PS může při aktivaci ve zdravé tkáni způsobit významné poškození. Dobrá reakce na léčbu temoporfinem byla zaznamenána u pacientů s rakovinou kůže, hlavy, krku a dále také plic a jícnu.^{13, 14} V klinických studiích je kladen důraz na množství PS, která je potřeba pro léčbu a které zároveň nezpůsobuje významné nežádoucí účinky.²²

3.4.4 Fotosenzitizéry třetí generace

Třetí generace PS se vyznačuje konjugací fotodynamicky aktivní molekuly s nosičem, který má za úkol zlepšit selektivitu terapie a umožnit intravenózní podání lipofilních PS.¹⁷ Mezi PS, se kterými byly vytvořeny konjugáty, patří i temoporfin. Ten byl konjugován s polyethylenglykolem a s lipozomy. Bylo zjištěno, že především lipozomální struktury poskytují lepší biologickou dostupnost léčiva a výrazněji se akumulují v nádorové tkáni. Jako vhodná cesta se také jeví konjugace porfyrinů s proteiny.²³ Mezi další zástupce PS třetí generace můžou v budoucnu patřit i hlinité

komplexy ftalocyaninů konjugované s kopolymerem methylvinyloletheru a anhydridu kyseliny maleinové. Ftalocyaniny jsou dobrými PS, ovšem jejich použití limituje agregace ve vodě. Studie konjugátů ale potvrzuje fotodynamickou aktivitu i ve vodném prostředí.²⁴ Dalším způsobem, jak zajistit distribuci PS je vytvoření polymerní nanokapsle. Byly studovány PS cyaninového typu, které tvořily olejová jádra v nanoemulzi olej ve vodě. Účinnost PS závisela na přesné struktuře nanoemulze. Tvorba nanokapslí byla zhodnocena jako vhodná metoda distribuce PS špatně rozpustných ve vodě.²⁵

4. METODICKÁ ČÁST

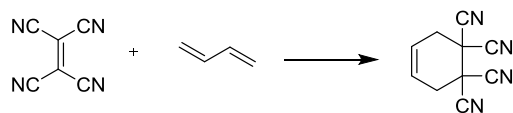
Ve své experimentální práci se zabývám syntézou tetrapyridoporfyrasinů. Proto bych se ráda v Metodické části věnovala již publikovaným informacím o různých fázích jejich přípravy – od adiční reakce tetrakynoethylenu až po cyklotetramerizační reakce.

4.1 Syntéza 2-chlor-5,6-dimethylpyridin-3,4-dikarbonitrilu

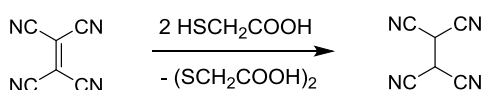
4.1.1 Adiční reakce tetrakynoethylenu

Dvojná vazba tetrakynoethylenu může podstoupit čtyři typy adičních reakcí (Obrázek 5). Jedná se o Diels-Alderovu adici konjugovaných dienů na tetrakynoethylen, pro kterou je typické, že probíhá velmi dobře i při nízké teplotě. Dalším typem reakce je hydrogenace, která je vhodná pro přípravu tetrakynoethanu. Osvědčila se především redukce tetrakynoethylenu kyselinou thioglykolovou. Dále byla popsána adice volného radikálu, který byl připraven tepelným rozkladem a posledním typem je pak adice sloučeniny s aktivním vodíkem. Tento typ adice byl úspěšný pouze při reakci tetrakynoethylenu s ketony disponujícími vodíkem na α -uhlíku a při reakci s kyselinou siřičitou. Pokusy se sulfanem, jodovodíkem nebo s thioley vedly ke vzniku tetrakynoethanu.²⁶

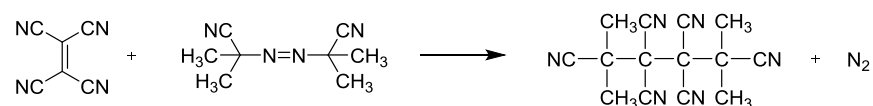
Diels-Alderova reakce



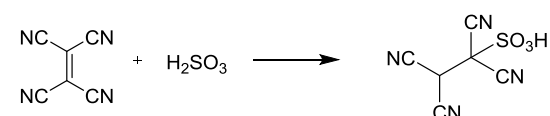
Hydrogenace



Adice volného radikálu



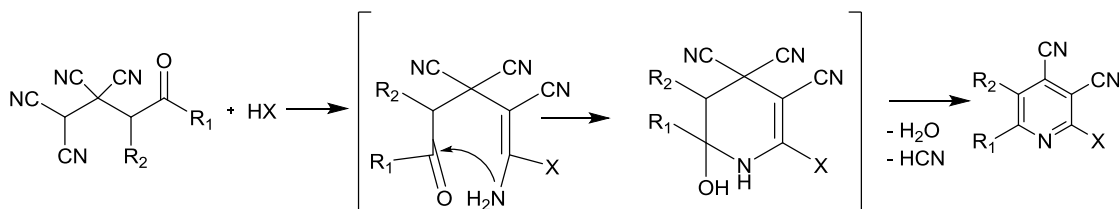
Adice molekuly s aktivním vodíkem



Obrázek 5 Adice tetrakynoethylenu.

4.1.2 Syntéza substituovaného pyridinu

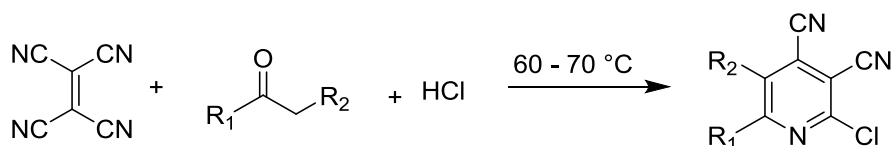
Význam pro syntézu 2-chlor-5,6-dimethylpyridin-3,4-dikarbonitrilu má především adice ketonu na tetrakynoethylen. Produkty této adice byly zkoumány při reakci s minerálními a halogenvodíkovými kyselinami. Při zahřátí ketonu s 50% kyselinou sírovou není možné charakterizovat produkt, protože vznikají dehtovité směsi, ze kterých není možné produkt izolovat. Reakcí ketonu s kyselinou chlorovodíkovou nebo bromovodíkovou je však možné připravit pyridin-3,4-dikarbonitril s halogenem v poloze 2. Výtěžek této reakce se pohybuje v rozmezí 60 – 80 %. Iniciátorem reakce je halogenvodík, který se váže na jednu z kyanoskupin. Následně dojde k cyklizaci molekuly a odštěpení kyseliny kyanovodíkové (Obrázek 6). Pokud reakce probíhá při vyšší teplotě (100 °C) dochází opět ke vzniku dehtovité směsi, proto je tato reakce běžně prováděna za laboratorní teploty.²⁷



Obrázek 6 Reakce ketonu s halogenvodíkem.

4.1.3 Syntéza 2-chlorpyridin-3,4-dikarbonitrilů z tetrakynoethylenů *in situ*

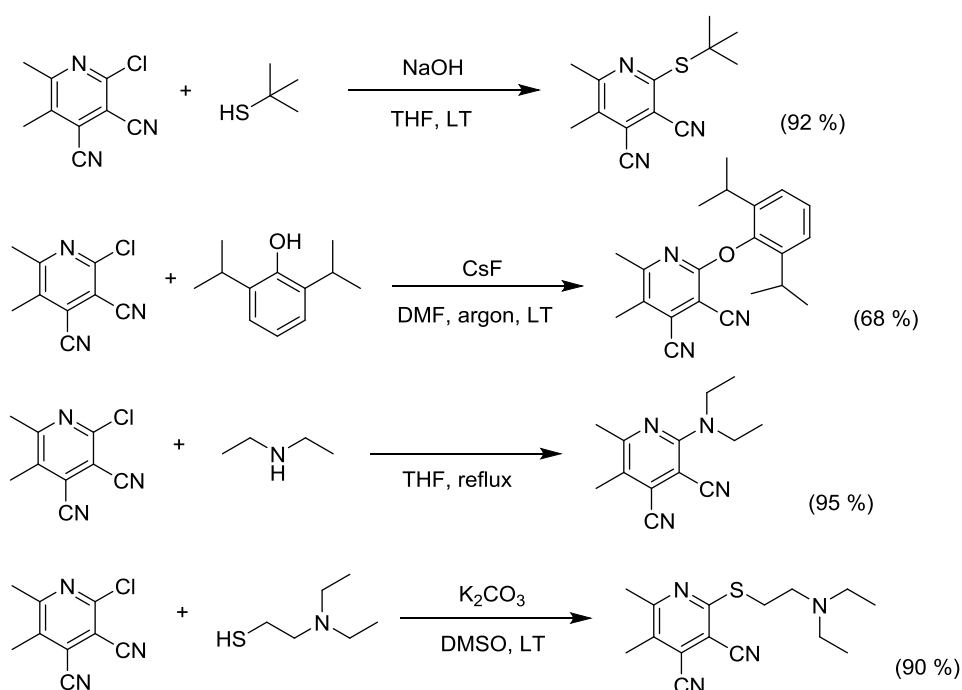
Na základě výše uvedených poznatků lze předpokládat, že syntéza 2-chlorpyridin-3,4-dikarbonitrilu z tetrakynoethylenů je možná v rámci jednoho kroku. V roce 2010 byla publikována tříšložková syntéza 2-chlorpyridin-3,4-dikarbonitrilu, která zahrnovala pouze jeden krok a to reakci tetrakynoethylenů s alifatickým, aromatickým nebo heterocyklickým ketonem, disponujícím vodíkem na α -uhlíku, a kyselinou chlorovodíkovou. Tato reakce probíhá v prostředí 1,4-dioxanu a její výtěžek se pohybuje v rozmezí 86 – 97 % (Obrázek 7).²⁸



Obrázek 7 Syntéza substituovaných 2-chlorpyridin-3,4-dikarbonitrilů: a) $R_1 = R_2 = \text{CH}_3$ (89 %); b) $R_1 = \text{CH}_3$, $R_2 = \text{C}_2\text{H}_5$ (93 %); c) $R_1R_2 = (\text{CH}_2)_4$ (97 %); d) $R_1R_2 = (\text{CH}_2)_6$ (94 %); e) $R_1 = \text{fenyl}$, $R_2 = \text{H}$ (87 %); f) $R_1 = 2\text{-thienyl}$, $R_2 = \text{H}$ (86 %).

4.2 Deriváty 5,6-dialkylpyridin-3,4-dikarbonitrilu

Molekula 2-chlor-5,6-dialkylpyridin-3,4-dikarbonitrilu obsahuje několik reaktivních center. Pro přípravu derivátů tetrapyridoporfyrainů, kterou se tato práce zabývá, je nejdůležitější uhlík v poloze 2. Tento uhlík je vlivem kyanoskupin, sousedního dusíku a atomu chloru silně elektrondeficitní. Díky tomu je možné připravit různé jeho obměny pomocí nukleofilní substituce v přítomnosti báze. Obecně je výtěžek této nukleofilní substituce vysoký. Na uhlík v poloze 2 se vážou aminy, fenoláty i thioláty (Obrázek 8). Mezi báze, které byly použity pro přípravu derivátů 5,6-dialkylpyridin-3,4-dikarbonitrilu, patří hydroxid sodný, fluorid cesný, uhličitan draselný, triethylamin nebo hydrogenuhličitan sodný.^{29, 30}



Obrázek 8 Schéma přípravy derivátů 5,6-dialkylpyridin-3,4-dikarbonitrilu.

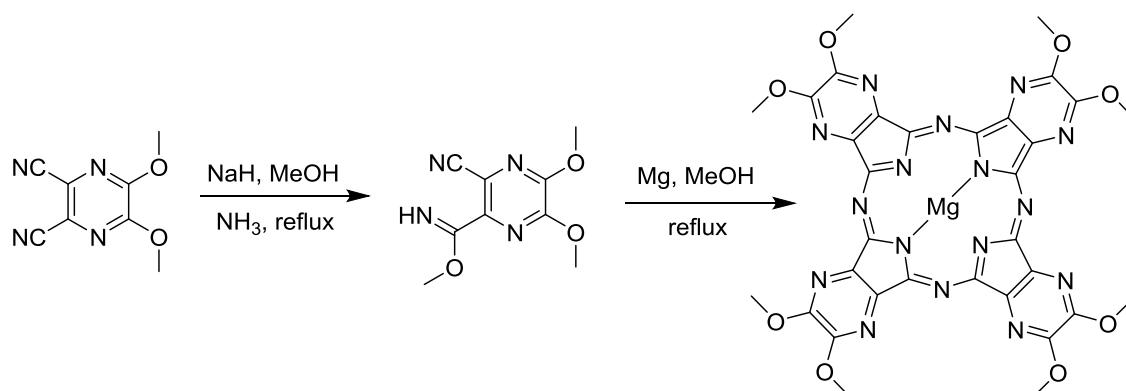
4.3 Cyklotetramerizace

Syntéza makrocyklu spočívá v cyklotetramerizaci vhodného prekurzoru. Cyklotetramerizační reakce jsou používány pro přípravu azaftalocyaninů a dalších porfyrainů a obecné informace z těchto syntéz je možné využít i pro přípravu tetrapyridoporfyrainů. Reakce může probíhat dvěma mechanismy a to templátovou metodou nebo pomocí alkoholátů alifatických alkoholů. Jako vhodný prekurzor pro cyklotetramerizaci je aromát obsahující dvě nitrilové skupiny v *ortho* uspořádání, ze

kterých makrocyklus vzniká. Jedna molekula makrocyku pak vzniká ze 4 molekul prekursoru. Cyklotetramerizační reakcí výše uvedených derivátů 5,6-dialkylpyridin-3,4-dikarbonitrilu byly v minulosti již připraveny první látky ze skupiny tetrapyridoporfyrasinů.⁶

4.3.1 Cyklotetramerizace pomocí alkoholátu alifatických alkoholů

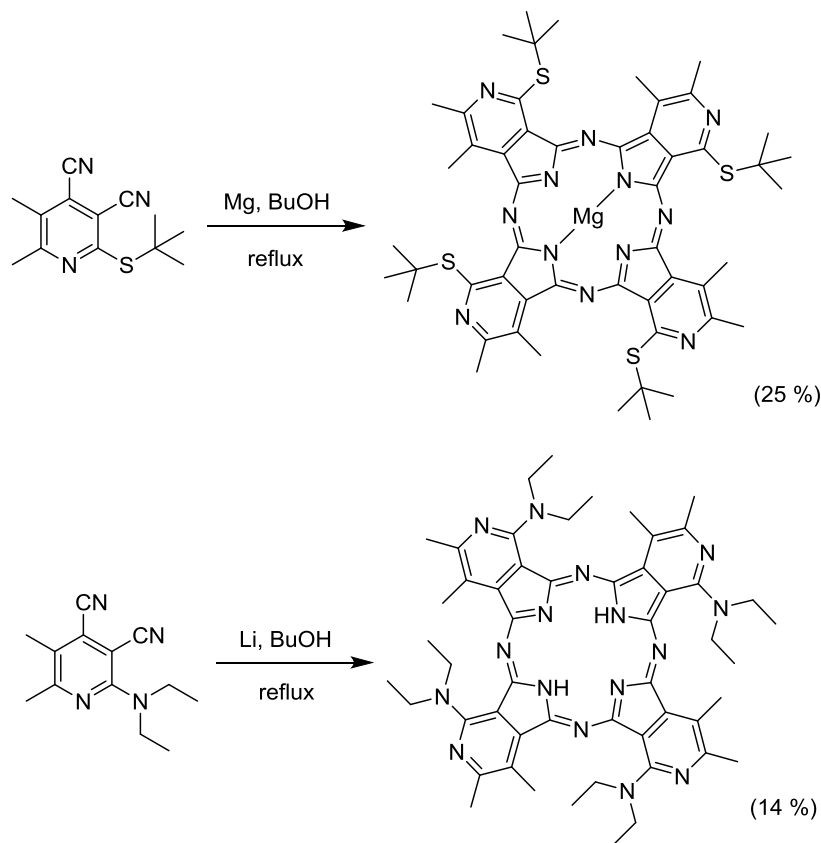
Cyklotetramerizace pomocí alkoholátu představuje vhodnou metodu pro přípravu některých komplexů. E. H. Mørkved publikovala v roce 1999 přípravu oktaalkoxyzaftalocyaninů, v rámci které byl popsán meziprodukt cyklotetramerizační reakce. V její práci bylo zvoleno několik typů prekursoru, ale u většiny z nich nebyl připraven požadovaný derivát. Úspěšné byly ty reakce, kdy periferní substituent prekursoru odpovídal alkoholátu, který inicioval cyklotetramerizaci. Konkrétně byl připraven oktamethoxyzaftalocyaninátový komplex z 5,6-dimethoxypyrazin-2,3-dikarbonitrilu a to v přítomnosti methanolátu sodného (Obrázek 9). Methanolát, připravený z methanolu působením hydridu sodného, napadá kyanoskupinu prekursoru a vzniká methylkarboximidát, který je potvrzeným meziproduktem této reakce. Celý makrocyklus pak vzniká postupně. Methylkarboximidát napadá další volné kyanoskupiny dokud nedojde k zacyklení molekuly. Nevýhodou této metody cyklotetramerizace je, že při reakci může docházet k výměně periferních substituentů za alkoxy skupiny. Je to také důvod proč se nepodařilo připravit některé deriváty oktaalkoxyzaftalocyaninů v práci E. H. Mørkved.^{6, 31}



Obrázek 9 Schéma přípravy oktamethoxyzaftalocyaninátového komplexu.

Metoda cyklotetramerizace pomocí alkoholátu byla zvolena i při přípravě derivátů tetrapyridoporfyrasinů. Při reakcích, které byly publikovány, byl jako iniciátor reakce použit butanolát hořečnatý nebo butanolát lithný (Obrázek 10). Výběr iniciátoru reakce závisí na vlastnostech molekuly. Hořečnaté alkoholáty paří mezi mírné iniciátory

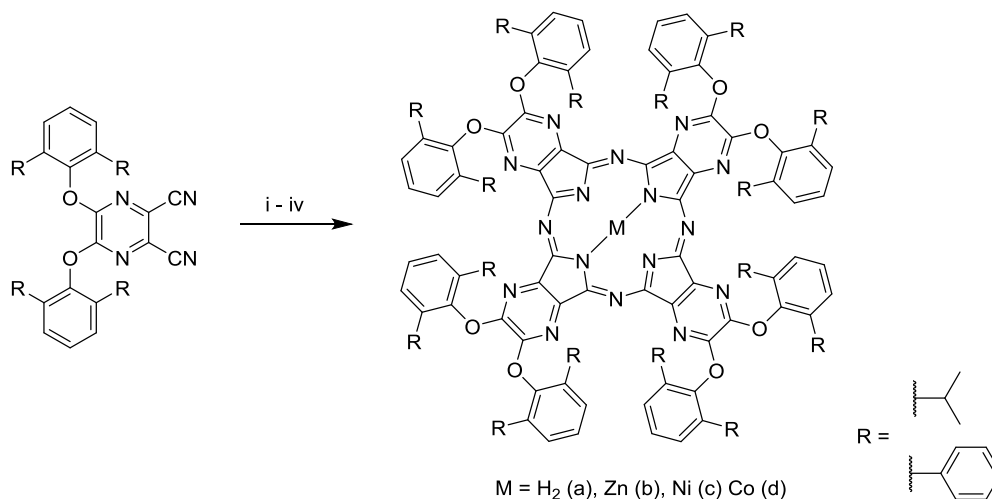
cyklotetramerizací a pravděpodobnost výměny periferních substituentů během reakce je u nich výrazně snížena. Lithné alkoholáty jsou silnějšími iniciátory a jsou vhodné při cyklotetramerizaci, kdy je periferní substituent silným donorem elektronů.²⁹



Obrázek 10 Schéma přípravy derivátů tetrapyrroldiporphyrinů.

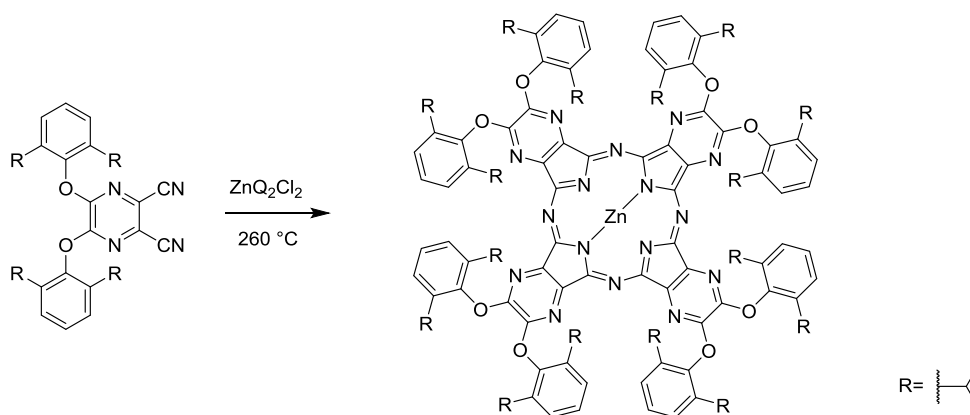
4.3.2 Templátová metoda cyklotetramerizace

Cyklotetramerizace templátovou metodou představuje reakci, kdy se molekuly prekurzoru seskupí kolem kationtu kovu, díky tomu se zkrátí vzdálenosti mezi molekulami prekurzorů a při vyšší teplotě vznikne makrocyklus. Obecně má tato metoda nižší výtěžky a reakce probíhá při vyšší teplotě, než u cyklotetramerizace iniciované alkoholátem. Výhodou ovšem je, že při templátové metodě nedochází k výměnám periferních substituentů, a proto je tato metoda vhodná pro přípravu makrocyklů s aryloxy nebo alkoxy substituenty.⁶ Reakce byla popsána v publikaci při syntéze oktaazaftalocyaninů s objemnými fenoxysubstituenty (Obrázek 11). Derivát pyrazin-2,3-dikarbonitrilu reagoval v prostředí chinolinu a v přítomnosti octanu zinečnatého, octanu nikelnatého nebo chloridu kobaltnatého. Při 160 °C směs reagovala 24 hodin a po ukončení reakce byly izolovány požadované komplexy azaftalocyaninů.³²



Obrázek 11 Schéma syntézy oktaazaftalocyaninů s objemnými fenoxysubstituenty: i) pro **a**: chinolin, 160 °C; ii) pro **b**: Zn(CH₃COO)₂, chinolin, 160 °C; iii) pro **c**: Ni(CH₃COO)₂, chinolin, 160 °C; iv) pro **d**: CoCl₂, chinolin, 160 °C.

Metoda templátové cyklotetramerizace byla dále vylepšena díky objevu nového iniciátoru. Jedná se o chlorid bis(chinolináto) zinečnatý (ZnQ₂Cl₂), díky kterému byla templátová cyklotetramerizace zjednodušena. Hlavní výhodou je, že ZnQ₂Cl₂ nevyžaduje bezvodé podmínky jako je tomu u chinolinu. Byly opět studovány přípravy zinečnatých aryloxy nebo alkoxy substituovaných azaftalocyaninů (Obrázek 12) a také byla zjištěna závislost průběhu cyklotetramerizace na teplotě reakce. Výsledky ukázaly, že při nízké teplotě cyklotetramerizační reakce vůbec nepobíhá. Čím je pak teplota vyšší, tím rychleji makrocyklus vzniká. Ovšem pouze do teploty tání produktu, protože poté dochází k jeho rozkladu. Nevýhodou přípravy zinečnatých azaftalocyaninů v prostředí ZnQ₂Cl₂ je nižší výtěžek reakce, na druhou stranu ale umožňuje rychlejší a snadnější přípravu komplexů.^{33, 34}

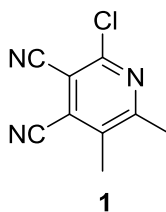


Obrázek 12 Schéma syntézy zinečnatých azaftalocyaninů s aryloxy substituenty.

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 na digitálním přístroji ELECTROTHERMAL IA9200. Průběh reakcí a čistota výsledných produktů byly sledovány pomocí tenkovrstvé chromatografie (TLC) na deskách Merck Kieselgel 60 F254 nebo Merck Aluminium oxide 60 F254, neutral. 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) nebo byl použit oxid hlinitý – neutrální Brockmann I (Sigma-Aldrich). Mobilní fáze, které byly použity, jsou popsány u jednotlivých reakcí dále. 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 nebo pomocí přístroje Micro Cube Elemental Analyzer (Elementar Analysensysteme GmbH, Hanau, Germany) na Katedře farmaceutické chemie a kontroly léčiv. Spektra UV/VIS byla měřena pomocí přístroje Shimadzu UV-2600 spectrophotometer na Katedře farmaceutické chemie a kontroly léčiv. 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 maticí (*trans*-2-[3-(4-*terc*-butylfenyl)-2-metyl-2-propenyliden]malononitril) v dichlormethanu, nanesen na destičku a důkladně vysušen.

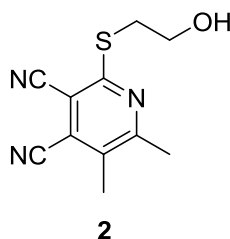
5.1 Syntéza 2-chlor-5,6-dimethylpyridin-3,4-dikarbonitrilu (1)



Tetrakynoethylen (10 g, 78 mmol) byl rozpuštěn v 1,4-dioxanu (200 ml). Dále byl přidán butan-2-on (5,15 g, 6,4 ml, 71 mmol, 0,805 g/ml) a koncentrovaná kyselina

chlorovodíková (80 ml). Roztok měnil barvu do červena a postupně tmavnul. Reakce probíhala při 65 °C pod zpětným chladičem, jehož vývod byl umístěn do kádinky s 20% síranem železnatým obazičtěným roztokem NaOH k detoxikaci vznikajícího HCN. Reakce byla ukončena po 2,5 hodinách, kdy byla nalita na led. Po rozpuštění ledu bylo vše vloženo do lednice na cca 15 hodin, kde produkt vykrytalizoval. Pomocí filtrace byly odděleny krystaly a filtrát byl 3× vytřepán směsí voda/chloroform. Chloroformové vrstvy byly spojeny, vysušeny bezvodým síranem sodným a po přefiltrování bylo odpařeno rozpouštědlo. Produkt získaný krystalizací a vytřepáváním byl spojen a dále čištěn sloupcovou chromatografií za použití chloroformu jako mobilní fáze. Bylo získáno 7,1 g (47 %) narůžovělé pevné látky. Syntéza byla provedena dle publikovaného postupu²⁸ a produkt byl porovnán na TLC se standardem připraveným a charakterizovaným dříve na katedře.

5.2 Syntéza 2-(2-hydroxyethylsulfanyl)-5,6-dimethylpyridin-3,4-dikarbonitrilu (2)

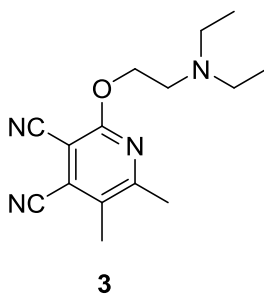


V prvním kroku syntézy byl smíchán 1 M roztok hydroxidu sodného (7,8 ml, 7,8 mmol) s 2-merkptoethanolem (562 mg, 0,5 ml, 7,2 mmol, 1,12 g/ml). Po 15 minutách byl přidán prekurzor **1** (1149,6 mg, 6 mmol) rozpuštěný v tetrahydrofuranu (THF) (15 ml). Reakce probíhala dále 1 hodinu za laboratorní teploty. Poté byla ke směsi přidána voda a produkt byl vytřepán do ethyl-acetátu. Organická vrstva byla oddělena, vysušena bezvodým síranem sodným, přefiltrována a odpařena. Produkt byl následně čištěn sloupcovou chromatografií s mobilní fází chloroform/acetone 9 : 1. Bylo připraveno 950 mg (68 %) pevné látky, která měla po rekrystalizaci z metanolu s aktivním uhlím bílou barvu.

T. t. 106,8 – 108,2 °C. IČ (ATR): ν_{\max} = 3519 (OH), 2952, 2893, 2233 (CN), 1556, 1531, 1438, 1393, 1364, 1269, 1235, 1154, 1048, 1023 cm^{-1} . Elementární analýza (%) vypočítáno pro $\text{C}_{11}\text{H}_{11}\text{N}_3\text{OS}$: C 56,63; H 4,75; N 18,01; nalezeno C 56,66; H 4,74; N 17,73. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 3,93 (t, 2 H, J = 5,7 Hz, OCH_2), 3,48 (t, 2

H, $J = 5,8$ Hz, SCH₂), 2,63 (s, 3 H, CH₃), 2,56 (s, 1 H, OH), 2,49 (s, 3 H, CH₃). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 162,8; 160,4; 130,3; 124,6; 113,0; 113,2; 106,1; 61,9; 33,7; 23,8; 17,0.

5.3 Syntéza 2-(2-(diethylamino)ethoxy)-5,6-dimethylpyridin-3,4-dikarbonitrilu (3)

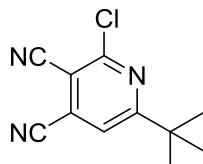


V 2-(diethylamino)ethanolu (6 ml) pod argonem byla rozpuštěna 60% suspenze hydridu sodného v minerálním oleji (460 mg, 11,5 mmol). Tato směs reagovala 15 minut pod argonem za laboratorní teploty. Poté byl přidán prekurzor **1** (2 g, 10,4 mmol) a reakce probíhala dalších 30 minut za stejných podmínek. Po ukončení reakce byla ke směsi přidána voda a produkt byl vytřepán do ethyl-acetátu a organická fáze byla oddělena. Následně byla k organické fázi přidána voda okyselená několika kapkami kyseliny chlorovodíkové do kyselé reakce a produkt byl vytřepán do vody. Pokud po vytřepání vodná fáze nedávala kyselou reakci, byla přidána další HCl a vytřepáno znovu. K oddělené vodné vrstvě byl poté přidán jednomolární roztok hydroxidu sodného do zásadité reakce a produkt byl vytřepán do ethyl-acetátu. Organická vrstva byla vysušena bezvodým síranem sodným, přefiltrována a odpařena. Dále byl produkt čištěn sloupcovou chromatografií. Nejprve byla jako mobilní fáze použita směs diethylether/triethylamin 30 : 1. Pomocí Dragendorffova činidla byly na TLC identifikovány frakce, ve kterých byl přítomen produkt (oranžové skvrny po detekci). Při první sloupcové chromatografii bylo získáno 563 mg čisté látky. Frakce, ve kterých byl obsažen produkt a zároveň obsahoval ještě nečistoty, byly dále chromatograficky čištěny za použití mobilní fáze ethyl-acetát/triethylamin 30 : 1 a bylo získáno dalších 426 mg produktu. Celkový výtěžek reakce byl 989 mg (35%). Produktem byla pevná látka oranžové barvy.

T. t. 60,9 – 62,5 °C. IČ (ATR): $\nu_{\max} = 2976, 2938, 2796, 2227$ (CN), 1559, 1425, 1331, 1290, 1248, 1131, 1071, 1021. Elementární analýza (%) vypočítáno pro: C 66,15; H

7,40; N 20,57; nalezeno: C 66,02; H 7,57; N 20,60. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 4,51 (t, 2 H, $J = 6,3$ Hz, OCH_2), 2,87 (t, 2 H, $J = 6,3$ Hz, NCH_2), 2,63 (q, 4 H, $J = 7,2$ Hz, NCH_2), 2,54 (s, 3 H, CH_3), 2,44 (s, 3 H, CH_3), 1,06 (t, 6 H, $J = 7,2$ Hz, CH_3). ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 162,4; 161,8; 126,8; 125,8; 113,5; 112,8; 95,2; 66,5; 50,9; 48,0; 23,6; 16,5; 12,0.

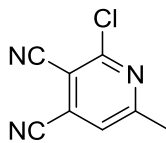
5.4 Syntéza 6-(*tert*-butyl)-2-chlorpyridin-3,4-dikarbonitrilu



Při syntéze tohoto prekurzoru s objemným substituentem byl rozpuštěn tetrakynoethylen (200 mg, 1,6 mmol) v dioxanu (5 ml). Dále byl do reakce přidán 3,3-dimethylbutan-2-on (184 mg, 0,23 ml, 1,8 mmol, 0,8 g/ml) a koncentrovaná kyselina chlorovodíková (1,6 ml). Roztok během 15 minut změnil barvu přes červenou do černa. Reakce probíhala při 60 °C a byla hodnocena po 2,5 hodinách pomocí TLC za použití chloroformu jako mobilní fáze. Na desce bylo patrné, že výchozí látky již v reakci nejsou, ale nebyla zde ani skvrna, která by odpovídala požadovanému produktu. Teplota byla ještě zvýšená na 130 °C a po 1 hodině bylo provedeno další TLC. Výsledek reakce se však nezměnil.

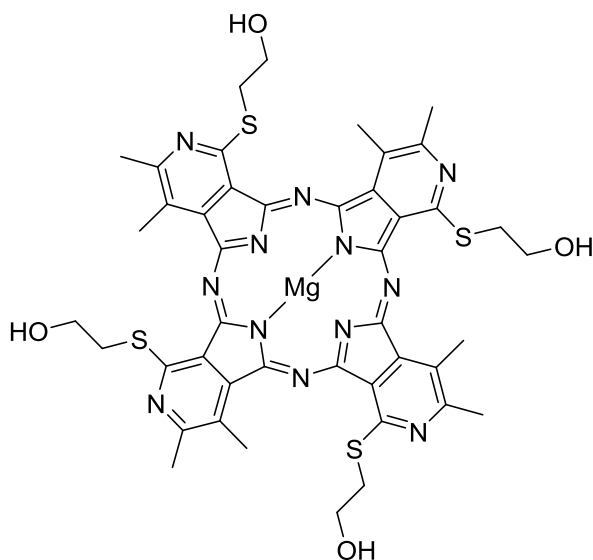
Syntéza byla také zkoušena v mikrovlnném reaktoru při teplotě 70 °C, 120 °C a 170 °C. Ve všech třech případech reagoval tetrakynoethylen (100 mg, 0,8 mmol) v dioxanu (5 ml) s 3,3-dimethylbutan-2-onem (104 mg, 0,13 ml, 1,4 mmol, 0,8 g/ml) v přítomnosti koncentrované kyseliny chlorovodíkové (0,8 ml). Po 30 minutách byly reakce hodnoceny na TLC za použití chloroformu jako mobilní fáze. Ani v jednom případě nebyl identifikován požadovaný produkt.

5.5 Syntéza 2-chlor-6-methylpyridin-3,4-dikarbonitrilu



Syntéza tohoto prekurzoru byla zkoušena třemi způsoby. V prvním případě byl v reakční směsi tetrakynoethylen (100 mg, 0,8 mmol), aceton (2 ml) a koncentrovaná kyselina chlorovodíková (0,8 ml). Dále byla syntéza zkoušena pouze s tetrakynoethylenem (100 mg, 0,8 mmol) rozpuštěným v acetonu a poslední variantou byla směs tetrakynoethylenu (100 mg, 0,8 mmol), acetonu (2 ml) a diethyletherátu fluoridu boritého (57 mg, 50 μ l, 0,4 mmol, 1,15 g/ml). Všechny reakce probíhaly za laboratorní teploty a byly hodnoceny po 48 hodinách pomocí TLC za použití chloroformu jako mobilní fáze. Na desce však nebylo možné identifikovat předpokládaný produkt.

5.6 Syntéza 1,8,15,22-tetrakis(2-hydroxyethylsulfanyl)-3,4,10,11,17,18,24,25-oktamethyltetra(3,4-pyrido)porfyrinátu hořečnatého komplexu (4Mg)



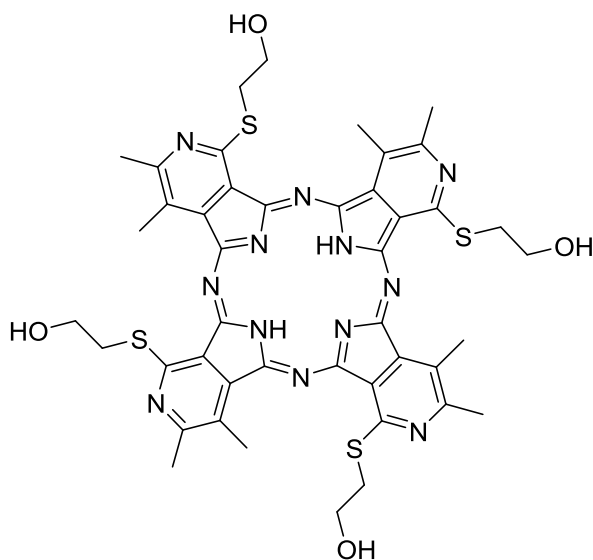
4Mg

Při přípravě komplexu byl nejprve do baňky navážen hořčík (729 mg, 30 mmol), dále byl přidán čerstvě nadestilovaný bezvodý butanol (10 ml) a krystalek jodu. Směs reagovala za teploty varu rozpouštědla pod zpětným chladičem 4 hodiny, poté byl do

reakce přidán prekurzor **2** (989 mg, 4,2 mmol) a reakce probíhala za stejných podmínek dalších 15 hodin. Po ukončení reakce bylo odpařeno rozpouštědlo. Do baňky byla přidána 50% kyselina octová, ve které se rozpustil produkt, a celá směs byla přefiltrována. Kyselina octová byla z filtrátu odpařena a produkt byl promýván acetonem, vodou a THF a to vždy za laboratorní teploty a poté i horkým rozpouštědlem. Dále byl produkt rozpuštěn za laboratorní teploty v malém množství pyridinu a vysrážen přídatkem acetonu. Posledním krokem čištění byla sloupcová chromatografie. Nejprve byl jako mobilní fáze použit methanol, kterým byly vymyty nečistoty, zatímco produkt zůstával na startu. Poté byla mobilní fáze vyměněna za směs pyridin/ethylacetát 3 : 1, ve které se produkt eluoval. Bylo připraveno 167 mg (16 %) pevné, zelené látky rozpustné v 50% kyselině octové, pyridinu a dimethylsulfoxidu (DMSO). Produkt byl charakterizován pomocí IČ a MS spektra a použit pro následnou reakci.

IČ (ATR): ν_{\max} = 2929, 2857, 1557, 1466, 1405, 1330, 1267, 1228, 1184, 1105. MS (MALDI-TOF): m/z 957,2 $[M+H]^+$, vypočítáno pro $C_{44}H_{44}MgN_{12}O_4S_4$: 956,23.

5.7 Syntéza 1,8,15,22-tetrakis(2-hydroxyethylsulfanyl)-3,4,10,11,17,18,24,25-oktamethyltetra(3,4-pyrido)porfyrzinu (4H2)



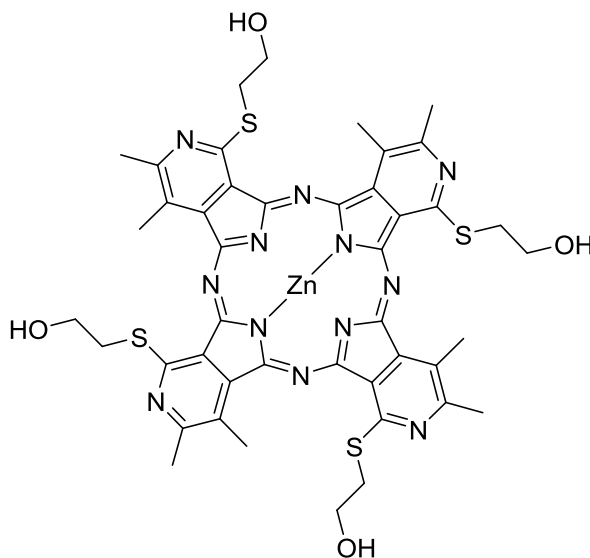
4H2

Komplex **4Mg** (167 mg, 0,17 mmol) byl rozpuštěn v 80% kyselině octové (30 ml) a byla přidána kyselina *p*-toluensulfonová (323 mg, 1,7 mmol). Reakce probíhala za

laboratorní teploty 4 hodiny. Následně byla odpařena kyselina octová a produkt byl promýván vodou a acetonem. Byla připravena pevná, zelená látka, která byla rozpustná v pyridinu a methanolu. Po charakterizaci pomocí MS spekter byl produkt použit pro následnou reakci.

MS (MALDI-TOF): m/z 935,2 $[M+H]^+$, 917,2 $[M-OH]^+$, vypočítáno pro $C_{44}H_{46}N_{12}O_4S_4$: 934,26.

5.8 Syntéza 1,8,15,22-tetrakis(2-hydroxyethylsulfanyl)-3,4,10,11,17,18,24,25-oktamethyltetra(3,4-pyrido)porfyrizináto zinečnatého komplexu (4Zn)



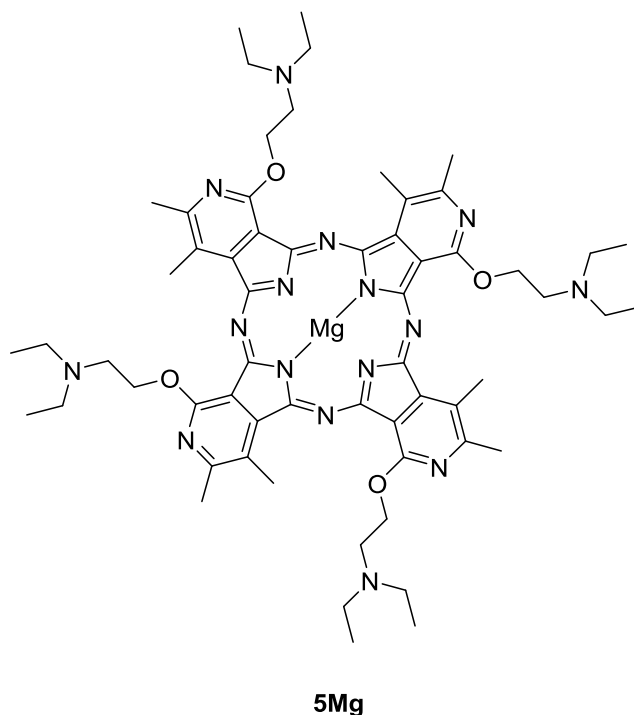
4Zn

Bezkový derivát **4H2** z předchozí reakce byl rozpuštěn v pyridinu (10 ml) a byl k němu přidán octan zinečnatý (329,4 mg, 1,8 mmol). Tato směs reagovala 4 hodiny za teploty varu rozpouštědla pod zpětným chladičem. Po ukončení reakce bylo odpařeno rozpouštědlo a produkt byl promýván vodou, acetonem a po nanesení produktu na silikagel byly nečistoty vymývány také methanolem. Dále byl produkt čištěn sloupcovou chromatografií s mobilní fází pyridin/ethyl-acetát 3 : 1. Bylo připraveno 90 mg pevné, zelené látky. Celkový výtěžek reakce (počítáno na výchozí látku **2**) byl 9 %.

IČ (ATR): ν_{\max} = 2922, 2855, 1553, 1472, 1406, 1266, 1229, 1185, 1109, 1023. UV/VIS (pyridin): λ_{\max} (ϵ) = 739 (170 200), 663 (45 100), 365 (48 000). MS (MALDI-

TOF): m/z 997,1 $[M+H]^+$, vypočítáno pro $C_{44}H_{44}N_{12}O_4S_4Zn$: 996,18. Elementární analýza (%) vypočítáno pro $C_{44}H_{44}N_{12}O_4S_4Zn + 2H_2O$: C 51,08; H 4,68; N 16,25; nalezeno: C 51,76; H 4,52; N 15,56.

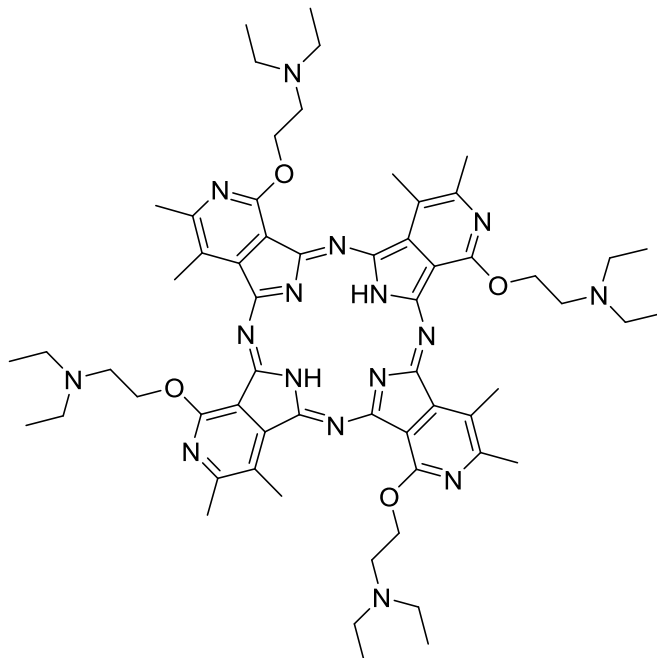
5.9 Syntéza 1,8,15,22-tetrakis(*N,N*-diethylaminoethoxy)-3,4,10,11,17,18,24,25-oktamethyltetra(3,4-pyrido)porfyrinátu hořečnatého komplexu (5Mg)



Na začátku syntézy byl navážen hořčík (207 mg, 8,5 mmol), ke kterému byl přidán čerstvě nadeštilovaný bezvodý butanol (10 ml) a krystalek jodu. Tato reakce probíhala 4 hodiny za teploty varu rozpouštědla pod zpětným chladičem. Poté byl přidán prekurzor **3** (368 mg, 1,2 mmol) a reakce probíhala dalších 15 hodin za stejných podmínek. Po ukončení reakce byl odpařen butanol, produkt byl extrahován do THF a směs byla přefiltrována. Z filtrátu byla odpařena většina rozpouštědla. K zahuštěnému roztoku byl přidán aceton a hexan, přičemž došlo k vysrážení produktu. Sraženina byla odfiltrována a na filtru intenzivně promyta acetonem. Byla připravena zelená pevná látka, která byla rozpustná v ethanolu a chloroformu. Produkt byl charakterizován pomocí MS spektra a použit ihned pro další reakci.

MS (MALDI-TOF): m/z 1040,6 $[M - NC_2H_5]^+$, vypočítáno pro $C_{60}H_{80}MgN_{16}O_4$: 1112,64.

**5.10 Syntéza 1,8,15,22-tetrakis(*N,N*-diethylaminoethoxy)-
3,4,10,11,17,18,24,25-oktamethyltetra(3,4-pyrido)porfyrizin
(5H2)**

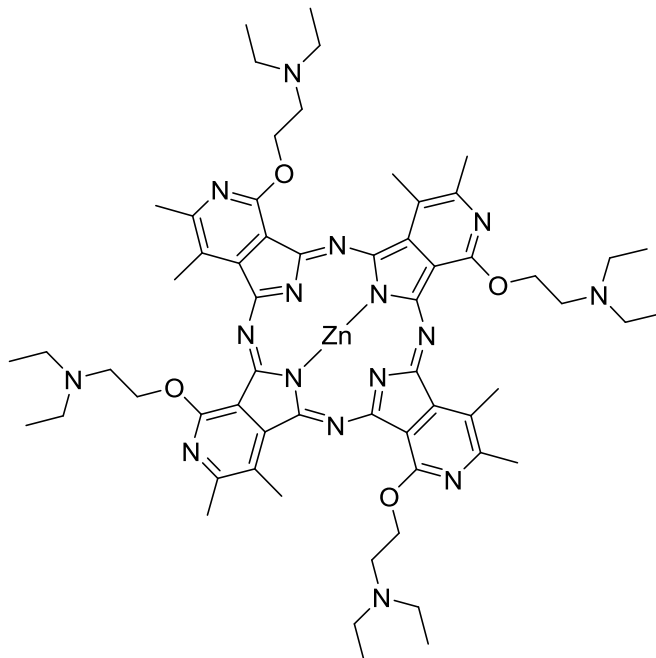


5H2

Produkt z přípravy komplexu **5Mg** výše byl rozpuštěn v 1% kyselině chlorovodíkové (50 ml). Zelený roztok byl dále míchán za laboratorní teploty 2 hodiny. Po ukončení reakce byl produkt z rozpouštědla vysrážen přidáním 10% hydroxidu sodného (cca 5 ml) do bazické reakce a krystalky byly odděleny filtrací a důkladně promyty vodou. Bylo připraveno 70 mg látky rozpustné v chloroformu a částečně také v acetonu. Produkt byl charakterizován pomocí MS spektra a použit do další reakce.

MS (MALDI-TOF): m/z 1091,6 $[M+H]^+$, 1018,5 $[M-NC_2H_5]^+$, vypočítáno pro $C_{60}H_{82}N_{16}O_4$: 1090,67.

5.11 Syntéza 1,8,15,22-tetrakis(*N,N*-diethylaminoethoxy)-3,4,10,11,17,18,24,25-oktamethyltetra(3,4-pyrido)porfyrizináto zinečnatého komplexu (**5Zn**)

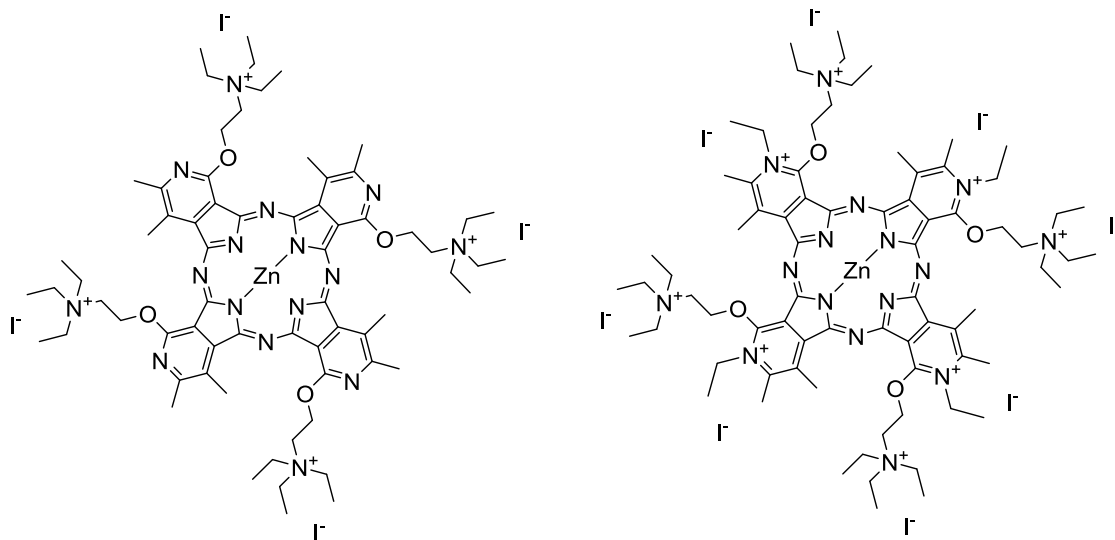


5Zn

Bezkový derivát **5H2** (70 mg, 0,06 mmol) byl rozpuštěn v pyridinu (7 ml). Dále byl přidán octan zinečnatý (110 mg, 0,6 mmol) a 4 hodiny probíhala reakce za teploty varu rozpouštědla pod zpětným chladičem. Po ukončení reakce bylo odpařeno rozpouštědlo a k produktu byla přidána voda, ve které se látka částečně rozpustila. Do směsi byly přidány tři kapky triethylaminu, díky kterým došlo k vysrážení zelených krystalků. Ty byly odděleny filtrací. Dále byly tyto krystalky rozpuštěny v 1% kyselině chlorovodíkové a produkt byl následně vysrážen po přidání 5% hydrogenuhličitanu sodného. Produkt byl také čištěn sloupcovou chromatografií. Jako stacionární fáze byl použit oxid hlinitý. Mobilní fází byla nejprve směs chloroform/THF 3 : 1, pomocí které se z produktu vymyly nečistoty. Následně byla mobilní fáze vyměněna za směs chloroform/methanol 5 : 1, která eluovala produkt. Bylo připraveno 40 mg (54 %) zelené látky mazlavé konzistence. Po charakterizaci pomocí MS spektra byl produkt použit pro další reakci.

MS (MALDI-TOF): m/z 1153,5 $[M+H]^+$, vypočítáno pro $C_{60}H_{80}N_{16}O_4Zn$: 1152,58.

**5.12 Alkylace 1,8,15,22-tetrakis(*N,N*-diethylaminoethoxy)-
3,4,10,11,17,18,24,25-oktamethyltetra(3,4-pyrido)porfyrizináto
zinečnatého komplexu**



5Zn-Et

K zinečnatému komplexu **5Zn** (40 mg, 0,03 mmol) z předchozí reakce byl přidán ethyljodid (3,9 mg, 2 ml, 0,02 mmol, 1,94 g/ml) a *N*-methylpyrrolidon (NMP) (2 ml), ve kterém se rozpustila výchozí látka. Směs reagovala 7 dní za laboratorní teploty v uzavřené baňce. Po ukončení reakce byla směs nalita do diethyletheru, produkt byl odfiltrován a důkladně promyt diethyletherem. Následně byl produkt několikrát přesrážen z nasyceného methanolového roztoku přidáním diethyleteru. Bylo připraveno 50 mg (60 %, počítáno pro oktakationickou látku) zelené látky mazlavé konzistence rozpustné v metanolu. Celkový výtěžek reakce (počítáno z výchozí látky **3**) byl 6 % (pro oktakationickou látku).

IČ (ATR): ν_{\max} = 2933, 1590, 1448, 1380, 1275, 1200, 1131, 1098, 1063, 1002.

UV/VIS (pyridin): λ_{\max} (ϵ) = 716 (44 600), 645 (11 400), 350 (13 100).

Elementární analýza (%)

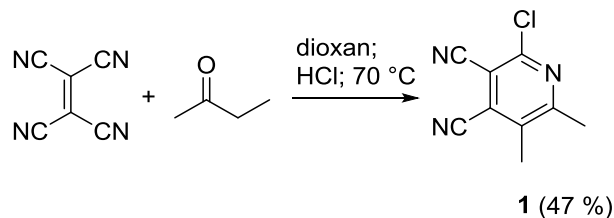
	C	H	N
nalezeno	38,68	5,05	6,98
vypočítáno pro C ₇₆ H ₁₂₀ I ₈ N ₁₆ O ₄ Zn	37,99	5,03	9,33
vypočítáno pro C ₆₈ H ₁₀₀ L ₄ N ₁₆ O ₄ Zn	45,92	5,67	12,6

6. DISKUZE

Tato práce byla zaměřená na syntézu dvou typů tetrapyridoporfyrazinu s hydrofilními substituenty. Dále byly měřeny jejich absorpční spektra a byla zjištěna jejich biologická aktivita. Přípravou látek ze skupiny tetrapyridoporfyrazinů jsme navázali na dřívější práci výzkumné skupiny, kdy se studovaly ftalocyaniny a jejich aza analogy, u kterých byla zaznamenána významná produkce singletového kyslíku a hodnota absorpčního maxima byla vyšší než 680 nm. Látky s těmito vlastnostmi následně vykazovaly velice dobrou fotodynamickou aktivitu na nádorových buňkách při zachování nízké toxicity.³⁵

6.1 Syntéza prekurzoru

Komplexy studované v mé diplomové práci byly připraveny cyklotetramerizací hydrofilně substituovaného prekurzoru. Syntézu jsme začali kondenzací tetrakynoethylenu a 2-butanonu v přítomnosti kyseliny chlorovodíkové, při které vznikal 2-chlor-5,6-dimethylpyridin-3,4-dikarbonitril (**1**)²⁸, který se stal výchozí sloučeninou pro syntézu obou typů hydrofilních prekurzorů (Obrázek 13). Výtěžek této reakce byl 47 %.

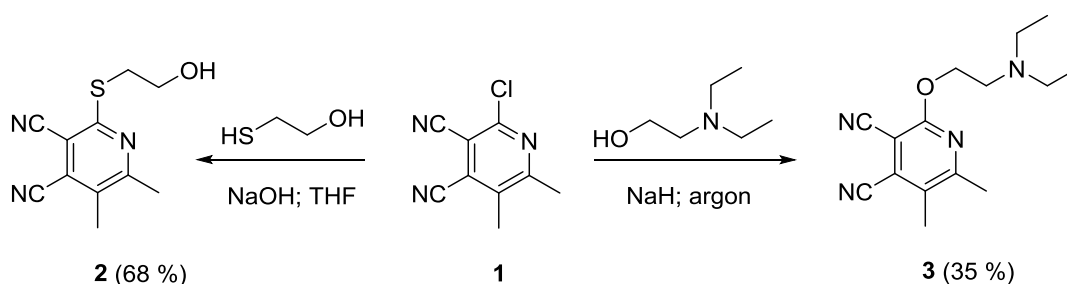


Obrázek 13 Příprava prekurzoru **1**.

V dalším kroku syntézy jsme na prekurzor **1** navázali nukleofilní substitucí požadovaný hydrofilní substituent. V prvním případě jsme použili 2-merkптоethanol rozpuštěný v THF v přítomnosti hydroxidu sodného (Obrázek 14). Pomocí hydroxidu sodného vznikl z 2-merkптоethanolu nukleofilně aktivní thiolát, který poté napadal elektrondeficitní uhlík na pyridinovém cyklu v poloze 2. Takto jsme připravili prekurzor **2** s výtěžkem reakce 68 %.

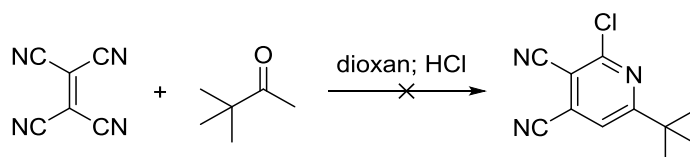
Při přípravě druhého prekurzoru s hydrofilním substituentem jsme nechali reagovat prekurzor **1** s 2-(diethylamino)ethanolem v přítomnosti hydridu sodného (Obrázek 14). Opět se jednalo o nukleofilní substituci, kdy pomocí hydridu sodného vznikl alkoholát, který napadal elektrondeficitní uhlík v poloze 2 na pyridinovém cyklu. Mimo hydrid sodný jsme jako bázi pro vznik alkoholátu nejprve zkoušeli použít také fluorid cesný

(poměr alkohol/báze byl 1 : 1) nebo uhličitan draselný (poměr alkohol/báze byl 1,5 : 2), ale ani v jednom případě nevznikal požadovaný produkt (v prostředí dimethylformamidu (DMF) pod argonem za laboratorní teploty). Reakci jsme také zkoušeli modifikovat použitím různých rozpouštědel. Sledovali jsme reakci v prostředí THF, DMF, DMSO (s hydridem sodným pod argonem za laboratorní teploty, poměr alkohol/báze byl 1 : 1). Nejlépe však reakce probíhala v přebytku 2-(*N,N*-diethylamino)ethanolu, který byl současně použit jako rozpouštědlo. I přes optimalizaci podmínek, byl výtěžek reakce pouze 35 %.



Obrázek 14 Příprava prekurzorů s hydrofilním substituentem.

Při návrhu derivátů tetrapyrrodo-porfyrinů jsme se pokoušeli připravit také prekurzor s objemným *tert*-butylovým substituentem v poloze 6. Objemnost tohoto substituentu by výrazně omezila agregaci finálních makrocyclů, a tím pádem by usnadnila jejich čištění a snížila negativní dopady agregace na fotofyzikální parametry. Postupovali jsme podobně jako při přípravě prekurzoru **1**. Tetrakynoethylen s 3,3-dimethylbutan-2-onem v přítomnosti kyseliny chlorovodíkové jsme nejprve nechali reagovat při 70 °C, produkt ale při této teplotě nevznikal, proto jsme teplotu zvýšili na 130 °C (Obrázek 15). Reakci jsme hodnotili pomocí TLC, kde bylo zřetelné, že výchozí látky již v reakci nejsou, ale na desce nebyla patrná skvrna, která by svým R_f odpovídala požadovanému produktu. Reakci jsme prováděli také v mikrovlnném reaktoru při 70 °C, 120 °C a 170 °C. Požadovaný produkt s objemným substituentem nám ovšem ani v jednom případě nevznikl. Také jsme se pokoušeli připravit prekurzor reakcí tetrakynoethylenu s acetonem. V tomto případě jsme také nebyli úspěšní. Produkt nebyl identifikován, ani když jsme do reakce přidali koncentrovanou kyselinu chlorovodíkovou nebo diethyletherát fluoridu boritého.

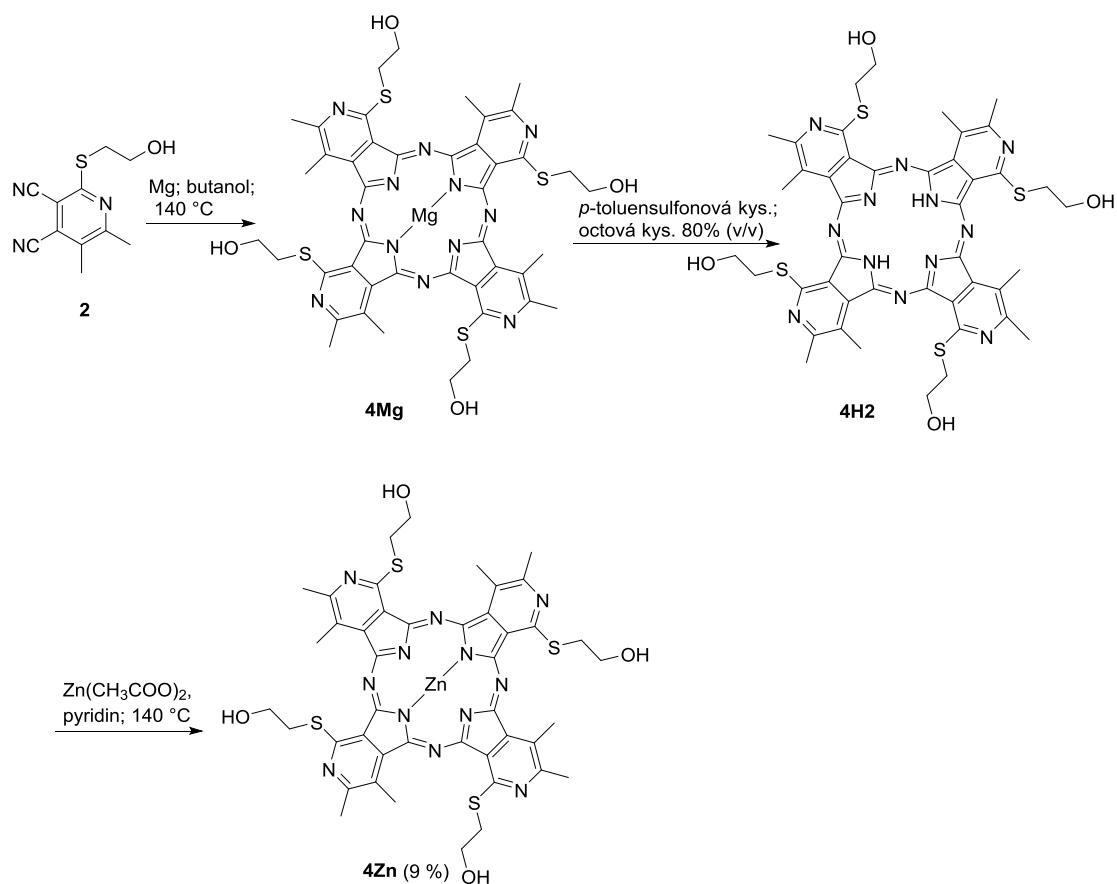


Obrázek 15 Příprava prekurzoru s objemným substituentem.

6.2 Cyklotetramerizace

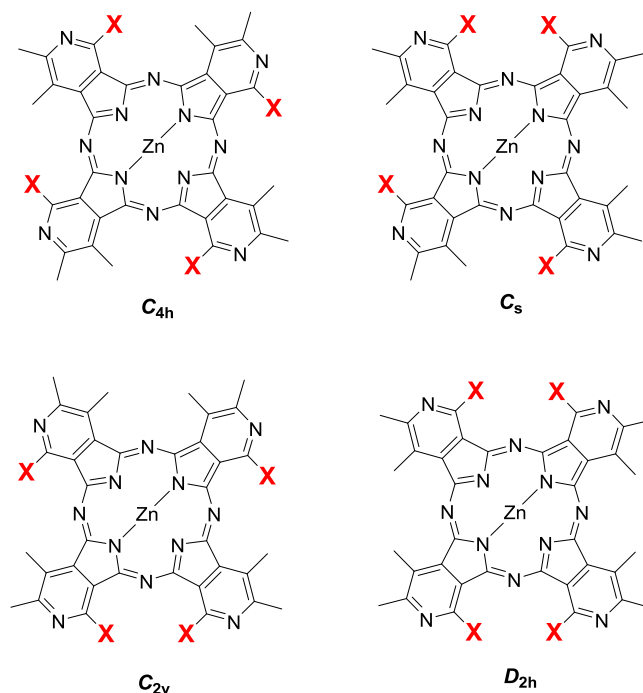
Příprava látek pokračovala cyklotetramerizací. Jedná se o reakci, kdy ze čtyř molekul prekursoru vzniká jedna molekula makrocyklu.⁶

Při cyklotetramerizaci prekursoru **2** jsme k iniciaci reakce použili butanolát hořečnatý (Obrázek 16). Při této reakci typicky napadá alkoholát elektrondeficitní uhlík nitrilové skupiny za vzniku alkykarboximidátu, který dále napadá další nitrilové skupiny a postupně vzniká makrocyklus.⁶ Hořečnatý kation pak zůstává chelatován v centru makrocyklu. V prvním kroku jsme takto připravili hořečnatý komplex **4Mg**, který jsme dále odkovili kyselinou *p*-toluensulfonovou. Odkovení hořečnatých komplexů analogických látek probíhá standardně v prostředí THF.⁶ Naše látka se v THF ale nerozpouštěla, proto jsme při odkovení zvolili prostředí zředěné kyseliny octové. Následně byl do komplexu chelatován zinečnatý kation, protože zinečnaté komplexy mají obecně vyšší produkci singletového kyslíku.⁶ Výtěžek cyklotetramerizace s následným převedením na zinečnatý komplex byl 9 % (počítáno na výchozí látku **2**). Finální látka (**4Zn**) byla hydrofilní, dobře rozpustná v polárních rozpouštědlech (zředěné kyselině octové, pyridinu, DMSO).



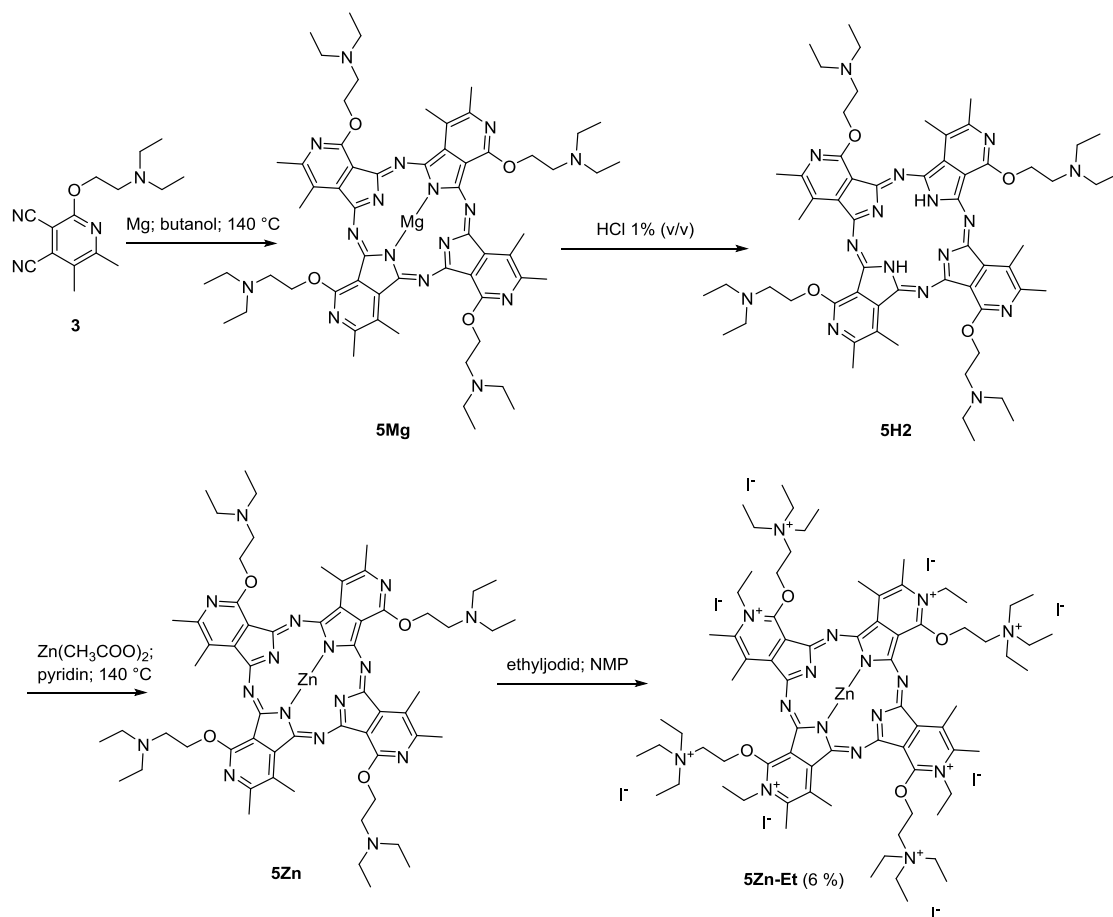
Obrázek 16 Cyklotetramerizace prekursoru **2**.

Díky malé objemnosti periferních substituentů jsme naráželi na problémy s dostatečnou charakterizací kvůli agregaci. Hodnocení výsledků navíc komplikovala přítomnost čtyř potenciálních polohových izomerů (Obrázek 17). NMR spektra nebyla dostatečně průkazná a nejvýraznější charakterizací byla proto hlavně hmotnostní spektra, která vždy potvrdila správnou hmotu produktu. Více charakterizován byl pouze zinečnatý komplex, který byl použit k *in vitro* testům, u hořečnatého a bezkového derivátu byla naměřena pouze MS spektra k potvrzení struktury.



Obrázek 17 Typy potenciálně připravených polohových izomerů.

U cyklotetramerizace prekursoru **3** jsme využili podobný postup. Iniciátorem reakce byl opět butanolát hořečnatý (Obrázek 18). Makrocyclus tedy vznikal pomocí alkoholátu obdobně jako u cyklotetramerizace prekursoru **2**. Připravený hořečnatý komplex **5Mg** byl dále převeden na bezkový derivát **5H2** pomocí kyseliny. Při odkovení jsme ani v tomto případě nemohli využít standardně používané rozpouštědlo (THF), protože by docházelo k precipitaci soli vznikající na periferních aminech a reakce by probíhala v suspenzi. Konverze na bezkový derivát by proto nemusela být kompletní. Z tohoto důvodu byla reakce provedena v prostředí 1% vodné kyseliny chlorovodíkové, která kromě odkovení sloužila i k rozpuštění v roztoku tím, že byla vytvořena sůl na aminech. Následně jsme reakcí bezkového derivátu s octanem zinečnatým připravili zinečnatý komplex **5Zn**. Obdobně jako výše, MS spektra potvrdila správnou hmotu produktů.



Obrázek 18 Cyklotetramerizace prekurzoru **3**.

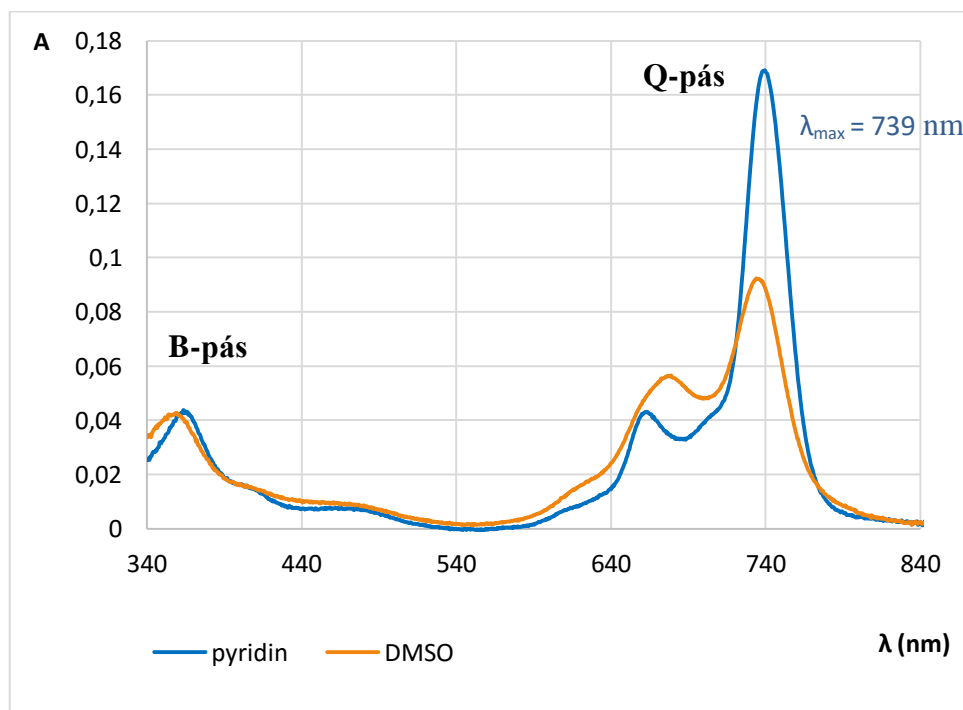
Finální úpravou komplexu **5Zn** byla kvarternizace dusíku na periferním řetězci. Reakce probíhala v prostředí NMP a jako alkylační činidlo jsme použili ethyljodid. Po kvarternizaci mají látky typu ftalocyaninů a jím podobných makrocyclů obecně vyšší rozpustnost ve vodě a nižší tendenci k agregaci na základě elektrostatických odpuzivých sil.¹⁵ V našem případě vznikla látka, která se pouze mírně rozpouštěla ve vodě a dobře v polárních rozpouštědlech, čímž se lišila od výchozí **5Zn**, která byla dobře rozpustná zejména v méně polárních rozpouštědlech. Předpokládáme, že při kvarternizaci této látky došlo k alkylosti nejen dusíku na periferním řetězci, ale i na dusíku pyridinu. Také výsledky elementární analýzy odpovídaly spíše molekule s osmi alkylovanými dusíky, ovšem hodnota pro dusík se i zde lišila o více než 2 %, a proto čistota není zcela uspokojivá. Na základě obdobných výsledků získaných v naší pracovní skupině (alkylace i na pyridinovém dusíku u tetrapyrroldoporfyrinů se silně donorovými aryloxy substituenty) v současné době proto usuzujeme, že se jedná o látku oktaalkylovanou. Při cyklotetramerizaci mohlo také teoreticky dojít k výměně některých periferních substituentů za butoxy skupiny z iniciátoru. NMR spektrum bylo v tomto případě nejednoznačné, ovšem analýza MS spekter tuto výměnu nepotvrdila a u hořčnatého,

bezkovového i zinečnatého komplexu byla přítomna vždy správná hmota. Výtěžek cyklotetramerizace, převedení na zinečnatý komplex a kvarternizace byl 6 % (počítáno na výchozí látku 3).

6.3 Absorpční spektra

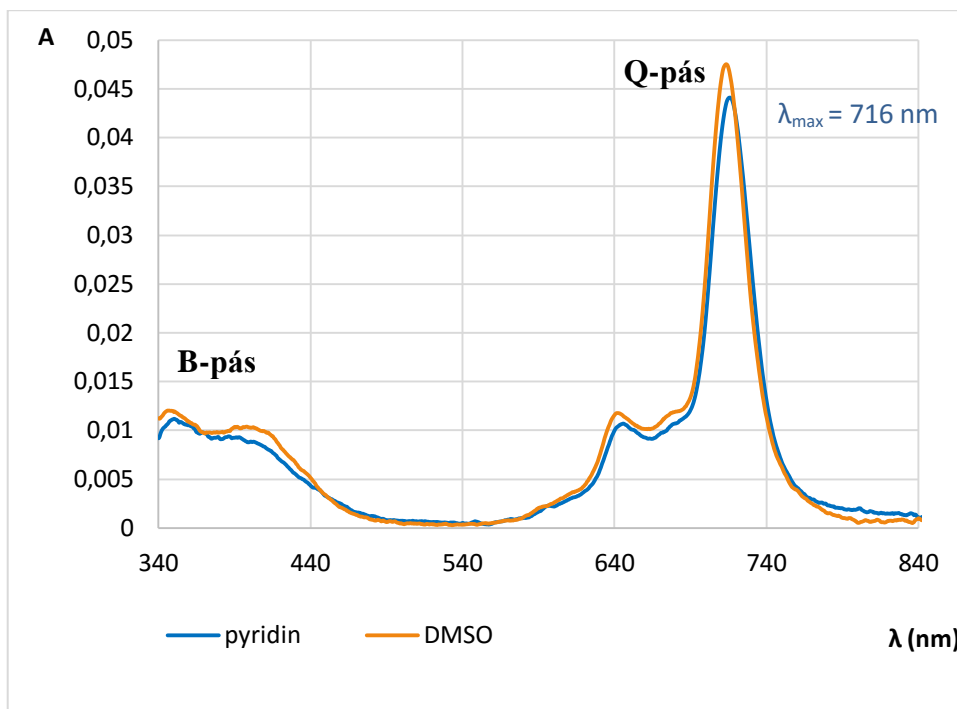
Absorpční spektrum obou finálních tetrapyridoporfyrazinů v monomerním stavu (v pyridinu) vykazovalo dva hlavní pásy, tzv. B-pás při nižších vlnových délkách a Q-pás při vyšších vlnových délkách (Graf 1). Zejména poloha a tvar Q-pásu jsou ovlivněny substitucí na pyridinovém cyklu a případnou agregací.²⁹

Jako rozpouštědla pro měření absorpčních spekter jsme použili pyridin a DMSO. Při měření komplexu **4Zn** jsme dostali dva různé tvary absorpčního spektra (Graf 1). Důvodem rozdílných spekter byla koordinace pyridinu na centrální zinečnatý kationt. Pyridin navázaný na komplex bránil agregaci molekuly, a proto jsme při měření komplexu **4Zn** v pyridinu dostali klasické monomerní spektrum s ostrým a vysokým Q-pásem. V DMSO nedocházelo ke koordinaci na centrální kationt. Vzhledem k tomu, že periferní substituenty byly poměrně malé, molekuly agregovaly a to způsobilo změnu tvaru absorpční křivky (pokles hlavního Q-pásu a zvýšení intenzity absorpce při nižších vlnových délkách okolo 670 nm).



Graf 1 Absorpční spektrum komplexu **4Zn** o koncentraci 1 μ M v pyridinu (modrá) a DMSO (oranžová).

Druhou měřenou látkou byl komplex **5Zn-Et**. U této látky jsme dostali monomerní spektrum v prostředí pyridinu i v prostřední DMSO (Graf 2). Díky elektrostatickým odpuzivým silám periferních substituentů nedocházelo k agregaci ani v jednom rozpouštědle.¹⁵ Absorpční maximum jsme naměřili opět v červené oblasti spektra, konkrétně při 716 nm.



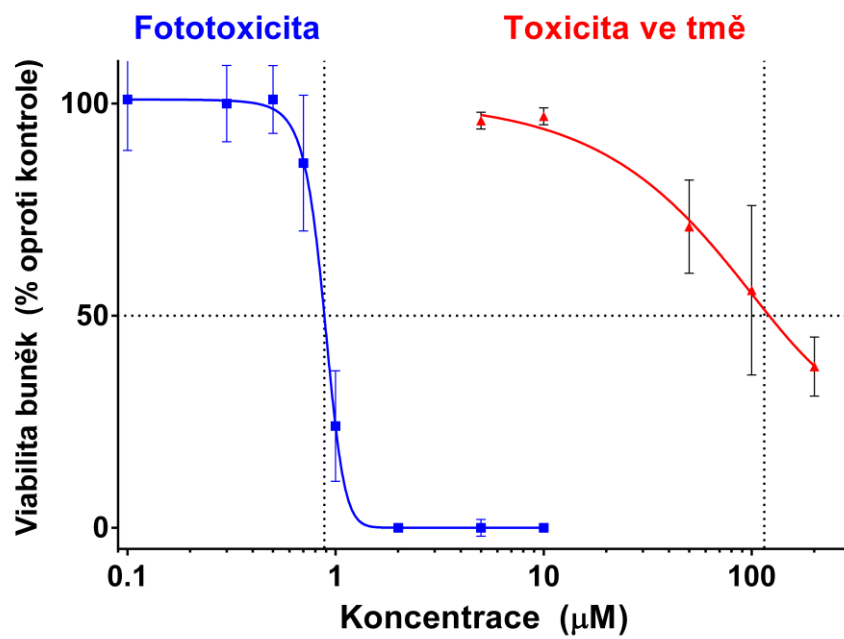
Graf 2 Absorpční spektrum komplexu **5Zn-Et** o koncentraci 1 μM v pyridinu (modrá) a DMSO (oranžová).

U našich dvou látek byl periferní substituent vázán na makrocycklus přes atom s volnými elektronovými páry, které se mohou zapojit do konjugace, a díky tomu došlo k posunutí absorpčního maxima, podobně jak bylo pozorováno u jiných derivátů ftalocyaninů.²⁹ U látky **4Zn** s alkylsulfanylovými substituenty se Q-pás nacházel při 739 nm, u látky **5Zn-Et** s alkoxy substituenty pouze při 716 nm, což odpovídá podobným látkám publikovaným dříve.²⁹

6.4 Biologické hodnocení

Finální látky jsme dále nechali testovat na vlastní toxicity ve tmě (TC_{50}) a fotodynamickou aktivitu (IC_{50}) na katedře biochemických věd Mgr. Miloslavem Macháčkem. Testy probíhaly na HeLa buňkách, které byly pro stanovení fotodynamické aktivity ozařovány za následujících podmínek: $\lambda > 570$ nm, $12,4 \text{ mW cm}^{-2}$, 15 min, $11,2 \text{ J cm}^{-2}$. Obě látky díky tomu, že nebyly dobře rozpustné ve vodě, bylo nutné aplikovat na buňky po zředění zásobního roztoku v DMSO o koncentraci 10 mM. Tento fakt poté limitoval použití maximální testovatelné koncentrace na $100 \text{ }\mu\text{M}$ díky vlastní toxicitě DMSO (netoxický pro HeLa buňky je až 1% roztok DMSO). Experimenty byly prováděny analogicky již publikovaným postupům^{29, 35}.

U látky **4Zn** nebyla zaznamenána žádná fotodynamická aktivita ani toxicita ve tmě až do maximální testované koncentrace $100 \text{ }\mu\text{M}$. Tento výsledek byl pravděpodobně způsoben agregací molekuly, při které komplexy ztrácí fotodynamickou aktivitu.¹⁵ Agregace pro **4Zn** byla pozorována už v DMSO (viz výše) a lze očekávat, že bude ještě silnější ve vodném prostředí. U látky **5Zn-Et**, která neagregovala v DMSO, byly naměřené hodnoty $IC_{50} = 0,869 \pm 0,068 \text{ }\mu\text{M}$ a $TC_{50} = 114,8 \pm 46,39 \text{ }\mu\text{M}$ (Graf 3), což jsou hodnoty srovnatelné s jinými kationickými deriváty ftalocyaninů a jejich aza-analogů (Tabulka 1) s podobným periferním substituentem. Bohužel, i přes tuto dobrou fotodynamickou aktivitu, nelze látku doporučit pro další hlubší testování kvůli nižší čistotě, která může mírně zkreslovat výsledky. Zajímavým zjištěním je fakt, že obě testované látky **4Zn** i **5Zn-Et** produkují v organickém rozpouštědle singletový kyslík ve stejné míře (Tabulka 1). Výrazné rozdíly v jejich fotodynamické aktivitě lze proto přičknout zejména agregaci ve vodném prostředí.

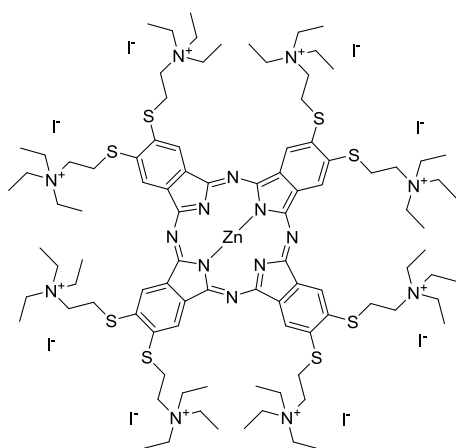


Graf 3 Fototoxicita a toxicita ve tmě komplexu **5Zn-Et** na HeLa buňkách.

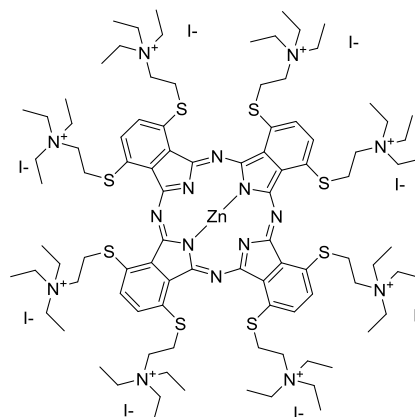
Tabulka 1 Fotofyzikální data kationických derivátů ftalocyaninů a jejich aza analogů.

látka	Φ_{Δ}^a	IC ₅₀ (HeLa) (μM)	TC ₅₀ (HeLa) (μM)	zdroj
4Zn	0,42 ^b	> 100	> 100	-
5Zn-Et	0,43 ^b	0,869 ± 0,068	114,8 ± 46,39	-
6	0,68	0,54 ± 0,090	1639 ± 110	Ref. ³⁵
7	0,91	0,31 ± 0,121	192 ± 14	Ref. ³⁵
8	0,20	3,70 ± 0,192	226 ± 19	Ref. ³⁵
9	0,61	0,26 ± 0,089	105 ± 9,5	Ref. ²⁹

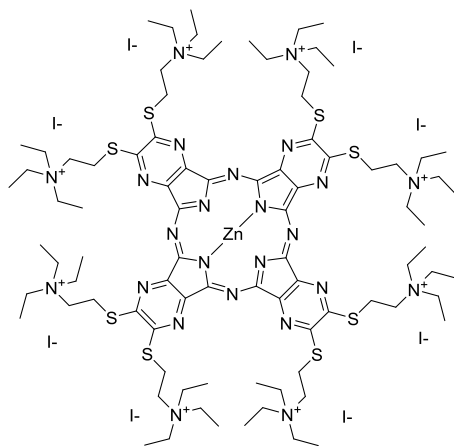
^av DMF. ^bMěřeno na Ústavu fyzikální chemie J. Heyrovského AV ČR (dr. Pavel Kubát) pomocí časově rozlišené fosforescence singletového kyslíku.



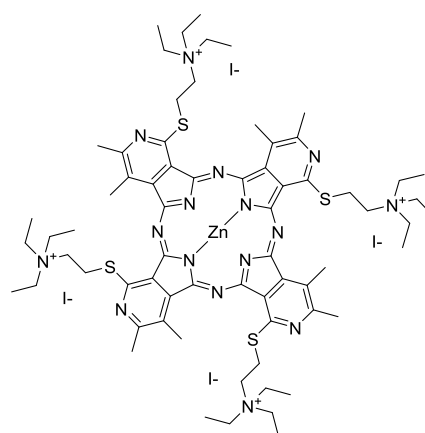
6



7



8



9

7. ZÁVĚR

Cílem mé diplomové práce bylo připravit dva typy derivátů ze skupiny tetrapyridoporfyrasinů s hydrofilními substituenty. V prvním případě u látky s 2-hydroxyethylsulfanylovými substituenty byla připravena látka požadované struktury, která se dobře rozpouštěla v polárních rozpouštědlech (ne ve vodě) díky přítomnosti hydroxylových skupin ve struktuře. U tohoto typu derivátu ovšem nebyla zaznamenána žádná fotodynamická aktivita (maximální testovaná koncentrace byla 100 μM) kvůli vysoké agregaci ve vodném prostředí. U druhého typu obsahujícího triethylammonioethoxy substituenty nebyla přesně určena struktura. Látka byla ovšem mírně rozpustná ve vodě a dobře v DMSO, a nepodléhala v DMSO agregaci. Fotodynamická aktivita této látky byla podobná dříve studovaným ftalocyaninům a jejich aza-analogů.

8. POUŽITÁ LITERATURA

1. ANAND, Sanjay, et al. Biomodulatory Approaches to Photodynamic Therapy for Solid Tumors. *Cancer Lett.*, 2012, 326(1): 8–16.
2. GARG, Abhishek D., et al. Photodynamic therapy: illuminating the road from cell death towards anti-tumour immunity. *Apoptosis*, 2010, 15(9): 1050-1071.
3. BHUVANESWARI, Ramaswamy, et. al. The effect of photodynamic therapy on tumor angiogenesis. *Cell. Mol. Life Sci.*, 2009, 66(14): 2275–2283.
4. DOLMANS, Dennis E. J. G. J.; FUKUMURA, Dai; JAIN, Rakesh K. Photodynamic therapy for cancer. *Nat. Rev. Cancer*, 2003, 3(5): 380-387.
5. AGOSTINIS, Patrizia, et al. Photodynamic therapy of cancer: an update. *CA Cancer J. Clin.*, 2011, 61(4): 250–281.
6. ZIMČÍK, Petr. Azaftalocyaniny – od syntéz přes fotochemické a fotofyzikální vlastnosti k aplikacím. *Chem. Listy*, 2012, 106(4): 275-282.
7. KIM, Miri; JUNG, Haw Young; PARK, Hyun Jeong. Topical PDT in the Treatment of Benign Skin Diseases: Principles and New Applications. *Int. J. Mol. Sci.*, 2015, 16(10): 23259-23278.
8. BUYTAERT, Esther; DEWAELE, Michael; AGOSTINIS, Patrizia. Molecular effectors of multiple cell death pathways initiated by photodynamic therapy. *Biochim. Biophys. Acta. Rev. Cancer*, 2007, 1776(1): 86-107.
9. DEBELE, Tilahun Ayane; PENG, Sydney; TSAI, Hsieh-Chih. Drug Carrier for Photodynamic Cancer Therapy. *Int. J. Mol. Sci.*, 2015, 16(9): 22094–22136.
10. SNYDER, John W., et al. Photodynamic Therapy: A Means to Enhanced Drug Delivery to Tumors. *Cancer Res.*, 2003, 63(23): 8126-8131.
11. REGINATO, Eleonora; WOLF, Peter; HAMBLIN, Michael R. Immune response after photodynamic therapy increases anti-cancer and anti-bacterial effects. *World J. Immunol.*, 2014, 4(1): 1–11.

-
12. HUANG, Ying-Ying, et al. Photodynamic therapy induces an immune response against a bacterial pathogen. *Expert Rev. Clin. Immunol.*, 2012, 8(5): 479–494.
 13. ALLISON, Ron R., et al. Photosensitizers in clinical PDT. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.*, 2004, 1(1): 27-42.
 14. ALLISON, Ron R.; SIBATA, Claudio H. Oncologic photodynamic therapy photosensitizers: A clinical review. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.*, 2010, 7(2): 61-75.
 15. MAKHSEED, Saad, et al. Water-soluble non-aggregating zinc phthalocyanine and in vitro studies for photodynamic therapy. *Chem. Commun.*, 2013, 49(95): 11119-11234.
 16. JUZENIENE, Asta; PENG, Qian; MOAN, Johan. Milestones in the development of photodynamic therapy and fluorescence diagnosis. *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2007, 6(12): 1234-1245.
 17. JOSEFSEN, Leanne B.; BOYLE, Ross W. Photodynamic therapy: novel third-generation photosensitizers one step closer?. *Br. J. Pharmacol.*, 2008, 154(1): 1-3.
 18. YANO, Tomonori, et al. Photodynamic therapy as salvage treatment for local failure after chemoradiotherapy in patients with esophageal squamous cell carcinoma: a phase II study. *Int. J. Cancer*, 2012, 131(5): 1228-1234.
 19. YIN, Rui, et al. Combination ALA-PDT and ablative fractional Er:YAG laser (2,940 nm) on the treatment of severe acne. *Lasers Surg. Med.*, 2014, 46(3): 165-172.
 20. DIRSCHKA, Thomas, et al. Long-term (6 and 12 months) follow-up of two prospective, randomized, controlled phase III trials of photodynamic therapy with BF-200 ALA and methyl aminolaevulinate for the treatment of actinic keratosis. *Br. J. Dermatol.*, 2013, 168(4): 825–836.
 21. HUGGETT, Matthew T., et al. Phase I/II study of verteporfin photodynamic therapy in locally advanced pancreatic cancer. *Br. J. Cancer*, 2014, 110(7): 1698-1704.

-
22. NYST, Heike J., et al. Temoporfin mediated photodynamic therapy in patients with local persistent and recurrent nasopharyngeal carcinoma after curative radiotherapy: a feasibility study. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.*, 2012, 9(3): 274-281.
23. SENGE, Mathias O. mTHPC - a drug on its way from second to third generation photosensitizer? *Photodiagnosis Photodyn. Ther.*, 2012, 9(2): 170-179.
24. MUEHLMANN, Luis A., et al. Aluminum-phthalocyanine chloride associated to poly(methyl vinyl ether-co-maleic anhydride) nanoparticles as a new third-generation photosensitizer for anticancer photodynamic therapy. *Int. J. Nanomedicine*, 2014, 9(1): 1199-1213.
25. BAZYLINSKÁ, Urszula, et al. Nanoemulsion-templated multilayer nanocapsules for cyanine-type photosensitizer delivery to human breast carcinoma cells. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 2012, 47(2): 406-420.
26. MIDDLETON, W. J., et al. Cyanocarbon Chemistry. III. 1 Addition Reactions of Tetracyanoethylene. *J. Am. Chem. Soc.*, 1958, 80(11): 2783-2788.
27. NASAKIN, O. E., et al. Synthesis of substituted pyridines by reaction of tetracyanoethylated ketones with hydrochloric and hydrobromic acids. *Chem. Heterocycl. Comp.*, 1987, 23(5): 541-544.
28. LIPIN, Konstantin V., et al. Three-Component Synthesis of 2-Chloropyridine- 3,4-dicarbonitriles. *Russ. J. Org. Chem.*, 2010, 46(4): 617-618.
29. VACHOVA, Lenka, et al. Heteroatom-substituted tetra(3,4-pyrido)porphyrazines: a stride toward near-infrared absorbing macrocycles. *Org. Biomol. Chem.*, 2015, 13(20): 5608-5612.
30. MAKSIMOVA, V. N., et al. Regioselective reaction of 5,6-dialkyl-2-halopyridine-3,4-dicarbonitriles with ammonia. *Russ. J. Org. Chem.*, 2012, 48(3): 426-429.
31. MØRKVED, Eva H.; OSSLETTEN, Hege; KJØSEN, Helge. Preparation of Octa(alkoxy) Azaphthalocyanines. *Acta Chem. Scand.*, 1999, 53: 1117-1121.

-
32. MAKHSEED, Saad, et al. The synthesis of metal-free octaazaphthalocyanine derivatives containing bulky phenoxy substituents to prevent self-association. *Tetrahedron Lett.*, 2007, 48(41): 7358-7361.
33. NOVAKOVA, Veronika, et al. The synthesis, photochemical and photophysical properties of zinc aryloxy-and alkyloxy azaphthalocyanines. *Dyes Pigm.*, 2010, 87(2): 173-179.
34. MØRKVED, Eva H.; ANDREASSEN, Trygve; BRUHEIM, Per. Zinc azaphthalocyanines with pyridin-3-yloxy peripheral substituents. *Polyhedron*, 2009, 28(13): 2635-2640.
35. MACHACEK, Miloslav, et al. 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.