

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



RIGORÓZNÍ PRÁCE

Syntéza nesymetrických derivátů azaftalocyaninů pro třetí generaci
fotosenzitizérů a jejich prekurzorů

Hradec Králové, 2007

Dana Šlajsová

*Děkuji PharmDr. Petru Zimčikovi Ph.D.,
svému školiteli.*

OBSAH

1. ÚVODNÍ ČÁST.....	6
1.1 ÚVOD	6
1.2 HISTORIE PDT	7
1.3 EXPERIMENTY VEDOUCÍ K ROZVOJI PDT.....	9
1.4 FOTODYNAMICKÁ TERAPIE	10
1.4.1 Funkce fotosenzitizéru	10
1.4.2 Světlo v PDT	10
1.4.3 Role kyslíku v PDT	11
1.5 MECHANISMUS PDT	12
1.6 FOTOSENZITIZÉRY	14
1.6.1 Profil ideálního PDT léčiva.....	14
1.6.2 Generace fotosenzitizérů	15
1.7 CÍL PRÁCE.....	22
2. METODICKÁ ČÁST	23
2.1. AZAANALOGY FTALOCYANINŮ.....	23
2.1.1 Heteroatomy v periferních řetězcích AzaPc.....	24
2.1.2 Centrální atomy AzaPc.....	24
2.2. NESYMETRICKÉ FTALOCYANINY.....	28
2.2.1 Pokroky v přípravě konstitučních isomerů.....	29
2.2.2 Selektivní syntéza konstitučního isomeru ftalocyaninů	30
2.2.2.1 Statistický postup	30
2.2.2.2 Přímý postup	30
2.2.3 Selektivní syntéza nesymetricky substituovaných ftalocyaninů	31
2.2.3.1 Syntéza A ₃ B ftalocyaninů	31
2.2.3.2 Syntéza A ₂ B ₂ ftalocyaninů	34
2.3. JODACE AROMATICKÝCH SLOUČENIN	35
2.3.1 Elementární jod	36
2.3.1.1 Jodace benzenu, jeho homologů a derivátů.....	36
2.3.1.2 Jodace kondenzovaných uhlovodíků.....	37
2.3.1.3 Jodace heterocyklických sloučenin	37
2.3.1.4 Náhrada jiných prvků jodem = nepřímá jodace	38
2.3.2 Chlorjod.....	38
2.3.3 Alkalické jodnany	38
2.3.4 Chloristan jodný	39

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	40
3.1 SYNTÉZA NESYMETRICKÝCH ZINEČNATÝCH KOMPLEXŮ AZAFTALOCYANINŮ	41
3.1.1 Schéma prováděných reakcí	41
3.1.2 Příprava [2,9,10,16,17,23,24-heptakis(<i>terc</i> -butylsulfanyl)-3-(5- karboxypentylamino)-1,4,8,11,15,18,22,25(oktaaza)ftalocyaninato] zinečnatého komplexu	42
3.1.3 Příprava [9,10,16,17,23,24-hexakis(<i>terc</i> -butylsulfanyl)-2-(2-karboxyethylsulfanyl)- 3-methyl-1,4,8,11,15,18,22,25(oktaaza)ftalocyaninato] zinečnatého komplexu	43
3.2 SYNTÉZA PREKURZORŮ ROZŠÍŘENÝCH AZAFTALOCYANINŮ	44
3.2.1 Schéma prováděných reakcí	44
3.2.2 Příprava 1,2-dinitrobenzenu	44
3.2.3 Příprava 1,2-dijod-4,5-dinitrobenzenu	45
3.2.4 Příprava 1,2-diamino-4,5-dijodbenzenu	46
3.2.5 Příprava 1,2-diaminoftalonitrilu	46
4. DISKUSE	48
5. ZÁVĚR	51
6. PŘÍLOHA	52
7. LITERATURA	55

SEZNAM ZKRATEK

AMD	věkově závislá makulární degenerace (z angl. „age-related macular degeneration“)
AzaPc	azaftalocyaniny (z angl. „azaphtalocyanines“)
DBU	1,8-diazabicyklo[5,4,0]undec-7-en
Hp	hematoporfyrin
HpD	derivát hematoporfyrinu
NMR	nukleární magnetická rezonance
PDT	fotodynamická terapie (z angl. „photodynamic therapy“)
PS	fotosenzitizér (z angl. „photosensitiser“)
R _f	retenční faktor
TLC	tenkovrstevná chromatografie (z angl. „thin-layer chromatography“)
DMF	dimethylformamid

1. ÚVODNÍ ČÁST

1.1 ÚVOD

Fototerapie zahrnuje léčbu, kde jev vyvolaný aplikací světla je využit k léčbě nemoci. *Fotochemoterapie* je forma fototerapie, ve které je chemická substance využita jako doplněk k účinku světla. Ve *fotodynamické terapii* (photodynamic therapy – PDT) je společně využíváno působení světla, kyslíku a fotodynamicky aktivní látky¹.

Fotodynamická terapie je slibně se rozvíjející, relativně nová terapeutická metoda určená k léčbě mnoha druhů solidních tumorů. Navíc má potenciál pomáhat při léčbě dalších nezhoubných onemocnění. Účinnost PDT závisí na selektivním hromadění fotodynamicky aktivní sloučeniny v postižené tkáni, kterou chceme léčit, následované ozářením světlem vhodné vlnové délky. Tato vlnová délka musí odpovídat absorpčnímu spektru fotodynamicky aktivní sloučeniny. PDT následně vytvořením reaktivního kyslíku rezultuje v oxidativní poškození buněčných organel. Tento typ poškození podporuje kombinaci biochemických a molekulárních změn, které mají na normální buňku destruktivní účinek. Nekróza a apoptóza jsou významnou součástí PDT – vyvolaného procesu usmrcení buňky².

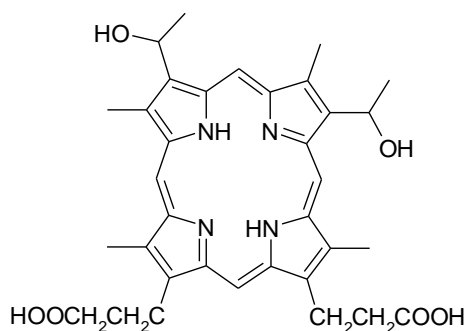
Hlavním cílem každé antikancerózní terapie je selektivita zaměřená na zneškodnění nemocných buněk, zatímco zdravá tkáň zůstává nedotčena. PDT zahrnuje kombinaci fotodynamicky aktivní látky a světla. Každá z těchto složek je sama o sobě neúčinná, ale v kombinaci vedou k zahubení tumorózní buňky³.

1.2 HISTORIE PDT

Zatímco vlastní pojem „fotodynamická terapie“ je relativně nové označení pro binární součinnost světla a fotosenzitizéru, použití světla k léčbě různých onemocnění můžeme vystopovat hluboko v lidské historii. Již 4000 let př.n.l. používali staří Egypťané perorálně podávané rostliny (obsahující světlem aktivované psoraleny) v kombinaci se slunečním zářením k úspěšné léčbě vitiliga⁴. Využití ultrafialového světla a psoralenů k léčbě psoriasis bylo později ve 20. století přijmuto na celém světě⁵.

Novodobá historie PDT odstartovala v roce 1900, kdy Oscar Raab popsal experiment, ve kterém nechal působit akridinové barvivo a světlo na prvoky rodu *Paramecium*. Ukázalo se, že jednobuněčný organismus může být touto kombinací definitivně zahuben⁶. Von Tappeiner se v roce 1903 úspěšně pokusil vyléčit kožní novotvar topickou aplikací eosinu a světla⁷.

V roce 1913 provedl Mayer-Betz zajímavý pokus. Injekčně si aplikoval 200 mg hematoporphyrinu (Hp, obr. 1) a neregistroval žádnou reakci, dokud se nevystavil slunečnímu světlu. Začal trpět otoky a tato senzitivita přetrvávala několik měsíců⁸.



hematoporphyrin

Obr. 1

Roku 1925 Policard objevil schopnost porfyrinů produkovat fototoxický efekt⁹ a jak se později ukázalo, současná PDT používá látky právě této skupiny porfyrinových chromoforů v kombinaci s viditelným světlem. PDT pak byla několik desetiletí zdánlivě zapomenuta, ale myšlenka používat k léčení kombinaci světla a fotosenzitivní látky byla již dobře prozkoumána.

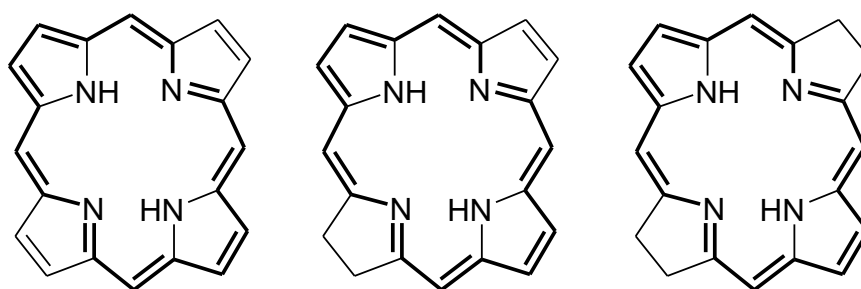
První experiment v moderní éře využití fotosenzitizace pro léčení rakoviny se objevil v roce 1972¹⁰. Richard Lipson, který se zabýval hematoporphyrinovými deriváty (HpD) využitelnými pro detekci tumorů, byl první, kdo skutečně vyléčil pacienta (metastatický nádor prsní strany hrudníku)¹¹. V roce 1975, Dougherty et al. demonstroval, že HpD a světlo z červené oblasti světelného spektra mohou selektivně ničit nádorové buňky bez poškození zdravé tkáně¹².

Problémy s čistotou HpD (připravených Schwartzem v 50. letech 20. století)¹³, jejich absorpční vlnovou délku a opožděná fototoxicita vedly v 80. letech 20. století

k hledání nových sloučenin s lepšími vlastnostmi. Tyto sloučeniny se řadí do druhé a třetí generace fotodynamicky aktivních látek a bude o nich pojednáno dále¹⁴.

PDT se používá také v oblasti léčby věkově závislé makulární degenerace (age – related macular degeneration – AMD), psoriasis, arthritis, a čištění krve od nejrůznějších virů, včetně HIV¹⁵.

V současné době jsou takřka všechny fotosenzitizéry v klinickém zkoušení založeny na tetrapyrrolických makrocyclech (porfyriny, chloriny, bakteriochloriny (obr. 2)) a zdá se, že tetrapyrroly obecně budou i nadále v této oblasti dominovat. V přírodě volně se vyskytující chlorofyly a bakteriochlorofyly jsou deriváty chlorinů, resp. bakteriochlorinů¹⁶.



porfyrin

chlorin

bakteriochlorin

Obr. 2: Struktura porfyrinu, chlorinu a bakteriochlorinu. Zvýrazněné vazby značí 18 π -elektronový [18]-diazulenový systém konjugovaných dvojných vazeb typický pro tyto sloučeniny.

Rozvoj PDT vyžaduje nové účinné fotosenzitizéry s absorpcí v dalekém červeném a blízkém infračerveném světelném spektru a vykazující minimální kožní fototoxicitu. K posílení vývoje nových látek a lepšímu porozumění jejich farmakokinetice a biodistribuci je potřeba objevit cíleně specifické fotosenzitizéry (tzv. „targeting“).

V průběhu posledních dvaceti let zaznamenaly výzkumné aktivity v poli PDT enormní rozvoj. Vzniklo mnoho odborných knih, přehledů a článků zabývajících se problematikou PDT. V současné době vzniká takové množství syntetických látek vhodných pro PDT terapii, že je těžké určit, který z nově objevených fotosenzitizérů se hodí na které patologické indikace¹⁷.

Se snižující se cenou diodových laserů a vzestupem výzkumu nových fotosenzitizérů má PDT potenciál stát se úspěšnou léčebnou metodou¹⁸.

1.3 EXPERIMENTY VEDOUcí K ROZVOJI PDT

Rok a osoba/y experimentu	Pozorování nebo událost
1907 Hausmann	Chlorofyly a světlo způsobují hemolýzu erytrocytů ¹
1919 Hasselbach	O ₂ je nutný k fotohemolýze erytrocytů ¹
1911 Hausmann	Rozsáhlé experimenty s fotosenzitizací myši pomocí hematoporfyrinu (Hp) ¹
1912 Fischer a Mayer-Betz	První studie závislosti aktivity porfyrinů na struktuře ¹
1913 Fischer	Další studie aktivity porfyrinů v závislosti na jejich struktuře ¹
1913 Mayer-Betz	Hp způsobuje fotosenzitivizaci u člověka ¹
1924 Policard	Zjištěná zvýšená kumulace porfyrinů v tumorech ¹
1942 Auler a Banner	Hp nahromaděný v tumoru způsobuje fotonekrózu ¹
1948 Figge et al.	Hp a jeho Zn komplexy se hromadí v myších tumorech ¹
1960 Lipson a Baldez	Poprvé syntetizován HpD ¹
1972 Diamond et al.	První popis PDT léčby s využitím HpD u myši ¹
1975 Dougherty et al.	Úspěšná PDT léčba tumorů krys a myši pomocí HpD ¹
1975 Kelly et al.	Úspěšná PDT léčba lidského nádoru transplantovaného myším za použití HpD ¹
1976 Kelly and Snell	První popis použití HpD v PDT (klinické použití) ¹
1978 Dougherty et al.	První rozsáhlé klinické zkoušky použití HpD v PDT ¹
1993 QLT Inc.	Registrován porfimer sodný pod komerčním názvem Photofrin® a zaveden do klinické praxe k léčbě rakoviny ¹⁹
1999 QLT Inc.	Registrován verteporfin pod názvem Visudyne® a zaveden do klinické praxe k léčbě AMD ¹⁹
2000 DUSA Pharmaceuticals, Inc.	Registrován aminolevulinát pod názvem Levulan® ²⁰
2001 Photocure, ASA	Registrován methylaminolevulinát pod názvem Metvix® ²¹
2001 Biolitec pharma, Ltd.	Registrován temoporfin pod názvem Foscan® ²²
2004 Photocure, ASA	Registrován hexylaminolevulinát pod názvem Hexvix® ²¹
2005 Meiji Seika Kaisha, Ltd.	Registrován talaporfin pod názvem Laserphyrin® ²³

1.4 FOTODYNAMICKÁ TERAPIE

PDT je nejméně invazivní terapií nemocí jako je psoriasis nebo některé typy rakoviny. Zahrnuje tři základní komponenty. Prvním je fotosenzitizér, světloabsorbující molekula, která je aktivována druhým elementem, světlem odpovídající vlnové délky. Třetí složkou je molekulární kyslík, který je využíván v průběhu fotochemické reakce k vytvoření singletového kyslíku-cytotoxického agens, které následně zničí neoplastickou tkáň²⁴.

1.4.1 **Funkce fotosenzitizéru**

Fotosenzitizér (PS) se obvykle podává intravenózně a rychle se distribuuje do tělesných tkání. Po podání je možno zaznamenat znatelný vzestup koncentrace fotosenzitizéru v tumorózní tkáni v porovnání s okolní zdravou tkání²⁵. Důvod selektivního vychytávání („uptake“) fotosenzitizéru je pravděpodobně v nižším intratumorálním pH, zvýšené fagocytóze, zvýšené propustnosti stěny cévní v tumorózní tkáni a zvýšeném množství receptorů pro lipoproteiny (zejména LDL) na buněčné membráně, které jsou schopny navázat fotosenzitizér^{26,27}.

Selektivně absorbovaný fotosenzitizér je ozářen světlem odpovídající vlnové délky, excituje se do vyššího energetického stavu (PS*), ve kterém předává absorbovanou energii kyslíku, jenž produkuje cytotoxické agens. Další mechanismus může být popsán následujícím schématem:



Obecně mechanismus PDT zahrnuje dvě části – fotofyzikální a fotochemické vlastnosti fotosenzitizéru a jeho schopnost produkovat cytotoxické agens je první, druhou pak biologická odpověď buňky vystavené působení cytotoxického agens²⁴.

1.4.2 **Světlo v PDT**

Vlnová délka světla aktivujícího PS je pro použití PDT velice limitující. Světlo o nižších vlnových délkách proniká živými tkáněmi pouze do hloubky několika milimetrů (dochází k pohlcování světla endogenními chromofory, jako je např. hemoglobin) a zasažená oblast je velice malá¹⁴.

Toto je jeden z důvodů, proč se připravují nové PS. Původně do terapie zavedená sodná sůl porfimeru (Photofrin[®]) totiž kromě jiných nežádoucích vlastností má také velice nízkou maximální vlnovou délku vhodnou pro aktivaci – 630 nm. Optimální rozpětí vlnových délek se pohybuje v oblasti 680-800 nm. Další zvyšování nad 800

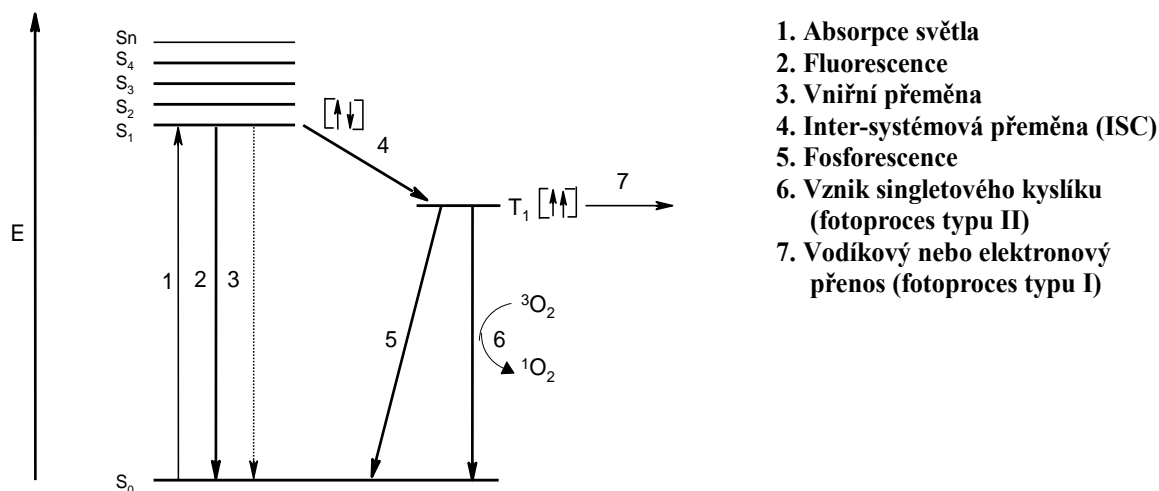
nm pak již není příliš účelné z hlediska nízké energie záření, jež pak nemusí dostačovat k účinné aktivaci PS¹⁴.

1.4.3 Role kyslíku v PDT

Kyslík hraje důležitou roli v PDT. Reaktivní formy kyslíku produkované po ozáření PS (zejména singletový kyslík) jsou hlavními cytotoxickými agens způsobujícím nekrózu a apoptózu postižených buněk. Současně je kyslík také jedním z limitujících faktorů. Tumorózní buňky jsou často špatně zásobeny krví, což vede k lokální hypoxii. Navíc, v průběhu ozařování je hladina kyslíku ve tkáni ovlivněna vaskulárním poškozením způsobeným PDT a produkcí reaktivních druhů kyslíku (čili jeho spotřebováním). Tyto efekty velmi omezují využití PDT proti solidním tumorům v místech, kde musí být zohledněna hypoxie^{28,29}.

1.5 MECHANISMUS PDT

Princip probíhajícího fotofyzikálního procesu, který je podstatou PDT, vysvětluje modifikovaný Jablonského diagram (obr. 3). Popisuje chování typického fotosenzitizéru.



Obr. 3: Modifikovaný Jablonského diagram³⁰

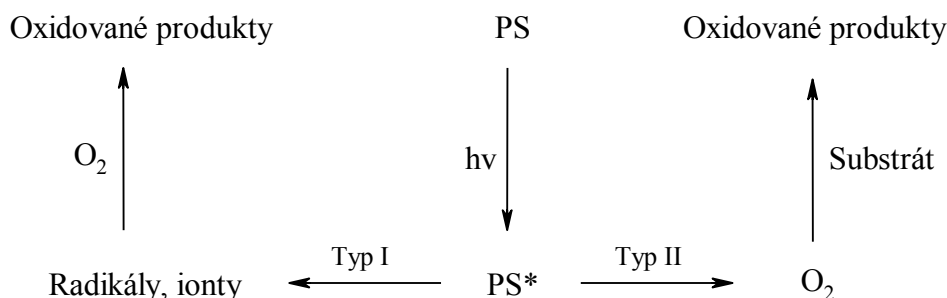
Po absorpci světelného kvanta se PS transformuje ze základního singletového stavu S_0 do excitovaného singletového stavu (S_1)³⁰. Tento stav trvá příliš krátce (v jednotkách nanosekund) na to, aby umožnil efektivní interakci s okolním prostředím a vzhledem k tomu se předpokládá, že zanedbatelně ovlivňuje fotodynamickou aktivitu PS. Z této energetické hladiny se PS může uvolnit několika způsoby²⁴ zahrnujícími procesy jak radiační (**fluorescence**), tak neradiační (vnitřní konverze a tzv. „intersystem crossing“, ISC, cesta 4 na obr. 3).

Při **vnitřní konverzi** dochází ke srážkám s molekulami rozpouštědla a k uvolnění energie ve formě tepla. Někteří autoři považují tento proces také za důležitý při vlastním účinku na buňky³¹.

ISC má zvláštní význam pro PDT. Je to spinem „nepovolený“ proces a vyžaduje inverzi spinu, čímž přeměňuje fotosenzitizér do triplexového stavu (T_1). Každá taková „nepovolená“ cesta je méně pravděpodobná než cesta „povolená“, ale dobrý fotosenzitizér se přeměňuje „nepovolenou“ ISC cestou s vysokou pravděpodobností. Molekula pak může relaxovat z tripletového stavu několika způsoby: může ztrácet energii tzv. triplet-singlet emisí fotonu známou jako **fosforescence** (cesta 5) a bez vyzařování spinovou výměnou s jinou molekulou v tripletovém stavu¹⁴ – tzv. „zhášením“ excitovaného tripletového stavu.

„Zhášecí“ mechanismus T_1 stavu fotosenzitizéru může být rozlišen dle převažující cesty na fotoproces typu I a typu II³² (obr. 4). Oba fotoprocesy se objevují současně a poměr mezi nimi je silně ovlivněn použitým PS, substrátem a koncentrací kyslíku.

Všeobecně se přijímá, že fotoproces typu II, při němž vzniká singletový kyslík, je zejména odpovědný za vlastní fotodynamický účinek³³.

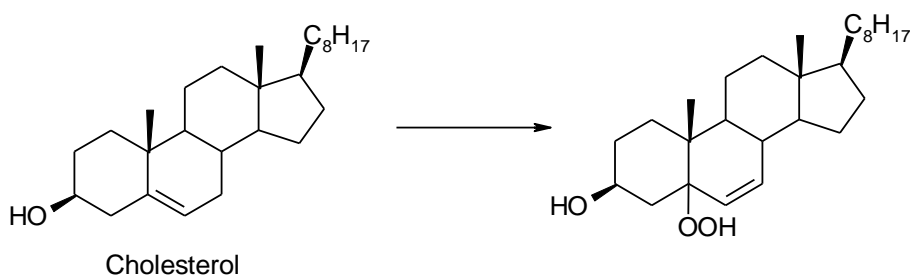


Obr. 4

Typ I – je proces odštěpení vodíku nebo transfer elektronu mezi excitovaným stavem fotosenzitizéru a substrátem, rozpouštědlem anebo jiným fotosenzitizérem a vytvoření radikálů a radikálových iontů. Tyto radikály jsou velmi reaktivní a mohou interagovat s molekulárním kyslíkem a vytvořit reaktivní formy kyslíku, jako je např. superoxidový anion.

Typ II – je proces přenosu energie z tripletového stavu fotosenzitizéru na základní stav molekulárního kyslíku (¹O₂). Díky své vysoké reaktivitě může singletový kyslík reagovat s velkým množstvím biologických substrátů, způsobovat oxidativní poškození a buněčnou smrt²⁴.

Singletový kyslík je velmi reaktivní agens s poločasem existence ve vodě okolo 4 mikrosekund. S biologickým substrátem reaguje několika způsoby, např. oxidace (obr. 5) a cykloadice (obr. 6). Všechny tyto reakce razantně poškozují biologické procesy^{28,29}.



Obr. 5



Obr. 6

1.6 FOTOSENZITIZÉRY

Fotosenzitizéry jsou látky schopné absorbovat světlo specifické vlnové délky a transformovat jej na energii. V případě PDT toto zahrnuje v konečné fázi produkci letálních cytotoxických agens. Existují stovky přírodních i syntetických barviv, jež mohou fungovat jako PS v PDT. Klíčovou charakteristikou jakéhokoliv PS je jeho schopnost preferenční kumulace v nemocné tkáni s následnou produkcí cytotoxických produktů a indukci požadovaných biologických efektů³⁴.

1.6.1 Profil ideálního PDT léčiva

Byly formulovány určité vlastnosti ideálního PS, a i když je naprosto zřejmé, že žádná z látek se nemůže za ideální považovat, lze u novějších látek hovořit alespoň určitém přiblížení se onomu ideálnímu PS³⁵.

Profil ideální látky pro PDT může být sestaven za použití obecných principů a obecných zásad syntézy a marketingu jakéhokoliv léčiva. Jak se ukáže na následujících příkladech, některé aspekty profilu, jako třeba vlnovou délku absorpčního spektra, lze předpovědět poměrně snadno, zatímco jiné, např. farmakokinetický profil, je mnohem těžší odhadnout¹⁴.

Vlastnosti ideálního fotosenzitizéru

- Silná absorpce v červené oblasti viditelného spektra (s vyšší vlnovou délkou světla roste schopnost penetrace tkáněmi, ale klesá jeho energie a tím schopnost excitovat fotosenzitizér)¹⁸; 680 – 800 nm je rozmezí vlnové délky, kde penetrační schopnosti světla jsou maximální a energie je stále dostačující pro účinnou produkci singletového kyslíku³⁵
- Velké množství produkovaného tripletového stavu fotosenzitizéru
- Velké množství produkovaného singletového kyslíku¹⁸
- Minimální toxicita ve tmě – PS by měl být toxický pouze po ozáření světlem vlnové délky vhodné pro aktivaci. Bez této aktivace jsou jeho jiné biologické účinky považovány za nežádoucí³⁵
- Selektivní hromadění fotosenzitizéru v tumorózní tkáni
- Jednoduchá příprava fotoaktivní látky
- Krátký biologický poločas fotoaktivní látky v těle
- Možnost snadné záměny postranního řetězce k zajištění modifikace výše uvedených, zejména farmakokinetických vlastností
- Snadná syntéza z běžně dostupných výchozích látek; snadná aplikace do průmyslové výroby

- Fotoaktivní látka by měla produkovat fluorescenci kvůli vizuální kontrole. Vhodné látky by za použití fluorescenční mikroskopie mohly být využity ke značení subcelulárních struktur¹⁸
- Chemická čistota (zjednodušuje určení závislosti dávka-účinek, doby mezi podáním léčiva a ozářením stejně jako celkové množství záření)¹⁸

Jednou z obecných vlastností barviv, a tudíž i PS, je tzv. „photobleaching“ neboli vyblednutí. Ve fotobiologii a fotochemii je definován jako ztráta intenzity absorpce či emise způsobená světlem. U barviv dochází působením světla k chemickým změnám (ať už fotoadící, fotocyklizací, ireverzibilní fotoredukci nebo nejčastěji oxidací)³⁶, v jejichž důsledku dochází k narušení chromoforu. Důsledkem pro PDT je to, že PS už poté neabsorbuje světlo, kterému je tak umožněno proniknout do hlubších vrstev. Na druhou stranu ovšem rozložený PS je již neaktivní a nemůže vykazovat žádné cytotoxické vlastnosti¹⁴.

1.6.2 Generace fotosenzitizérů

V současnosti známé fotosenzitizéry lze rozdělit do tří generací. První generaci tvoří pravděpodobně pouze HpD a vyznačuje se některými nevýhodnými vlastnostmi, kvůli nimž byly připraveny látky druhé generace. Kromě látek odvozených od porfyrinů sem patří látky jiných chemických struktur. Třetí generaci tvoří PS generace druhé spojené s některými biomolekulami, umožňujícími tak cílenější biodistribuci v těle³⁵.

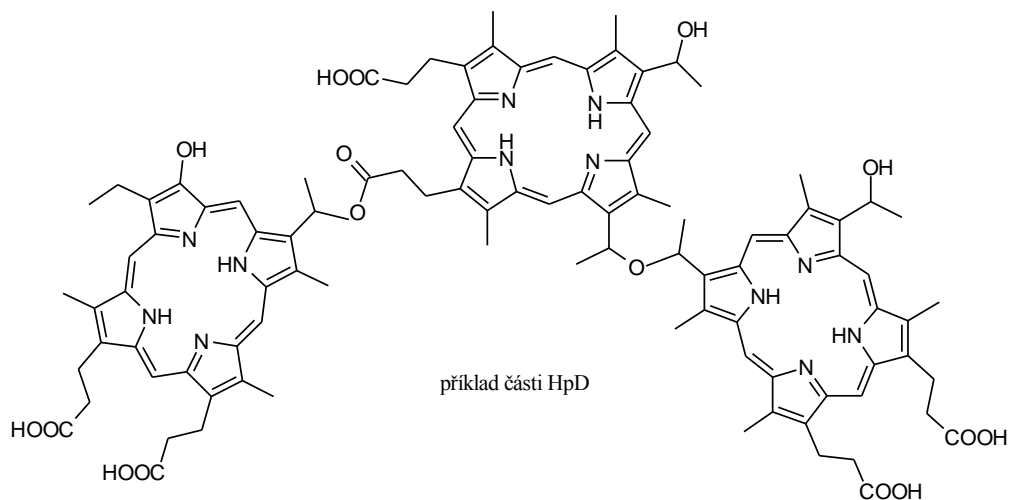
První generace

HpD (porfimer sodium, Photofrin[®], Photohem[®], Photosan[®])

HpD (z angl. Hematoporphyrin derivate) je směs produktů vzniklých přípravou z hematoporphyrinu izolovaného nejprve z hemu. Jedním z těchto derivátů je např. Photofrin II[®] připravený Doughertym³⁷, který se po dalších úpravách dostal do klinické praxe jako Photofrin^{®38}. Je to oligomer hematoporphyrinu (Hp), protože bylo zjištěno, že za vlastní PDT efekt není zodpovědný samotný Hp, ale že to jsou oligomerní frakce (obr. 7), které vznikají při izolaci z krve. Délku tohoto oligomerního řetězce je těžké přesně určit. Tyto frakce byly Schwartzem později obohaceny na úkor monomerů¹³ působením kyseliny sírové v prostředí kyseliny octové a následnou neutralizací hydroxidem sodným. Toto vede ke složité směsi dimerů a oligomerů, jejichž jednotky jsou pospojovány buď esterovými, nebo éterovými vazbami. Tato směs byla dále částečně vyčištěna pomocí gelové chromatografie a stala se základem Photofrinu[®]. Ten byl vyvinut firmou QLT PhotoTherapeutics (Vancouver, Kanada) a poprvé zaveden k léčbě rakoviny močového měchýře v roce 1993 v Kanadě jako první látka v PDT. V roce 2000 byla

práva k Photofrinu[®] prodána firmě AxcanPharma (Montreal, Kanada), která jej v současnosti prodává.

Touto látkou se PDT etablovala na poli léčby zhoubných nádorů hned vedle chirurgie a chemo- a radioterapie.



Obr. 7

Photofrin[®] má ovšem několik nevýhodných vlastností. Za prvé je to velice nízká vlnová délka vhodná pro aktivaci – 630 nm – a velice nízký extinkční koeficient při tomto maximu ($1170 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), a proto je potřeba vysokých dávek jak PS, tak světla. I po vyčištění stále sestává ze směsi asi 60 látek, a tudíž je velmi složité reprodukovat přesně jeho složení. Také vychytávání v nádorech není příliš selektivní a jeho vysoké koncentrace lze nalézt v játrech, ledvinách, slezině a zejména v kůži³⁹. Photofrin[®] i přes veškeré výše uvedené nežádoucí vlastnosti stále zůstává nejrozšířenějším PS a byl už zaveden v mnoha zemích do klinické praxe k léčbě prekanceróz i vlastních kanceróz^{34,40}. Fotodynamická terapie Photofrinem[®] je indikována u rakoviny jícnu, bronchiálního karcinomu, vysokého stupně dysplazie spojené s Barrettovým jícnem a také u karcinomu močového měchýře (léčba druhé volby)⁴¹.

Používají se také deriváty Photofrinu[®]. Například v Rusku byl akceptován Photohem[®] k léčbě rakoviny kůže, prsu, jícnu, plic, hrtanu a žaludku. Také se používá k léčbě psoriázy a jako profylaxe zákalu korneálního štěpu³⁴.

Klinické studie fotodynamické terapie Photofrinem[®]⁴¹

A) Karcinom jícnu

Do této multicentrální studie bylo vybráno 17 pacientů s kompletní obstrukcí jícnu (stupeň 4 až 5 závažnosti dysfagie). Pacienti podstoupily jednorázovou terapii - pomalou intravenózní infuzi Photofrinu[®] (2mg/kg) po dobu 3-5 minut s následným ozářením světlem o vlnové délce 630 nm 40 – 50 hodin po infuzi.

Pro zhodnocení výsledků terapie bylo vytvořeno několik stupňů závažnosti podle rozsahu dysfagie před začátkem léčby:

stupeň 1 = normální polykání bez obtíží

stupeň 2 = obtíže při polykání některých tuhých potravin

stupeň 3 = neschopnost polykat jakékoliv tuhé a polotuhé potraviny

stupeň 4 = obtíže při polykání tekutin

stupeň 5 = neschopnost polykat sliny

Výsledky terapie ukazuje tabulka:

	Klinicky významné zlepšení
	11 (65,0 %)
Úplné odstranění nádoru	3 (17,6 %)
Zlepšení dysfagie ze stupně 5 na stupeň 1	2 (11,8 %)
Zlepšení dysfagie o dva a více stupňů	6 (35,3 %)

B) Endobronchiální karcinom

Do randomizované, multicentrální studie bylo zařazeno 102 pacientů s pátým až šestým stupněm závažnosti symptomů (dyspnoe, kašel, hemoptýza). Pacientům byla aplikována jednorázová pomalá intravenózní infuze Photofrinu[®] (2mg/kg) 3-5 minut s následným ozářením světlem o vlnové délce 630 nm 40 – 50 hodin po infuzi.

Zlepšení stavu pacientů po terapii je zaznamenáno v tabulce:

	Počet pacientů	Zlepšení po týdnu	Zlepšení po měsíci
Bronchiální obstrukce	102	50%	60%
Jakékoli symptomy	89	25%	40%
Dyspnoe	60	15%	23%
Kašel	63	6%	24%
Hemoptýza	24	58%	79%

C) Dysplazie Barrettova jícnu

V multicentrální, částečně zaslepené, randomizované studii bylo 208 pacientů, kteří byli randomizováni v poměru 2:1 do dvou skupin. V první skupině bylo 138 pacientů, kteří byli léčeni fotodynamickou terapií Photofrinem[®] - pomalou intravenózní infuzí Photofrinu[®] (2mg/kg) 3-5 minut a následným ozářením světlem o vlnové délce 630 nm) 40 – 50 hodin po infuzi a současně omeprazolem (20 mg dvakrát denně. Druhá skupina zahrnovala 70 pacientů léčených pouze omeprazolem (20 mg dvakrát denně).

Výsledky terapie jsou v tabulce:

	PDT + omeprazol	Omeprazol
Počet pacientů	138	70
Ablace všech ploch vysokého stupně dysplazie	106 (76,8 %)	27 (39,6 %)

Druhá generace

Látky druhé generace jsou již chemicky jednotné a snadno charakterizovatelné. Mají posunuté absorpční maximum k vlnovým délkám kolem 650-800 nm a tudíž lze tyto PS aktivovat světlem pronikajícím hlouběji do tkání. Používané látky patří jak do skupiny porfyrinů nebo např. ftalocyaninů, texafyrinů, porfycenů a dalších. Porfyrinům jsou velice příbuzné chloriny a bakteriochloriny, které mají o jednu (chloriny) případně dvě (bakteriochloriny) konjugované vazby v makrocyclickém systému méně (viz obr. 2)³⁵.

Verteoporfin (BPD-MA, Visudyne™)

Tato látka je benzoporfyrinový monokarboxyderivát (BPD-MA, obr. 8), sloučenina ze skupiny chlorinů. Je velice rychle absorbována nádorovou tkání, avšak i velice rychle vylučována jak z těchto tkání, tak z těla (kožní senzitivita přetrvává jen pár dní)⁴². Největších úspěchů ovšem firma QLT PhotoTherapeutics dosáhla s tímto PS v oftalmologii. Od uvedení na trh v prosinci roku 1999 je dnes tato látka registrována již v 71 zemích (mimo jiné i v ČR) pod obchodním názvem Visudyne™. Používá se k terapii senilní makulární degenerace (AMD)³⁴. Ze čtyř klinických testů týkajících se oftalmologie je možné vidět úspěch v kombinaci verteoporfinu a triamcinolonu. Též je plánováno zkoušení kombinace verteoporfinu a antivaskulárního endoteliálního růstového faktoru¹⁹.

Temoporfin (mTHPC, Foscan®)

Temoporfin - tetra(*meta*-hydroxyfenyl)chlorin (mTHPC, obr. 9), další zástupce ze skupiny chlorinů, byl syntetizován již v roce 1989 jako součást série porfyrinů, ze které se ukázal být nejúčinnější⁴³. Jeho absorpční spektrum není velmi posunuto k červené oblasti (652 nm), avšak extinkční koeficient je při tomto maximu asi 10× vyšší než u Photofrinu®. Pro dostatečný účinek jsou proto potřebné velice malé dávky jak PS (cca 0,1 mg kg⁻¹), tak i světla, což ho činí asi 100× účinnějším než je Photofrin®. Farmakokinetické parametry ovšem nejsou tak pozitivní. Selektivita vychytávání mezi nádorovou a zdravou tkání je poměrně malá (poměr nádorová/zdravá tkáň asi 1,3-2,9). Také poměrně dlouho přetrvávající kožní fotosenzitivita (cca 2-3 týdny) pacienty omezuje⁴⁴. I přes nepříznivé farmakokinetické parametry byl pod komerčním názvem Foscan® v Evropě zaveden v říjnu 2001³⁴. Používá se k paliativní léčbě pacientů s rakovinou hlavy a krku rezistentní k jiným terapiím a u těch, u kterých nelze provést radioterapii a systematickou chemoterapii²².

Rostaporfin (Tin etiopurpurin, SnET2, Purlytin®)(obr. 10)

Tato látka patřící do skupiny metalochlorinů (má uprostřed chelatovaný kation cínu) má silné absorpční maximum (při 660 nm), ale přesto pro účinnou terapii jsou potřebné vysoké dávky světla (srovnatelné s Photofrinem®)⁴⁵. Rostaporfin je testován firmou Miravant Medical Technologies jako prostředek k léčbě AMD a třetí fáze klinických zkoušek je již pro tuto aplikaci ukončena⁴⁶.

Talaporfin (NPe6, MACE, Laserphyrin[®])

Talaporfin (mono N-aspartyl chlorin e6, obr. 11) je další sloučenina ze syntetických chlorinů a také má silnou absorpci při vyšších vlnových délkách. Podobně jako verteporfin se z tkání rychle vylučuje a také k ozáření dochází po 4 hodinách po intravenózní aplikaci⁴⁷. V Japonsku se používá jako registrovaný lék k léčbě kolorektálních jaterních metastáz²³.

Motexafin lutecium (Antrin[®])(obr. 12)

Tato sloučenina patří již do jiné chemické skupiny než předchozí látky příbuzné porfyrinům. Jedná se o derivát texafyrinu (s charakteristickým pětiusíkatým makrocyclickým cyklem) a s centrálně chelátovaným atomem lutecia. Mezi jeho velké výhody patří silná absorpce při dlouhé vlnové délce 732 nm a dobrá selektivita pro maligní tkáň. Je také rychle vylučován z krevní plazmy⁴⁸. Byl registrován pod komerčním názvem Antrin[®] a byl testován k fotoangioterapii⁴⁹.

Motexafin gadolinium (Xcytrin[®])

Tato látka je příbuzná předchozí, sloučenině má malou molekulu a především se vyznačuje novým mechanismem účinku. V tomto případě se nejedná o PS a mechanismus účinku není založen na PDT. Akumuluje se selektivně v nádorových buňkách a snižuje jejich metabolismus. Je schopna také v rakovinné buňce vyvolat apoptózu narušením redukčně-oxidačních cest metabolismu buňky – tím že inhibuje enzym thio-redoxin-reduktázu, který je promotorem nádorového bujení. Má paramagnetické vlastnosti, je tedy detekovatelná v nádoru magnetickou rezonancí. Jeho potenciální indikace směřují k léčbě metastáz v mozku u rakoviny plic⁴⁹.

Ftalocyaniny (Pc4, Photosense)

Ftalocyaniny (obr. 13) jsou další velice nadějnou skupinou PS. S posunutou maximální vlnovou délkou absorpce směrem k červené části spektra (670-700 nm) a zesílenou absorpcí při této vlnové délce (ϵ až $200000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) jsou velice perspektivními PS do budoucnosti. Důležité pro vlastní PDT účinek je přítomnost chelátovaných centrálních kovů a polokovů, z nichž některé prodlužují trvání tripletového stavu PS, a tím i zvyšují jeho účinnost v PDT (např. Zn, Al, Si).

Nevýhodou některých ftalocyaninů je jejich velice špatná rozpustnost nejen ve vodě, ale i organických rozpouštědlech a z toho poté vyplývající problémy s aplikací. Toto však lze překlenout ať již modifikací na periférii nebo např. inkorporací do lipozómů⁵⁰.

5-Aminolevulinová kyselina (ALA, Levulan[®], Metvix[®], Hexvix[®])

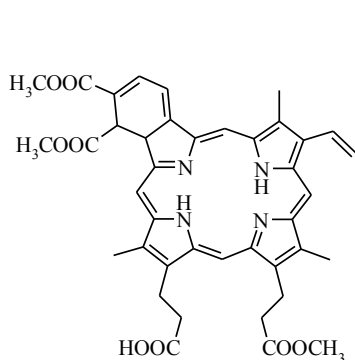
Poněkud jiným přístupem v PDT je použití ALA. Jedná se o endogenní látku, která je součástí biosyntetické cesty hemu. Při exogenním podání ALA dochází ve větší míře k syntéze protoporfyrinu IX (PpIX), který poté funguje jako účinný PS³⁵.

Vzhledem k nízké lipofilitě ALA se do terapie dostávají také její estery, které lépe pronikají do tkání a po hydrolýze uvolňují ALA.

Metvix[®] je komerční název pro methylester ALA, který byl zaveden v roce 2001 k topické léčbě aktinoidní keratinózy, karcinomu bazálních buněk kůže, akné^{20,21}.

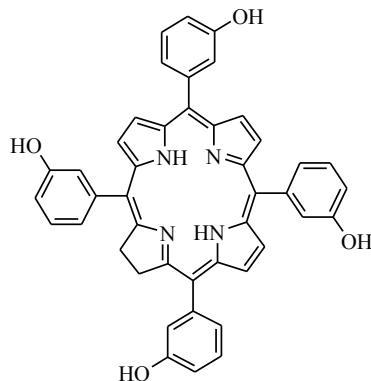
Hexvix[®] je hexyl ester kyseliny 5-aminolevulinové. Byl vyvinut pro fotodetekci rakoviny močového měchýře. Roztok Hexvixu se aplikuje katetrem do močového

měchýře přibližně 30-60 minut před vyprázdněním. Látka přechází do stěn a po hydrolýze na ALA se kumuluje v rakovinových ložiscích. Po syntéze protoporfyrinu IX z ALA se močový měchýř ozáří modrým světlem, ložiska poté červeně fluoreskují. Další aplikace, které se připravují jsou z oblasti gynekologie (detekce a léčba rakoviny cervixu a vulvy). Je to první farmaceutický produkt na trhu, který dovoluje vizuální sledování karcinomu močového měchýře²¹.



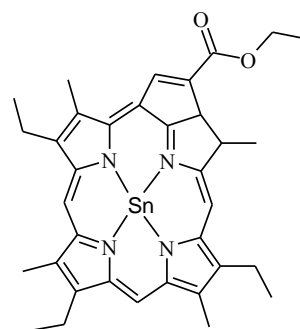
verteporfin

Obr. 8



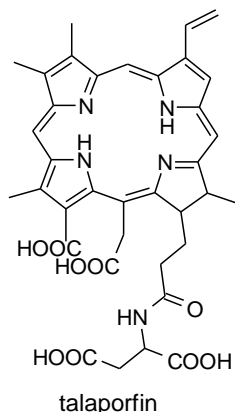
temoporfin

Obr. 9



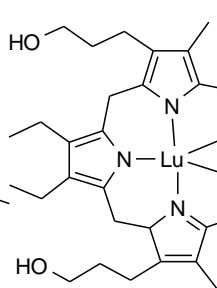
rostoporfin

Obr. 10



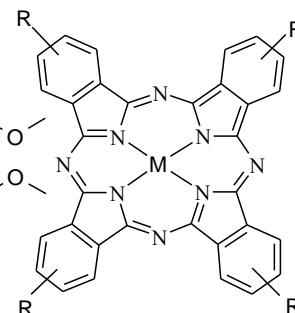
talaporfin

Obr.11



motexafin lutecium

Obr. 12



ftalocyanin

Obr. 13

Výše zmíněné látky patří mezi hlavní, ovšem ne jediné PS, jež se používají nebo jsou ve stadiu klinického zkoušení. Ve výzkumu je řada dalších látek, ať již přírodního charakteru nebo syntetických³⁵.

Další fotosenzitizéry:

Methylénová modř – tento derivát fenothiazinu byl používán švýcarským a německým Červeným křížem k dekontaminaci čerstvě zmražené plazmy⁵¹. Účinně inaktivuje extracelulárně přítomné viry a je prakticky netoxická pro člověka³⁴.

Rhodaminy – jsou v buňkách specificky vychytávány mitochondriemi a jsou používány jako fluorescenční barviva vzhledem k vysoké produkci fluorescence (např. TAMRA[®]). Toto je ovšem z hlediska PDT nevýhodné. Tento problém lze alespoň částečně řešit substitucí těžkými atomy (např. bromem), které posouvají absorpční maximum k červené části spektra a zvyšují produkci singletového kyslíku.

I přes tyto nevýhody byl bromovaný analog úspěšně použit v testech pro autotransplantační léčbu myeloidní leukémie⁵².

Porfyceny – jejich absorpční maximum se pohybuje v oblasti 600-650 nm. Modifikací na periférii lze dosáhnout velice dobrých farmakokinetických vlastností. Látka se aplikuje pouze topicky, umožňující léčbu kožních nemocí (psoriáza, nemelanotický karcinom kůže)⁵³.

Hypericin - tato přírodní látka také funguje jako účinný PS, poněvadž způsobuje hypericismus u zvířat konzumujících větší množství rostlin s obsahem této látky⁵⁴. Lze jej využít pro *ex vivo* fluorescenční cytologickou detekci buněk nádoru močového měchýře v moči⁵⁵.

Photoclor – patří opět do skupiny chlorinů, přesněji se jedná o derivát feoforbidu-a. Analogy feoforbidu-a jsou obecně aktivnější než podobné látky ze skupiny chlorinů-e₆ (např. talaporfin)¹⁸.

Safyriny – patří do skupiny expandovaných porfyrinů (podobně jako texafyriny). Jejich základní pyrrolický makrocykl s jedním bipyrrrolickým spojením absorbuje v oblastech okolo 675 nm⁵⁶.

Třetí generace

Jako látky třetí generace se označují konjugáty PS s různými biomolekulami. Takováto kombinace je jedním z přístupů, který řeší problém selektivity fotosenzitizéru k nádorové buňce¹⁴.

Mezi látkami tvořícími fotosenzitivní část konjugátů zaujímají vedoucí postavení porfyriny, zřejmě z důvodu snadné přípravy. Ve farmakokinetice konjugátu dominuje afinita porfyrinové části k sérovým proteinům. Afinita biomolekul k receptorům na povrchu buňky je vyjádřena méně¹⁴. Nosič zlepšuje lokalizaci fotosenzitizéru ve specifických polohách a tedy i zvyšuje selektivitu, vychytávání fotosenzitizéru nádorovou buňkou a tak následně účinek PDT.

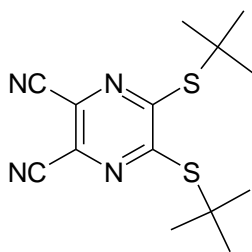
Několik druhů těchto biomolekul-nosičů s cílenou distribucí je zkoumáno. V literatuře je popsáno použití např. kyseliny listové⁵⁷, polylysinových řetězců⁵⁸, monoklonálních protilátek⁵⁹ a steroidů⁶⁰.

Podobně jako ostatní sloučeniny lze s porfyriny konjugovat též peptidy⁶¹ a ligandy DNA⁶². Tyto konjugáty vykazují určitou receptorovou specifiku *in vitro*, ale *in vivo* zatím toto, nebylo pozorováno.

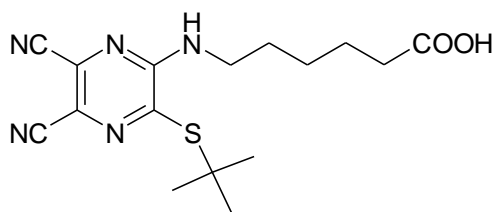
1.7 CÍL PRÁCE

PDT terapie je rychle se rozvíjející obor. Hledání nových a účinnějších PS je jedním z dlouhodobých předpokladů pro další vývoj. Ve své práci jsem se zaměřila na přípravu PS a jejich prekurzorů vhodných k dalšímu využití. Snažila jsem se připravit jednak prekurzory pro syntézu PS, ale i samotné PS s vlastnostmi, které by více odpovídaly požadavkům praxe.

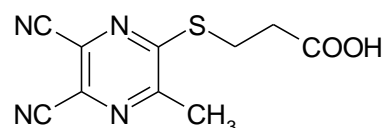
Mým prvním cílem byla příprava asymetricky substituovaných derivátů ze skupiny azaanalogů ftalocyaninů (azaftalocyaniny – AzaPc) připravovaných smíšenou tetramerizací dvou různých prekurzorů. Jako prekurzory jsem použila různě substituované deriváty pyrazin-2,3-dikarbonitrilu: 5,6-bis(*tert*-butylsulfanyl)pyrazin-2,3-dikarbonitril(obr.14); 6-(3-*tert*-butylsulfanyl-5,6-dikyanpyrazin-2-ylamino)hexanovou kyselinu(obr.15) a 3-(5,6-dikyano-3-methyl-pyrazin-2-ylsulfanyl)propionovou kyselinu(obr. 16).



Obr. 14



Obr. 15

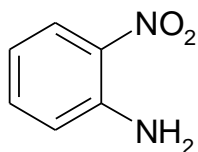


Obr. 16

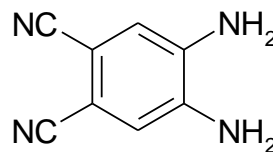
Centrální atom byl zvolen zinečnatý kation, díky nejlepšímu vlivu na produkci singletového kyslíku⁶³.

Při tetramerizaci dvou různých prekurzorů vzniká směs několika kongenerů. Tyto jednotlivé kongenery jsem od sebe oddělila sloupcovou chromatografií, a tak získala pouze jeden požadovaný asymetrický derivát typu A₃B – s jednou karboxylovou skupinou (viz. Metodická část 2.2.3.1 Syntéza A₃B ftalocyaninů – Statistická kondenzace).

Druhým úkolem byla příprava prekurzorů pro syntézu rozšířených AzaPc (např. benzimidazoporfyrazinů, chinoxalinoporfyrazinů aj.). Výchozí látkou byl zvolen *o*-nitroanilin (obr. 17), ze kterého byl ve čtyřech krocích (oxidace aminoskupiny, jodace, redukce nitroskupin, substituce atomů jodu kyanoskupinami) nasyntetizován 1,2-diamino-4,5-dikyanobenzen (obr. 18). Tato sloučenina může dále být použita ke kondenzaci s aldehydy nebo diketony cestou oxidativní cyklizace, čímž se získají prekurzory pro samotnou cyklizaci AzaPc.



Obr. 17

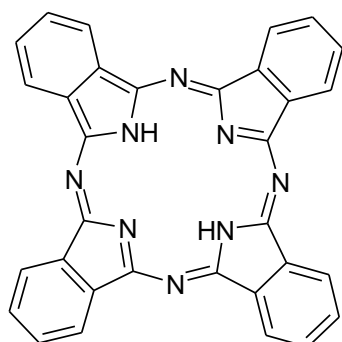


Obr. 18

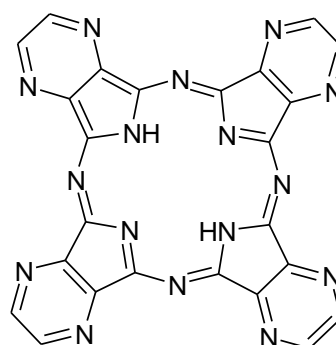
2. METODICKÁ ČÁST

2.1. AZAANALOGY FTALOCYANINŮ

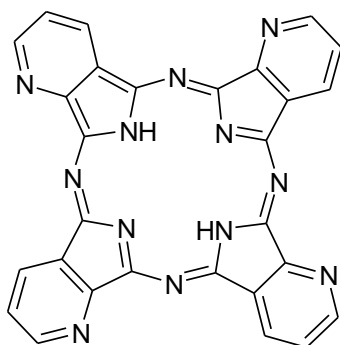
Využití původních ftalocyaninů je často ztíženo jejich extrémně nízkou rozpustností ve vodě a většině organických rozpouštědel. Azaanalogy ftalocyaninů (AzaPc) se liší nahrazením některých uhlíkových atomů makrocyklu atomy dusíku (obr. 19).



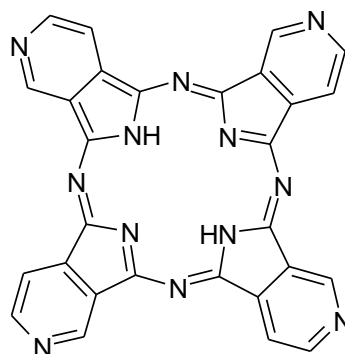
ftalocyanin



tetrapyrzinoporfyrazin



alfa-tetrapyridinoporfyrazin



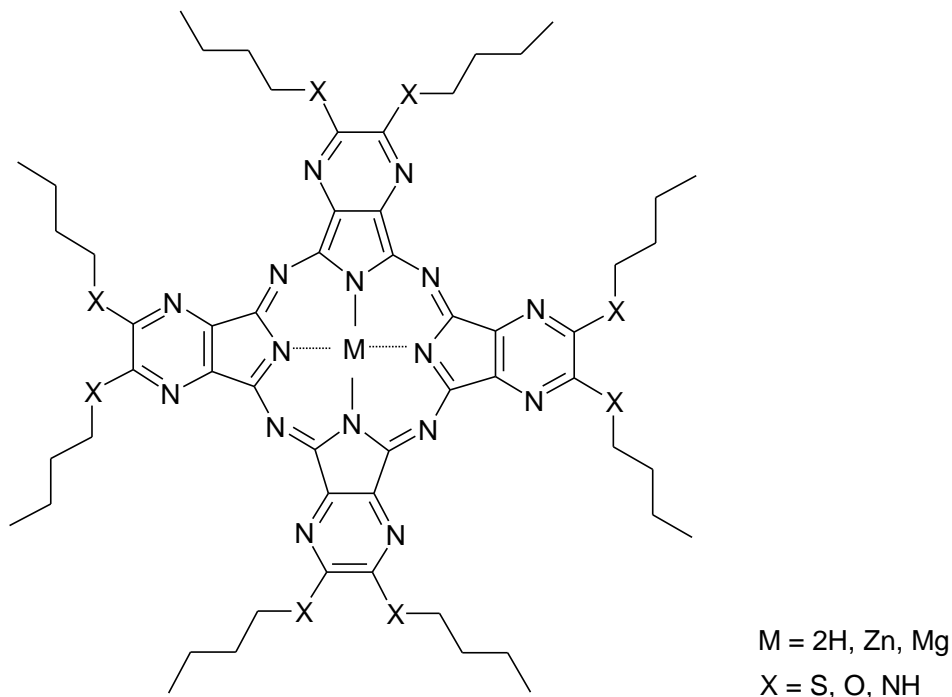
beta-tetrapyridinoporfyrazin

Obr. 19

Fyzikálně-chemické vlastnosti AzaPc jsou silně ovlivněny přítomností exocyklických atomů dusíku, které jsou více bazické (v případě pyridinoporfyrazinů), ale i méně bazické (v případě pyrroloporfyrazinů)⁶⁴ než *meso* atomy dusíku v porfyrazinovém makrocyklu. Vzárustající bazicita AzaPc v porovnání s odpovídajícími ftalocyaniny vysvětluje jejich vlastnosti, jako je např. tvorba stabilních hydrátů nebo specifická afinita k protonům v kyselém prostředí⁶⁵.

2.1.1 Heteroatomy v periferních řetězcích AzaPc

Problematikou vlivu heteroatomů v periferních řetězcích na fyzikálně chemické vlastnosti AzaPc ve vztahu k PDT se podrobně zabývá článek Zimčíka et al.⁶⁶. Ve svých pokusech vychází z 5,6-dichlorpyrazin-2,3-dikarbonitrilu, který substituuje čtyřuhlíkatými řetězci navázanými přes různé druhy heteroatomů (obr. 20).



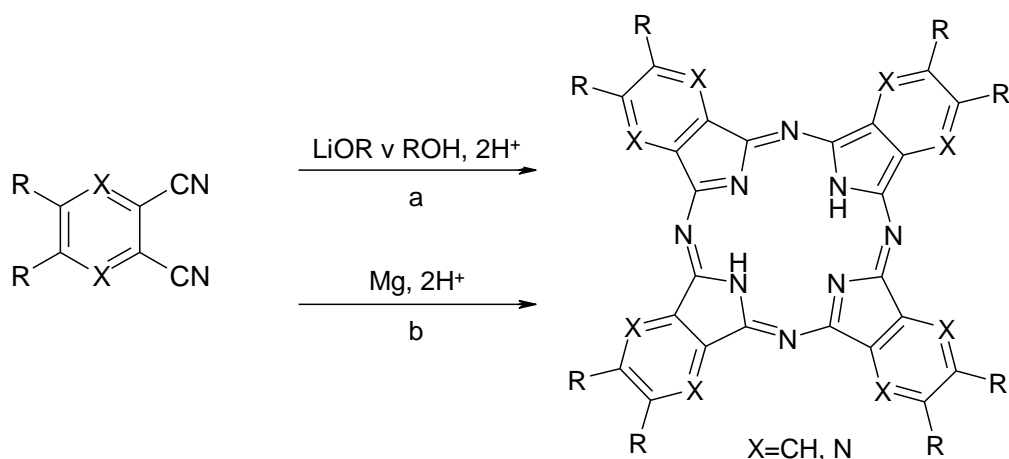
Obr. 20

Stabilita periferních řetězců vůči alkoholátům používaným v průběhu cyklizace (např. butanolát) klesá od alkylamino přes alkylsulfanyl k alkoxy skupinám. Naopak produkce singletového kyslíku byla u alkylamino derivátů zanedbatelná. Alkylsulfanyl a alkoxyderiváty jsou pro PDT vhodnější.

2.1.2 Centrální atomy AzaPc

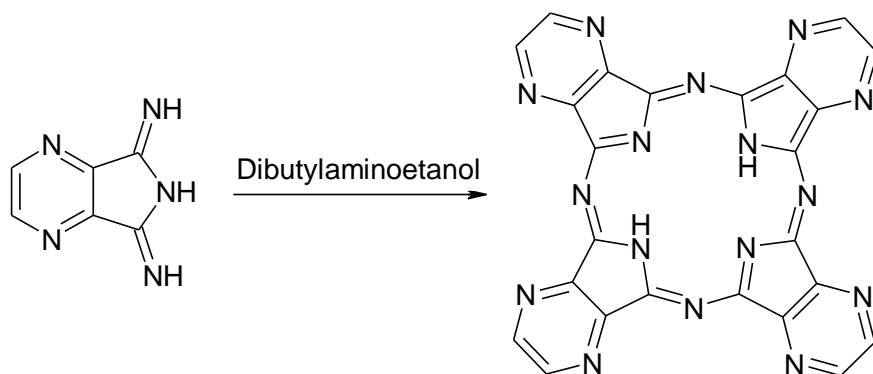
AzaPc lze syntetizovat jak bezkovové, tak s rozličnými centrálními atomy, které ovlivňují fyzikálně chemické vlastnosti celé molekuly a mohou též modifikovat absorpční spektrum i potenciální využití látky v PDT.

Nejsnazší cesta k získání bezkovového analogu AzaPc je odstraněním kovu (obr. 21) (pouze v případě alkalických kovů (ad a) a kovů alkalických zemin (ad b)) z koordinační vazby za použití slabých (ad a) nebo silných (ad b) kyselin^{67,68}.



Obr. 21

Pro přípravu bezkovových AzaPc se používá také syntéza z velice reaktivních pyrazinových analogů substituovaných isoindolindiiminů. Po zahřátí ve výše vřoucích rozpouštědlech jako 2-dimethylaminoethanol, 2-dibutylaminoethanol nebo formamid samovolně přecházejí na AzaPc (obr. 22)⁶⁹.



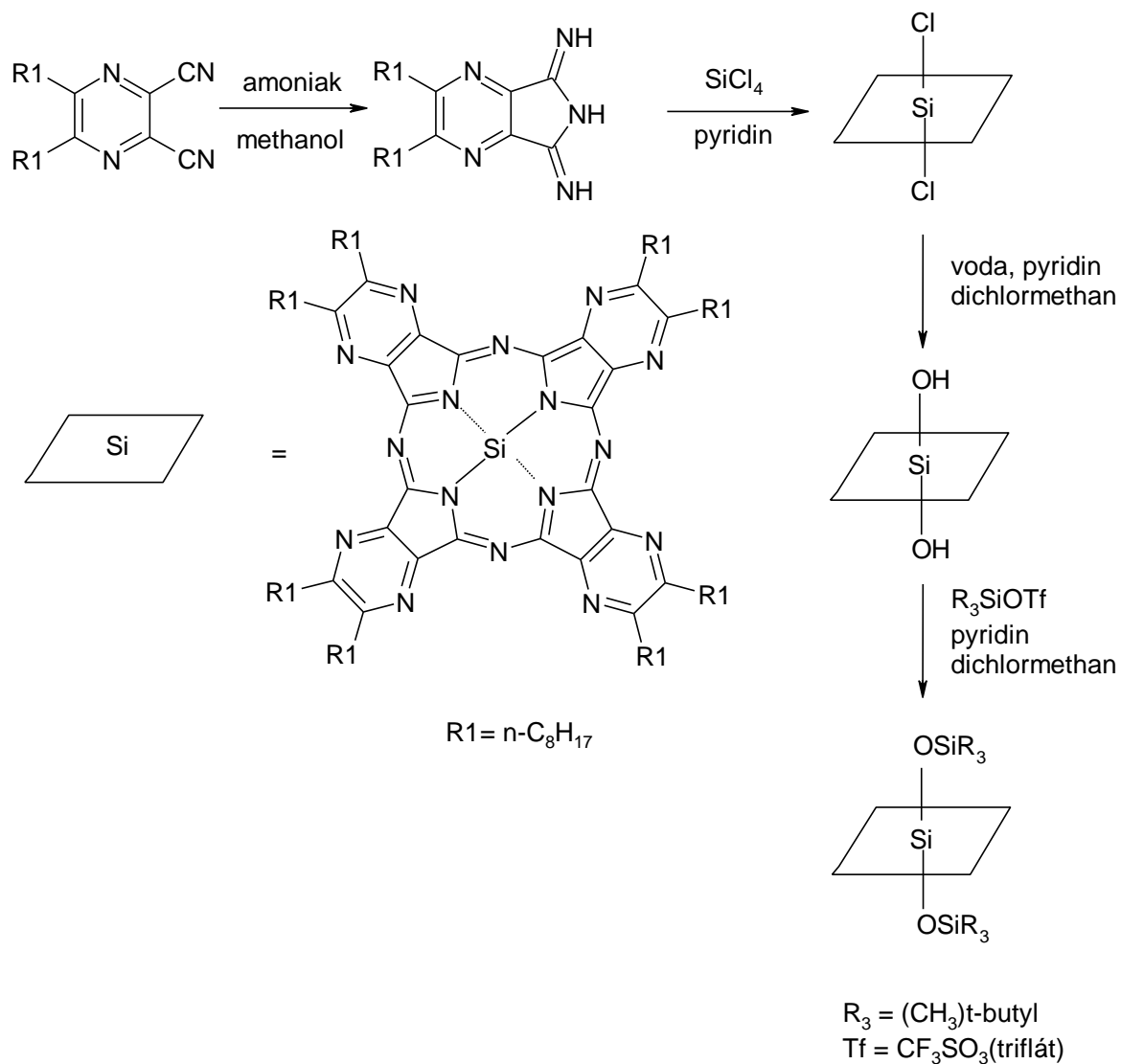
Obr. 22

Do centra těchto makrocyclických systémů lze zavést kov nebo polokov, jež poté může vhodně měnit jejich vlastnosti, zejména co se týče spektrálních, oxidačních nebo fotodynamických vlastností.

Alkalické kovy a kovy alkalických zemin nejsou příliš pevně vázány ve středu AzaPc a lze je poměrně snadno použitím slabších či silnějších kyselin odstranit za vzniku bezkovových AzaPc (viz výše).

Ostatní kovy a polokovy jsou již chelátovány silně a vydrží i rozpouštění v kyselině sírové. Jejich příprava vychází opět většinou z prekurzoru pyrazin-2,3-dikarbonitrilu. Takto připravil své cykly např. Freyer⁷⁰, který nechal prekurzory reagovat s chloridy kovů niklu, kadmia a zinku ve vřoucím trichlorbenzenu po dvě hodiny.

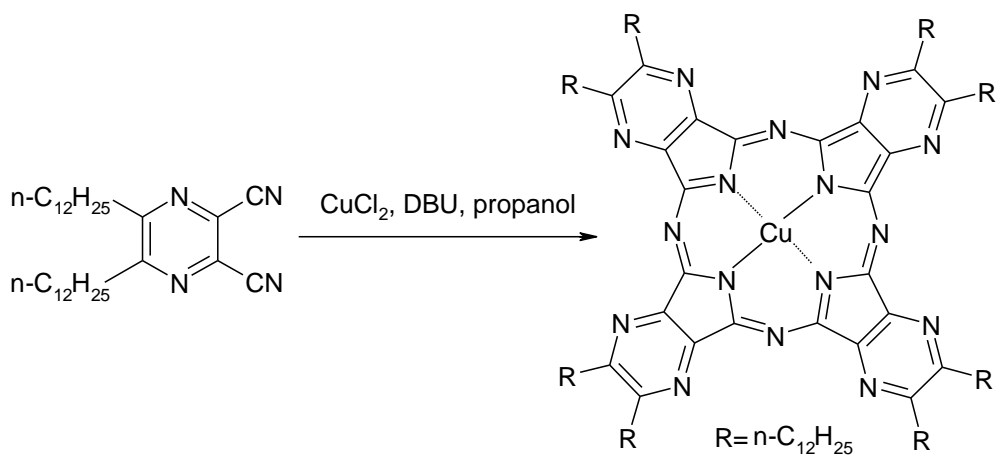
S některými centrálními atomy (Si, Al) vznikají AzaPc velice špatně⁶⁹. V těchto případech se využívá přípravy vysoce reaktivních pyrazinových analogů isoindolindiiminů (obr. 23), jež poté s příslušnou solí reagují za vzniku AzaPc.



Obr. 23

Mezi méně obvyklé centrální atomy patří galium, jehož komplex lze připravit pomocí kovové soli galia, která se nechá reagovat s prekurzorem, močovinou a chinolinem při 300-320 °C po 3-4 hodiny⁶⁵.

Komplex s mědí lze připavit např. reakcí prekursoru v roztoku n-propanolu s DBU a chloridem měďnatým⁷¹. Při této reakci pravděpodobně nejprve vzniká nekovový AzaPc a ihned *in situ* dochází k náhradě vodíkových atomů atomem kovu (obr.24). Z tohoto důvodu lze i původně vytvořený bezkovový cyklus obsadit žádaným kovem⁶⁶.

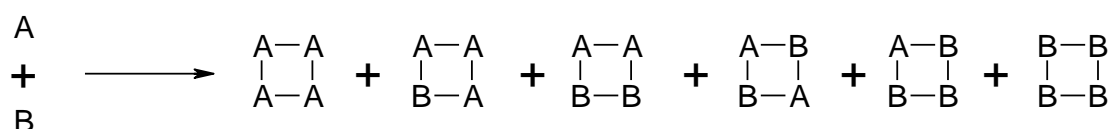


Obr. 24

2.2. NESYMETRICKÉ FTALOCYANINY

V poslední době je velká část pozornosti věnována přípravě nesymetrickým ftalocyaninům a jim příbuzným systémům, protože vykazují nové fyzikální vlastnosti. Získávají se buď zavedením různých substituentů do makrocyclického kruhu nebo formální substitucí některých isoindolových jednotek⁷².

Když je příprava nesymetricky substituovaných Pc provedena smíšenou kondenzací dvou různých ftalonitrilů A a B, získá se směs šesti různých sloučenin (AAAA, AAAB, AABB, ABAB, ABBB, BBBB) (obr. 25).



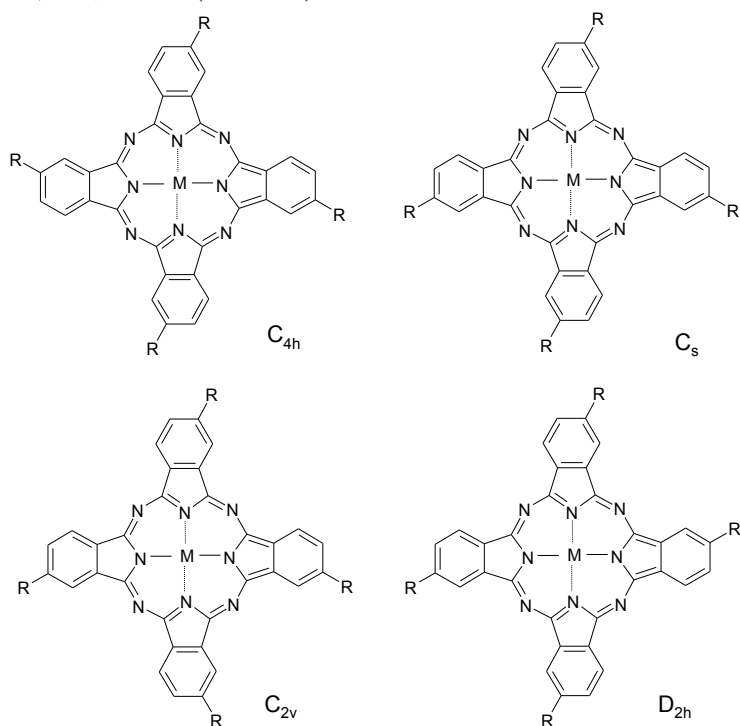
Obr. 25

Požadovaný Pc musí být izolován prostřednictvím chromatografických technik. Tyto neselektivní metody obvykle vedou k velmi nízkým výtěžkům požadovaného nesymetrického Pc, a proto se mnohé pokusy snaží řešit tento problém.

Centrálně nesymetrické Pc jsou ovšem získány i tehdy, když je použit nesymetricky substituovaný prekurzor bez roviny zrcadlové souměrnosti k aromatickému kruhu, jako je například monosubstituovaný ftalonitril. V těchto případech reakce vede ke směsi konstitučních isomerů⁷².

2.2.1 Pokroky v přípravě konstitučních isomerů

Geometrické kombinace čtyř identických nesymetrických diiminoisoindolinových podjednotek ve struktuře ftalocyaninů vedou ke čtyřem konstitučním isomerům se symetriemi C_s , D_{2h} , C_{2v} a C_{4h} (obr. 26).



Obr. 26

Statistická směs těchto čtyř isomerů by obsahovala teoreticky 12,5 % D_{2h} isomeru, 12,5 % C_{4h} isomeru, 25 % C_{2v} a 50 % C_s isomeru. Tuto skutečnost, kterou prvně pozoroval Linstead roku 1936 během studií syntézy 1,2-naftalocyaninů⁷³, vedla organické chemiky k tomu, aby oddělili a charakterizovali každý izomer a pak popsali selektivní postup syntézy. Dokonce když už byla potvrzena přítomnost různých isomerů, bylo často nemožné charakterizovat a separovat jednotlivé isomery v důsledku jejich nízké rozpustnosti a/nebo jejich sklonu k agregaci. Zavedení nových rozpustnějších a neagregujících substituentů spojené se separací pomocí HPLC na speciálně navržených fázích dovolilo prvně detekci isomerů a pak jejich ^1H NMR spektroskopii. Prvního přímého zkoumání existence konstitučních isomerů ftalocyaninů bylo dosaženo pomocí ^1H NMR spektroskopie v roce 1985 Wöhrlem a jeho spolupracovníky⁷⁴.

2.2.2 Selektivní syntéza konstitučního isomeru ftalocyaninů

Dvě metody vedou úspěšně k selektivní syntéze pouze jednoho ze čtyř možných konstitučních isomerů ftalocyaninů: vhodné modifikace statistického postupu a tzv. přímý postup⁷².

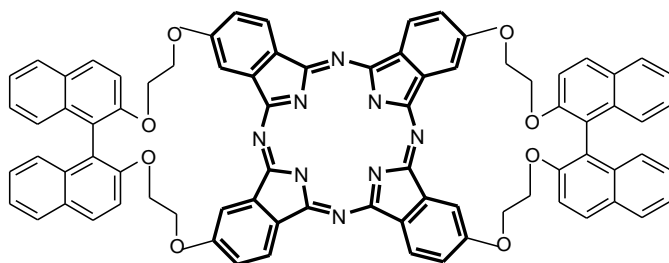
2.2.2.1 Statistický postup

Když je jako výchozí látka pro cyklizaci použit 4-substituovaný derivát ftalonitrilu, získá se směs všech čtyř isomerů bez ohledu na reakční podmínky. V roce 1993 Hanack a jeho spolupracovníci jako první úspěšně separovali čtyři konstituční isomery [tetrakis(2-ethylhexyloxy)phtalocyaninato]nikelnatého komplexu pomocí HPLC⁷⁵ a v roce 1996 provedli důkladnou studii isomerů tetrasubstituovaných ftalocyaninů s nově vyvinutou HPLC fází⁷⁶.

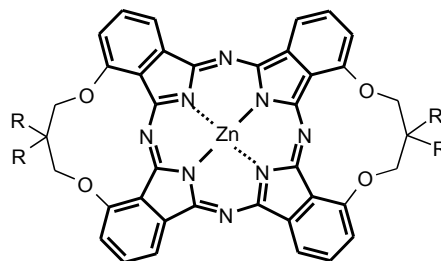
Na druhé straně, použitím výchozí látky se substituentem v poloze 3 vedlo k výsledkům, které byly velmi silně závislé na reakčních podmínkách během syntézy. Mnohé výzkumné skupiny dosáhly dobré nebo úplné selektivity pro C_{4h} isomer, když nechaly reagovat 3-substituovaný derivát ftalonitrilu v přítomnosti lithného alkoholátu při nízkých teplotách. Například Leznoff a kol. s úspěchem nasyntetizovali 3-alkoxysubstituovaný Pc, a to selektivně jen isomer C_{4h} ⁷⁷.

2.2.2.2 Přímý postup

Dalším postupem směřujícím k selektivní syntéze jediného konstitučního isomeru, je tzv. přímý postup. Ten zahrnuje racionální návrh ftalonitrilových prekurzorů, které vedou ke vzniku pouze jednoho isomeru. Tento způsob dokazuje, že je možné obdržet jen D_{2h} isomer jednoduše symetrickým spojením ftalonitrilových jednotek s vhodnými spacersy. Kobayashi a jeho spolupracovníci získali chirální D_{2h} isomer spojením dvou ftalonitrilových jednotek v poloze 4 s opticky aktivním 2,2'-dihydroxy-1,1'-binaftylem⁷⁸ (obr. 27). Leznoff se svými spolupracovníky připravil samostatně D_{2h} isomer, když použili dimer složený ze dvou ftalonitrilových jednotek spojených v polohách 3 s 2,2'-disubstituovaným propan-1,3-diolem⁷⁹ (obr. 28).



Obr. 27



Obr. 28

2.2.3 Selektivní syntéza nesymetricky substituovaných ftalocyaninů

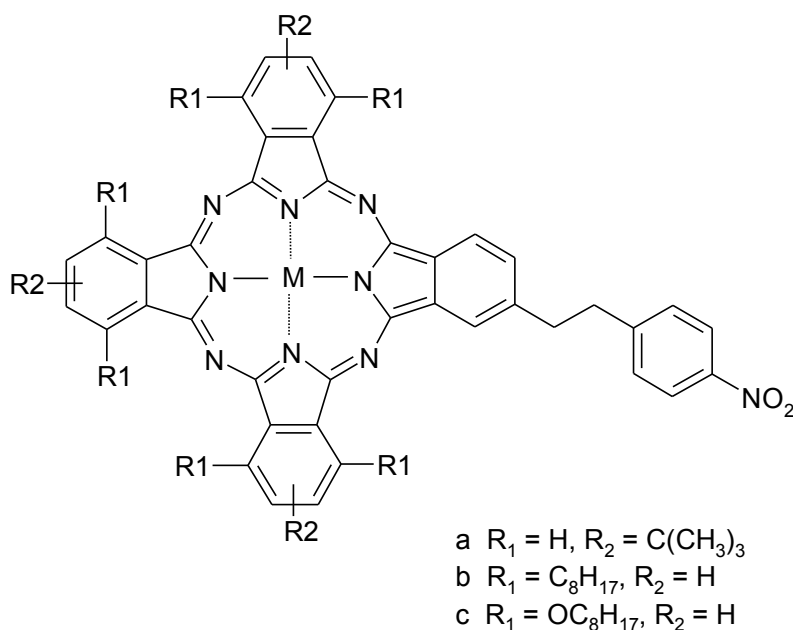
Vědci pracující v oblasti chemie ftalocyaninů usilují o vyvinutí selektivních metod pro přípravu nesymetricky substituovaných Pc. Několik přístupů je uvedeno níže.

2.2.3.1 Syntéza A_3B ftalocyaninů

Statistická kondenzace

Nejjednodušším postupem přípravy Pc nesoucího různě substituenty je smíšená kondenzace dvou různě substituovaných prekurzorů A a B. V principu je toto neselektivní metoda poskytující směs šesti sloučenin (AAAA, AAAB, AABB, ABAB, ABBB, BBBB). Proto je zde nezbytné použití chromatografických technik k izolaci požadovaných makrocyclů. Takovouto směs je často velmi obtížné separovat v důsledku tendence Pc molekul k agregaci. Ačkoli touto metodou není dosažena selektivita, přesto některé postupy směřují k zvyšujícím se výtěžkům žádané sloučeniny⁷².

Statistická kondenzace je obecně užívána zejména pro přípravu Pc obsahujících jednu odlišnou a tři identické isoindolové podjednotky (A_3B) (Obr. 29)⁸⁰.



Obr. 29

Aby reakce vedla k vytvoření A_3B derivátů je zapotřebí vhodný stechiometrický poměr použitých reaktantů A a B. Statistická úvaha předpokládá, že reakce dvou různých ftalylderivátů stejné reaktivity v poměru 3:1 poskytne směs produktů v následujícím procentuálním zastoupení: A_4 (33 %), A_3B (44 %), další kondenzační

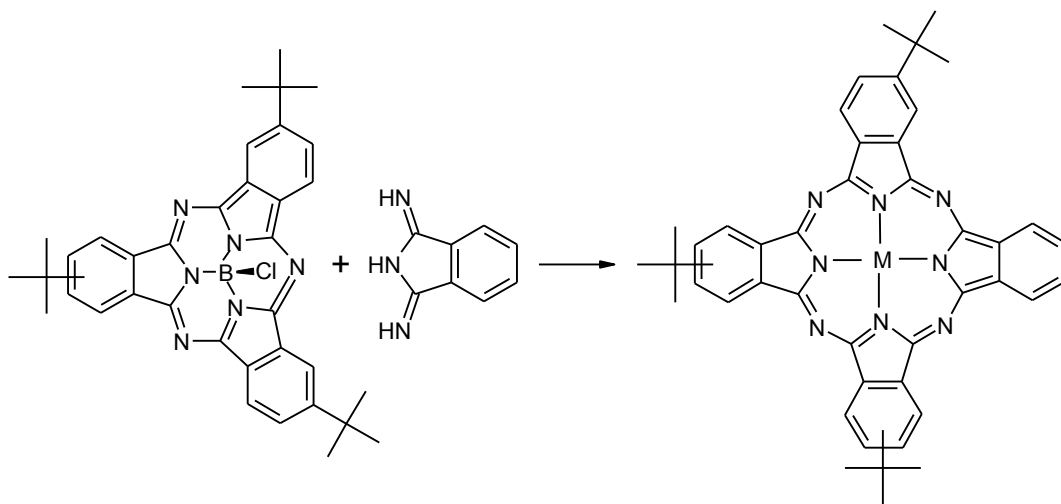
produkty (23 %). Běžně se používá molární poměr 3:1, který vede k požadované sloučenině získané ve výtěžcích pohybujících se v rozmezí 10-20 %⁸⁰.

Upřednostňuje se použití ftalonitrilů s různými charakteristikami rozpustnosti, což usnadňuje oddělení nesymetrických Pc díky odlišným chromatografickým vlastnostem a mj. i odlišné rozpustnosti sloučenin ve výsledné statistické směsi. Vazba *tert*-butylových skupin nebo uhlovodíkového řetězce v poloze 3 a 6 jedné z výchozích látek (obvykle té v nadbytku) usnadňuje izolaci A₃B produktu. Tyto substituenty činí Pc také dobře rozpustným a zabraňují agregaci makrocyclů^{81,82}.

Lze využít také stechiometrického poměru 9:1. Výsledkem je pak směs prakticky pouze dvou látek A₄ a A₃B, které lze snadněji separovat, ovšem za cenu, že jsou sníženy výtěžky produktu A₃B⁸³. Tento poměr tedy může být použitý i v případě vyšší reaktivity B než A⁸¹.

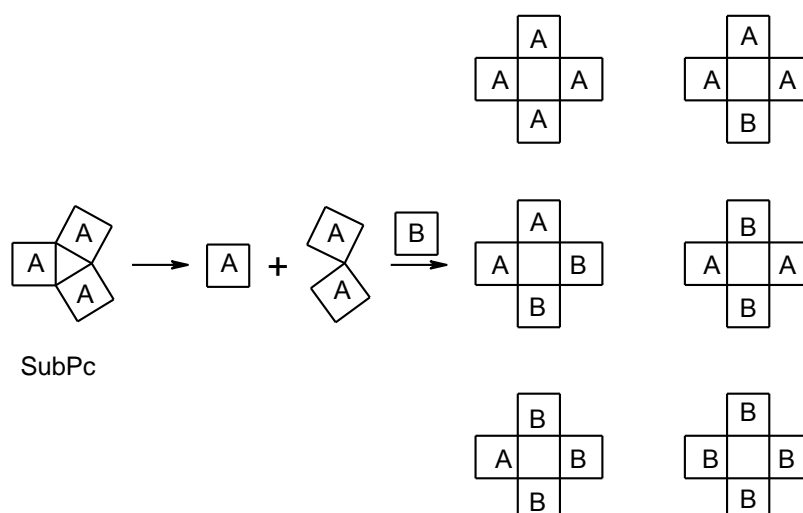
Subftalocyaninový postup

Původní metoda pro selektivní syntézu nesymetricky substituovaných Pc typu A₃B byla vyvinuta v 80. letech 20. stol. Kobayashim a kol.⁸⁴. Dochází k rozšíření kruhu subftalocyaninu (SubPc) působením sukcinimidu nebo diiminoisoindolinového derivátu (obr. 30).



Obr. 30

V roce 1995 bylo navrženo⁸⁵, že reakce bude probíhat částečnou a nebo úplnou fragmentací subftalocyaninového kruhu s následným uzavřením fragmentů do kruhu. To ovšem vede nakonec také ke směsi všech možných ftalocyaninů obsahujících všechny kombinace diiminoisoindolových jednotek přítomných jako výchozích látek (obr. 31).



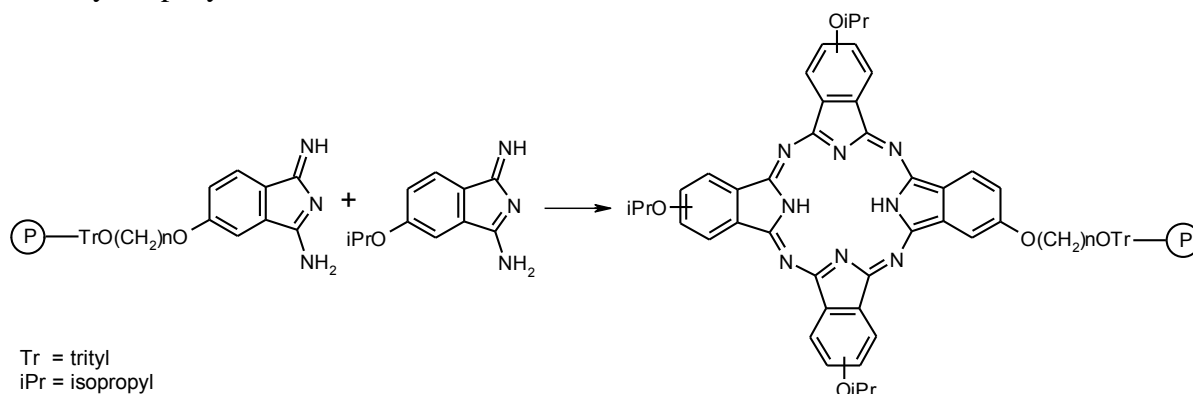
Obr. 31

Tato metoda byla provedena Wöhlerem a jeho spolupracovníky. Bylo prokázáno, že SubPcs mohou reagovat s méně reaktivními ftalonitrilovými deriváty v přítomnosti silnější báze jako je např. DBU. Tento způsob vede k dobrým výtěžkům A_3B ftalocyaninů⁸⁶.

Při srovnávání výtěžků stejných A_3B nesymetricky substituovaných Pcs získaných rozšířením kruhu a získaných kondenzací se zdá, že první metoda je účinnější. I přesto výtěžky obou metod jsou dosti nízké (<15 %)⁸⁷.

Metoda s využitím pevné fáze

Tento postup vyvinutý především Leznoffem je jednofázová syntéza. Tato metoda zahrnuje vazbu vhodně substituovaného ftalonitrilu (B) na polymerní nosič. Tento nerozpustný polymer-prekurzor může být pak dále podroben chemickému působení dalšího odlišně substituovaného volného ftalonitrilu (A), což dává vzniknout polymer- A_3B ftalocyaninu (obr. 32). Ten může být jednoduše oddělen od A_4 makrocyklu, který může být vymyt. Důležité je, aby Pc A_4 byl dobře rozpustný a tudíž snadno odstranitelný promýváním pevné fáze. Poté je žádaný A_3B Pc uvolněn z vazby na polymer⁸⁸.



Obr. 32

2.2.3.2 Syntéza A₂B₂ ftalocyaninů

A₂B₂ deriváty jsou zřídka izolovány ze statistické směsi. Jsou složeny ze směsi dvou isomerů – ABAB a AABB, které vykazují podobné charakteristiky rozpustnosti a jsou často eluovány ve stejné frakci. Během posledních desetiletí se vyvíjí specifické metody pro přímou syntézu pouze jednoho ze dvou makrocyclů⁷².

2.3. JODACE AROMATICKÝCH SLOUČENIN⁸⁹

S velkou objemností atomu jodu souvisí malá síla, kterou jsou poutány valenční elektrony jodu. Relativní elektronegativita jodu je velice nízká. Molekula jodu se snadno štěpí nejen na jodové atomy, ale i na ionty, zejména v polárním prostředí. Tento druhý způsob štěpení se dá podporovat plynulým odstraňováním jodových aniontů, např. reakcí s chloristanem nebo fluoroboritanem stříbrným⁹⁰.

Na průběh a výsledek jodace má vliv rozpouštědlo, katalyzátory, osvětlení, teplota a reakční doba.

Rozpouštědla

Vzhledem k pevnému skupenství jodu se provádí převážná většina jodací v roztocích. Bez rozpouštědla, pouhým smícháním jodu s organickou sloučeninou, bylo provedeno jen několik ojedinělých preparací^{91,92,93}.

Katalyzátory a osvětlení

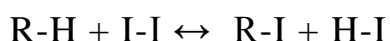
Sloučeniny, které urychlují přímou jodaci aromatických systémů, nelze pokládat za katalyzátory, neboť jejich účinek je čistě oxidační (viz jodace benzenu a homologů).

Vzhledem k malé disociační energii jodu není vliv osvětlení na jodace organických sloučenin významný. Nic méně bylo zjištěno, že adice jodu při osvětlení^{94,95} probíhá rychleji než ve tmě.

Teplota a reakční doba

Zvýšení teploty urychluje jodaci, ale příliš vysoká teplota podporuje odštěpení jodu. Tato teplota je různá u různých sloučenin. Substituce aromatického vodíku na aktivovaných systémech, fenolu, anilinu, nastává již za normální teploty⁹⁶. Jodace benzenu a jeho homologů vyžaduje teplotu zvýšenou a deaktivované aromatické sloučeniny se jodují zpravidla při teplotách vyšších než 150 °C⁹⁷. Intenzivní jodace, které mají vést k polyjodderivátům, je třeba provádět při teplotách vyšších než 200°C⁹⁸.

Náhrada aromaticky vázaného vodíku jodem je reakce vratná, protože v rovnovážné směsi, která vznikne, vystupuje jodovodík jako redukční činidlo s tendencí vyredukovat organicky vázaný jod za vzniku původní sloučeniny a jodu (viz reakční chéma).



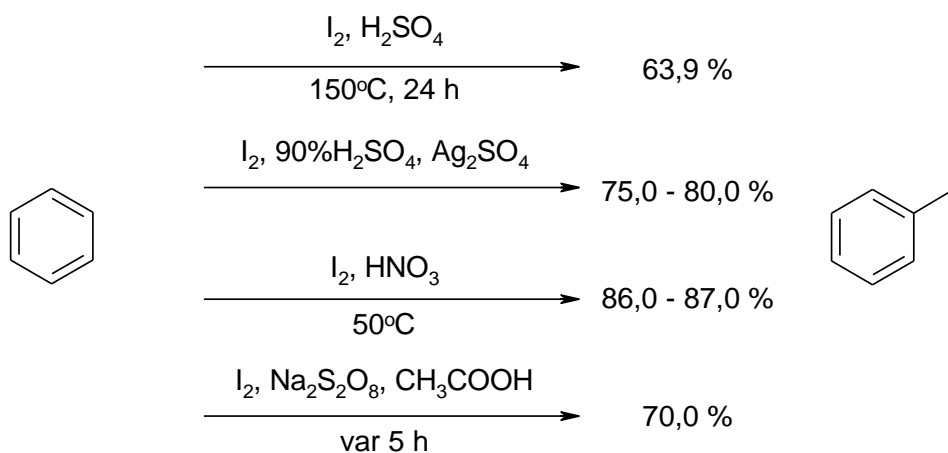
Tato reakce převládá zejména při vyšších teplotách. Je nutno odstraňovat vznikající jodovodík. Buď se neutralizuje nějakou zásadou jako je hydrogenuhličitan sodný^{96,99}, uhličitan vápenatý¹⁰⁰ nebo oxidem rtuťnatým^{101,102} nebo se váže pomocí síranu stříbrného ve formě nerozpustného jodidu stříbrného¹⁰³, nebo se převede oxidací na vodu a jod. Poslední způsob je velmi výhodný, protože se posunuje rovnováha vratné reakce doprava nejen odstraňováním jodovodíku, ale i vracením

jodu do oběhu a udržováním jeho koncentrace během reakce. K oxidaci reakčního jodovodíku se používá chlornan vápenatý¹⁰⁴, alkalický jodnan¹⁰⁵, chloramin T¹⁰⁴, kyselina dusičná¹⁰⁶, koncentrovaná kyselina sírová¹⁰⁷, oleum^{108, 109}, peroxid vodíku¹¹⁰, kyselina persírová¹¹¹ a kyselina jodičná^{98, 112}.

2.3.1 Elementární jod

2.3.1.1 Jodace benzenu, jeho homologů a derivátů

Přímá jodace *benzenu* byla provedena za použití nejrůznějších činidel. Již koncentrovaná kyselina sírová (obr. 33) při vyšší teplotě (150°C) oxiduje reakcí vznikající jodovodík a z benzenu vzniká jodbenzen ve slušném výtěžku¹¹³. Lepších výsledků se dosáhne, pracuje-li se se zředěnou kyselinou sírovou a k vázání jednotlivých aniontů se použije síranu stříbrného (obr. 33)¹⁰³. Oblíbeným oxidačním prostředkem je také kyselina dusičná (obr. 33)^{114, 106}. Také persíran sodný v kyselině octové (obr. 33) se osvědčil jako vhodné oxidans¹¹¹. Jedním z nejdéle používaných oxidačních činidel je kyselina jodičná, která má výhodu ve svém nízkém oxidačním ekvivalentu⁹⁸.



Obr. 33

Vedle jodbenzenu vznikají při teplotě 200-240 °C *p*-dijodbenzen a 1,2,4-trijodbenzen⁹⁸.

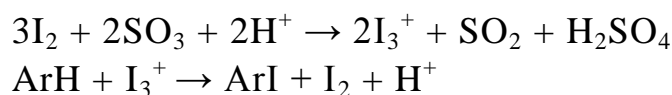
Toluen se joduje na směs, v které převládá isomer *para* nad *ortho*-derivátem. Jodace byla provedena za použití 80 % kyseliny sírové a síranu stříbrného¹⁰³ ve výtěžku 55 %, za použití kyseliny dusičné¹⁰⁶ ve výtěžku 60 % a pomocí persíranu sodného v kyselině octové¹¹¹ ve výtěžku 86 %.

Nitrobenzen se joduje v *meta*-poloze za přítomnosti síranu stříbrného¹⁰³.

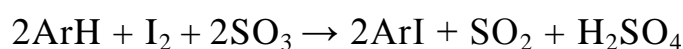
Jodace *fenolu* probíhá s tradiční lehkostí. Reakce nastává na fenolátovém aniontu¹¹⁵, proto se fenol joduje obvykle v alkalickém prostředí, v louhu nebo amoniaku, kde již nereaguje elementární jod, nýbrž jodový kation (viz jodnany). Fenol poskytuje podle množství jodu *p*-jodfenol¹¹⁶ nebo 2,4,6-trijodfenol^{106, 116}.

Aminy se jodují velmi snadno. Směs anilinu a jodu reaguje za vzniku hydrojodidu p-jodanilinu¹¹⁷. Stejně snadno se jodují homology anilinu¹¹⁸.

Dalším způsobem jodace aromatických sloučenin, především benzenových jader s deaktivujícími substituenty, je použití směsi jodu a 20% olea. V této směsi je pravděpodobně jodačním činidlem I_3^+ ¹¹⁹ (viz reakční schéma).



Uvolňovaný jod může být pak opět oxidován na I_3 oxidem sírovým. Tím může být všechen jod využit k jodaci aromatické sloučeniny¹¹⁹ (viz reakční schéma).



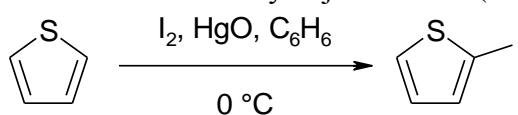
Za laboratorní teploty tímto způsobem reagují benzenová jádra s jedním deaktivujícím substituentem. Jádra se dvěma a více deaktivujícími substituenty za laboratorní teploty nereagují a tak je potřeba reakční směs zahřát¹¹⁹.

2.3.1.2 Jodace kondenzovaných uhlovodíků

Z vyšších kondenzovaných uhlovodíků byla vyzkoušena přímá jodace za přítomnosti síranu stříbrného u *naftalenu*, která vede k α -jodnaftalenu v nízkém výtěžku¹⁰³.

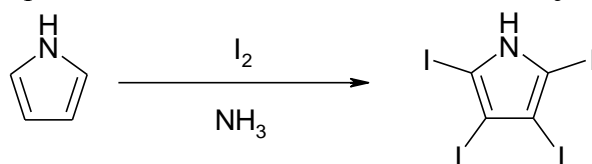
2.3.1.3 Jodace heterocyklických sloučenin

Thiofen se joduje velice snadno již za chladu jodem a oxidem rtuťnatým¹²⁰ nebo za použití kyseliny dusičné¹⁰⁶. Vzniká vždy 2-jodderivát (obr. 34).



Obr. 34

Jodace *pyrrolu* v kapalném amoniaku vede k 2,3,4,5-tetraiodpyrrolu (obr. 35)¹⁰⁶.



Obr. 35

U samotného *pyridinu* se přímá jodace nedaří, lze však jodem jodovat pyridinové homology, pikoliny a lutidiny¹⁰⁹.

2.3.1.4 Náhrada jiných prvků jodem = nepřímá jodace

Velmi snadno se nahrazuje jodem diazoskupina v alifatických diazolatcích¹²¹.

Často lze jodem nahradit karboxylovou skupinu na aromatickém jádře. Kyselina benzoová poskytuje energetickou jodací v oleu při 180 °C hexajodbenzen¹²², aromatické hydroxykyseliny¹⁰⁵ a aminokyseliny¹¹⁸ ztrácejí karboxyl za méně drastických podmínek.

Neobyčejně snadno reaguje jod s organokovovými sloučeninami. Grignardova činidla dávají s jodem v etheru příslušné jodderiváty ve výtěžcích 80-90 %¹²³. Této reakce se využívá k vpravení jodu do takového místa molekuly, kam by se přímou jodací nedostal.

2.3.2 Chlorjod

Chlorjod má nejširší použití ze všech smíšených halogenů, které se podobají elementárním halogenům. Liší se od nich snadnější disociací na ionty, která je způsobena vysloveně polárním charakterem jejich vazby. Svou reaktivitou odpovídají normálním halogenům v přítomnosti katalyzátorů.

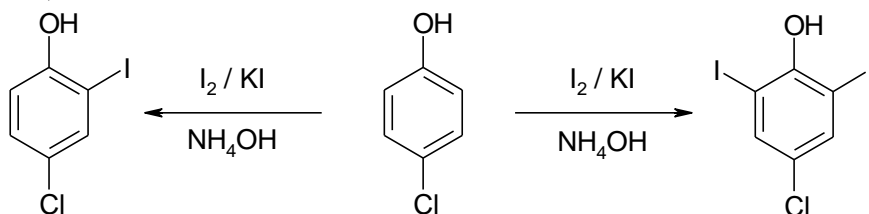
Provádějí se s ním adice na dvojně vazby i substituce. Při substitucích se váže na organickou sloučeninu zpravidla jod, takže chlorjod vystupuje jako jodační činidlo. Teprve při teplotách nad 200 °C chlorjod disociuje na atomy chloru a jodu. Chlorové atomy jakožto aktivnější pak reagují s organickou sloučeninou, takže výsledkem je chlorace a nikoli jodace, která nastává za nízkých teplot při iontovém štěpení¹²⁴.

2.3.3 Alkalické jodnany

Alkalické jodnany vznikají reakcí jodu s alkalickými sloučeninami (např. alkalickými hydroxidy, uhličitany, vodným amoniakem atd.)¹¹⁵.

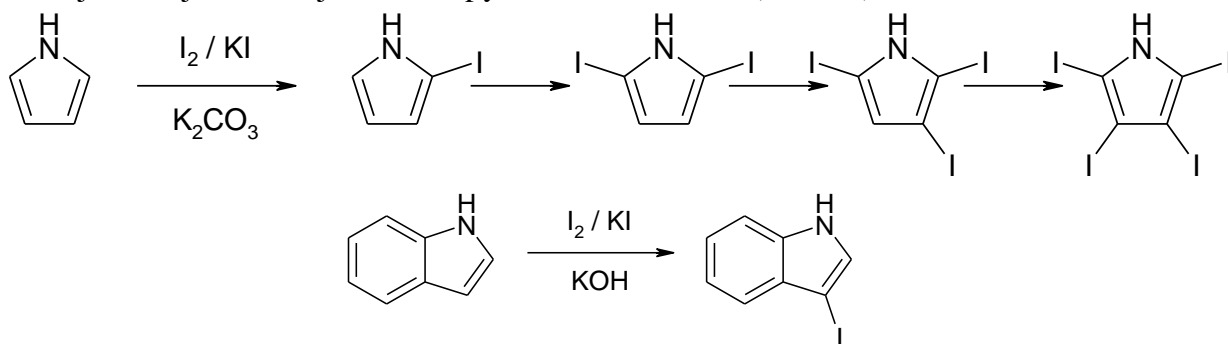


V aromatické řadě byly připraveny pomocí jodnanů některé substituční deriváty fenolů (obr. 36)^{115, 125}.



Obr. 36

Zajímavá je reakce jodnanu s pyrrolem a indolem (obr. 37)¹²⁶.

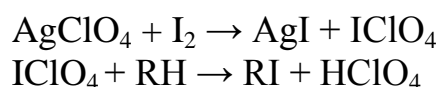


Obr. 37

Pyridinové jádro poskytuje reakcí s jodnanem monojodderivát¹²⁷.

2.3.4 Chloristan jodný

Zajímavá sloučenina, vznikající reakcí jodu s chloristanem stříbrným¹²⁸ je chloristan jodný, ve kterém halogen vystupuje jako vyslovený kation. Je to proto neobyčejně silné jodační činidlo pro kationoidní jodace, především pro substituce na aromatickém jádře (viz reakční schéma).



Aby se z reakčního prostředí odstraňovala volná kyselina chloristá, přidává se do reakce uhličitan vápenatý nebo hořečnatý¹²⁸.

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Teploty tání byly stanoveny na digitálním přístroji pro stanovování teplot tání ELECTROTHERMAL IA9200 a nejsou korigovány.

Průběh reakcí a čistota produktů a meziproductů byly kontrolovány tenkovrstevnou chromatografií na deskách Merck Silikagel 60 F254 s detekcí UV světlem vlnové délky 254 nm a 366 nm. Využívané soustavy jsou uvedeny u jednotlivých příprav.

NMR spektra byla naměřena na přístroji VARIAN MERCURY VxBBB 300 na KAOCH FaF UK v Hradci Králové. Měření bylo prováděno při frekvenci 299,95 MHz (^1H NMR a 75,43 MHz ^{13}C NMR). Posuny jsou vztaženy k vnitřnímu standardu Si (CH_3)₄.

Spektrum ve viditelné oblasti bylo změřeno na přístroji SHIMADZU UV 240 1 PC: UV-VIS recording spectrophotometer.

Infračervená (IČ) spektra byla měřena IČ spektrofotometrem Nicolet Impact 400 v KBr peletách na KAOCH FaF UK v Hradci Králové.

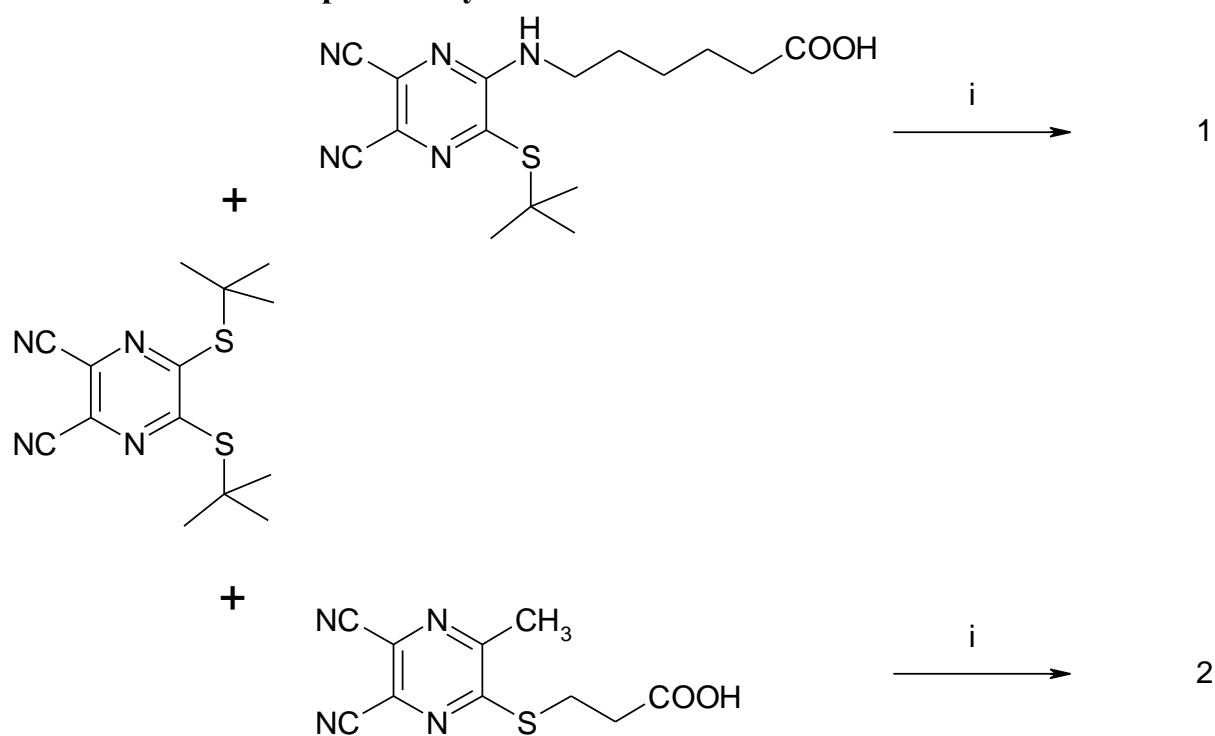
Prekurzory 5,6-bis(*terc*-butylsulfanyl)pyrazin-2,3-dikarbonitril¹²⁹, 6-(3-*terc*-butylsulfanyl-5,6-dikyanpyrazin-2-ylamino)hexanová kyselina¹³⁰ a 3-(5,6-dikyano-3-methyl-pyrazin-2-ylsulfanyl)propionová kyselina¹³¹ byly již dříve nasyntetizovány na KFCHKL FaF UK v Hradci Králové.

Bezvodý dimethylformamid (DMF) byl zakoupen u firmy Acros.

Octan zinečnatý dihydrát (Lachema) byl sušen při 78 °C za sníženého tlaku (13 mbar) 5 hodin.

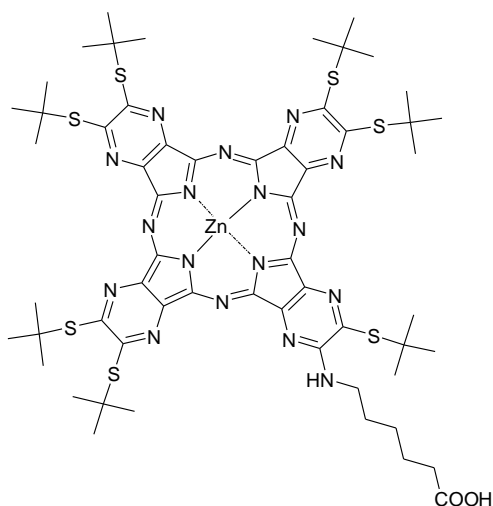
3.1 SYNTÉZA NESYMETRICKÝCH ZINEČNATÝCH KOMPLEXŮ AZAFTALOCYANINŮ

3.1.1 Schéma prováděných reakcí



i $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, bezvodý DMF

3.1.2 Příprava [2,9,10,16,17,23,24-heptakis(*tert*-butylsulfanyl)-3-(5-karboxypentylamino)-1,4,8,11,15,18,22,25(oktaaza)ftalocyaninato] zinečnatého komplexu (1)



M = 1334,2

C₅₈H₇₇N₁₇O₂S₇Zn

Směs 612 mg (2,0 mmol) 5,6-bis(*tert*-butylsulfanyl)pyrazin-2,3-dikarbonitrilu a 268 mg (0,66 mmol) 6-(3-*tert*-butylsulfanyl-5,6-dikyanpyrazin-2-ylamino)hexanové kyseliny jsem rozpustila v 15 ml bezvodého DMF. Poté jsem přidala 1,83 g (10 mmol) bezvodého octanu zinečnatého a nechala reagovat 2,5 h při 160 °C. Reakční směs jsem nechala zchladnout a nalila ji do přibližně 200 ml vody. Tmavě zelenou sraženinu jsem odfiltrovala, promyla vodou a vysušila. Produkt byl izolován sloupcovou chromatografií s mobilní fází chloroform:aceton:methanol 30:1:0,5. První výrazná zelená frakce odpovídala symetrickému AzaPc (typu AAAA). Po vyeluvání této první frakce z chromatografické kolony, jsem změnila mobilní fází na chloroform:aceton:methanol 20:1:1. Tak jsem získala druhou výraznou zelenou skvrnu, která odpovídala požadovanému produktu (1) (typu AAAB). Ten jsem ještě jednou přečistila sloupcovou chromatografií s mobilní fází chloroform:aceton:methanol 30:1:0,5.

Výtěžek 42 mg (5 %) pevné zelené látky.

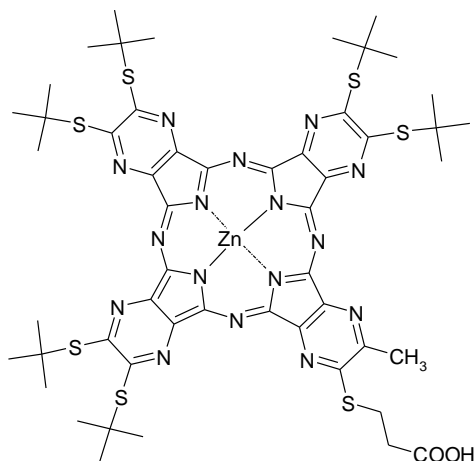
UV-vis (DMF) λ_{\max} (ϵ) 658 (135600); 598 (25700); 384 (105700).

IČ $\nu(\text{cm}^{-1})$: 2958; 2922; 2858 (alkyl CH); 1708 (C=O); 1567; 1517; 1456; 1362; 1253; 1232; 1144.

¹H NMR (C₅D₅N) δ (ppm) 7,92 (t; 1H; $J=5,8$ Hz; NH); 4,57 – 4,40 (m; 2H; NH-CH₂); 2,78 (t; 2H $J=6,4$ Hz; CH₂-COO); 2,35 (s; 54H; CH₃); 2,27 (s; 9H; CH₃); 2,24 – 2,10 (m; 4H; CH₂); 2,09 – 1,95 (m; 2H; CH₂).

¹³C NMR (C₅D₅N) δ (ppm) 175,88; 158,95; 158,53; 158,34; 158,26; 157,86; 153,70; 153,23; 151,97; 151,24; 150,90; 147,70; 147,52; 145,14; 145,09; 144,95; 144,77; 144,72; 144,62; 139,9; 51,39; 51,35; 51,25; 51,23; 50,91; 42,59; 35,06; 35,06; 30,92; 30,88; 30,77; 29,96; 27,64; 25,58.

3.1.3 Příprava [9,10,16,17,23,24-hexakis(*tert*-butylsulfanyl)-2-(2-karboxyethylsulfanyl)-3-methyl-1,4,8,11,15,18,22,25(oktaaza)ftalocyaninato] zinečnatého komplexu (2)



M = 1235
C₅₂H₆₄N₁₆O₂S₇Zn

Směs 918 mg (3 mmol) 5,6-bis(*tert*-butylsulfanyl)pyrazin-2,3-dikarbonitrilu a 248 mg (1 mmol) 3-(5,6-dikyano-3-methyl-pyrazin-2-ylsulfanyl)propionové kyseliny jsem rozpustila v 15 ml bezvodého DMF. Poté jsem přidala 2,98 g (16 mmol) bezvodého octanu zinečnatého a nechala reagovat 2,5 h při 160 °C. Reakční směs jsem nechala zchladnout a nalila ji do přibližně 200 ml vody. Tmavě zelenou sraženinu jsem odfiltrovala, promyla vodou a vysušila. Produkt byl izolován sloupcovou chromatografií s mobilní fází chloroform:aceton:methanol 30:1:0,5. První výrazná zelená frakce odpovídala symetrickému AzaPc (typu AAAA). Po vyeluvání této první frakce z chromatografické kolony, jsem změnila mobilní fází na chloroform:aceton:methanol 20:1:1. Tak jsem získala druhou výraznou zelenou frakci, která odpovídala požadovanému produktu (2) (typu AAAB). Ten jsem ještě jednou přečistila sloupcovou chromatografií s mobilní fází chloroform:aceton:methanol 20:1:1.

Výtěžek 6 mg (2 %) pevné zelené látky.

UV-vis (DMF) λ_{\max} (ϵ) 654 (228300); 594 (31000); 387 (127200).

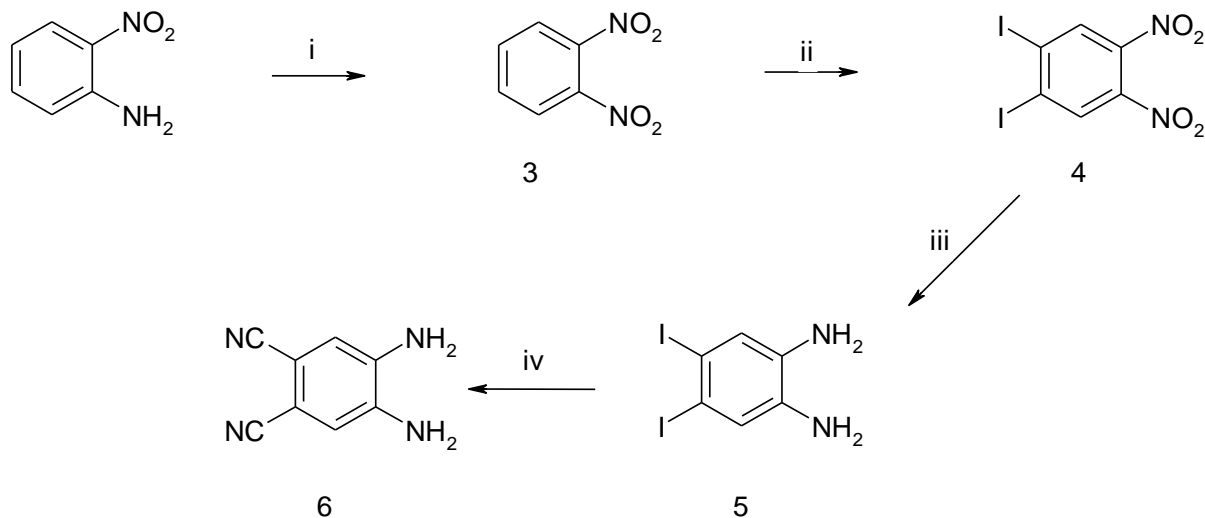
IČ v (cm⁻¹): 2961; 2919; 2861 (alkyl CH); 1711 (C=O); 1522; 1455; 1363; 1258; 1233; 1145.

¹H NMR (C₅D₅N) δ (ppm) 4,42 (t; 2H; $J=6,8$ Hz; S-CH₂); 3,77 (t; 2H; $J=6,7$ Hz; CH₂-COO); 2,99 (s; 3H; CH₃); 2,40 – 2,11 (m; 54H; SCCH₃).

¹³C NMR (C₅D₅N) δ (ppm) 174,76; 159,54; 158,94; 158,89; 158,74; 158,71; 158,57; 158,15; 153,18; 151,86; 151,83; 151,76; 151,63; 151,43; 150,99; 149,00; 148,68; 145,95; 145,40; 145,23; 145,06; 145,02; 144,98; 51,44; 51,38; 51,30; 51,06; 35,09; 30,83; 30,83; 30,75; 26,64; 22,65.

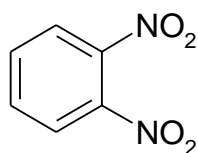
3.2 SYNTÉZA PREKURZORŮ ROZŠÍŘENÝCH AZAFTALOCYANINŮ

3.2.1 Schéma prováděných reakcí



- i $\text{NaBO}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, CH_3COOH
- ii I_2 , $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{SO}_3$
- iii Fe/HCl , $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$
- iv CuCN , 1-methylpyrrolidin-2-on, DMF

3.2.2 Příprava 1,2-dinitrobenzenu (3)

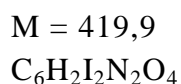
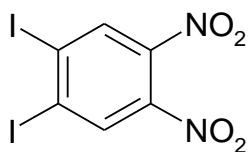


$M = 168,1$
 $\text{C}_6\text{H}_4\text{N}_2\text{O}_4$

50 g (362 mmol) *o*-nitroanilinu jsem rozpustila v 725 ml kyseliny octové a po dobu 2 hodin jsem roztok přikapávala do suspenze 278 g (1,81 mmol) perboritanu sodného ve 2 l kyseliny octové při 60 °C. Potom jsem reakční směs ještě nechala míchat 1 hodinu při 60 °C. Průběh reakce jsem kontrolovala na TLC s mobilní fází chloroform, kde R_f hodnota produktu byla 0,52. Reakce byla ukončena po 10 hodinách. Reakční směs jsem rozdělila do dvou dvoulitrových baněk a obsah každé jsem naředila vodou na objem 2 l. Vypadla žlutá sraženina, kterou jsem odsála, promyla vodou a překrystalizovala ze 400 ml ethanolu. Takto získaný produkt byl použit do následující reakce.

Výtěžek 32,5 g (53 %) žlutých jehliček.
T. t. 115,5-116,7 °C (lit. 118 °C¹³²).

3.2.3 Příprava 1,2-dijod-4,5-dinitrobenzenu (4)



63,7 g jodu (251 mmol) jsem nasypala do destilační baňky se 354 ml 20%-ního olea a nechala míchat 1 hodinu při laboratorní teplotě. Pak jsem přisypala 32,5 g (193 mmol) **3** a postupně během 1 hodiny jsem zvyšovala reakční teplotu až na 120 °C. Směs jsem nechala reagovat dalších 90 minut. Po ukončení reakce jsem reakční směs opatrně nalila na led a přidala jsem roztok pyrosiřičitanu sodného (Na₂S₂O₅) k likvidaci nezreagovaného jodu. Z roztoku se vysrážel produkt, který jsem odsála, důkladně promyla vodou, povařila s 250 ml ethanolu, zfiltrovala a nechala vykristalizovat. Nerozpuštěný zbytek na filtračním papíru jsem vyextrahovala třikrát acetonem. Filtráty jsem spojila, na vakuové odparce jsem odstranila rozpouštědlo aceton a překristalizovala z ethanolu. Produkt lze monitorovat na TLC s mobilní fází benzin:toluen 1:1.

Výtěžek 21,5 g (27 %) pevné žluté látky.

T. t. 180-182 °C (lit. 183-184 °C¹³³).

¹H NMR (CDCl₃) δ (ppm) 8,31 (s; 2H).

¹³C NMR (CDCl₃) δ (ppm) 114,29; 134,54; 141,44.

Pozn. - teploty tání možných dalších jodderivátů *o*-dinitrobenzenu (obr. 38) pro srovnání a potvrzení struktury 1,2-dijodo-4,5-dinitrobenzenu (**3**):

1-jodo-2,3- dinitrobenzen (a) 138 – 140 °C (ethanol)¹³⁴

1-jodo-3,4- dinitrobenzen (b) 74.5 °C (ethanol)¹³⁵

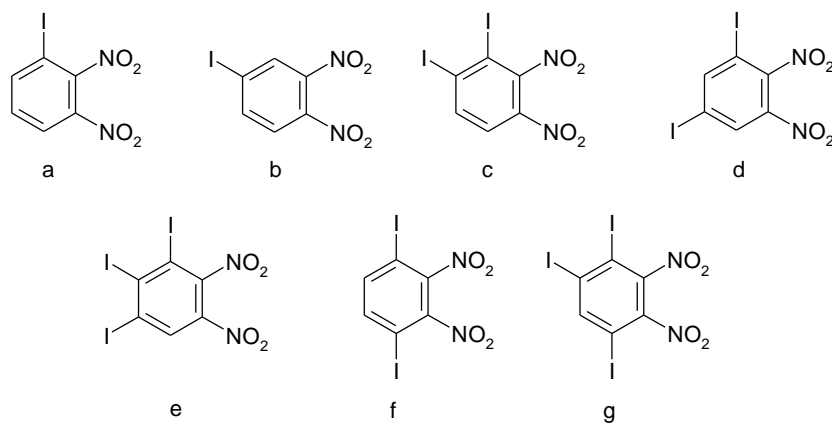
1,2-dijodo-3,4- dinitrobenzen (c) 184 °C (kyselina octová)¹³⁶

1,3-dijodo-4,5- dinitrobenzen (d) – nebyl nasyntetizován

1,2,3-trijodo-4,5- dinitrobenzen (e) – není zmíněná t.t.¹³⁷

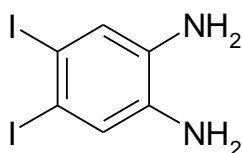
1,4-dijodo-5,6- dinitrobenzen (f) – nebyl nasyntetizován

1,2,4-trijodo-5,6- dinitrobenzen (g) – nebyl nasyntetizován



Obr. 38

3.2.4 Příprava 1,2-diamino-4,5-dijodbenzenu (5)



$$M = 359,9$$

$$C_6H_6I_2N_2$$

V trojhrdlé baňce jsem vařila pod zpětným chladičem při 110 °C 21,5 g (51,2 mmol) **4** ve 200 ml ethanolu s 90 ml kyseliny chlorovodíkové. Opatrně (pění!) jsem po částech přidávala 23,0 g (410 mmol) práškového železa a po posledním přidání jsem nechala směs reagovat ještě 45 minut. Pak jsem přilila horký roztok Na₂EDTA (Chelaton 3) 193,0 g v 370 ml vody a přidávala jsem zrnka KOH, dokud pH nebylo zásadité. Poté jsem produkt několikrát extrahovala horkým ethyl-acetátem. Organickou část jsem ještě několikrát vytřepala vodou, vysušila síranem sodným a zbavila rozpouštědla na vakuové odparce. Nakonec jsem produkt překrystalizovala ze směsi ethanol/voda.

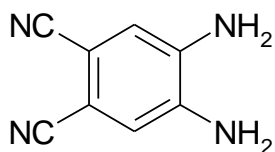
Výtěžek 9,3 g (51 %) bíložlutých velmi jemných jehliček.

T. t. 131,5 °C za rozkladu (lit. 135-136 °C¹³⁸).

¹H NMR (aceton-d₆) δ (ppm) 4,41 (bs, 4H, NH₂); 7,16 (s, 2H, aromH).

¹³C NMR (aceton-d₆) δ (ppm) 91,78; 125,22; 138,18.

3.2.5 Příprava 1,2-diaminoftalonitrilu (6)



$$M = 218,1$$

$$C_8H_6N_4$$

V čas potřeby jsem si připravila kyanid mědný. Smíchala jsem roztok CuSO_4 43 g (270 mmol)/220 ml vody a roztok Na_2SO_3 17 g (135 mmol)/55 ml. Pak jsem přisypala 20 g (400 mmol) NaCN , vznikla bílomléčná suspenze. Vzniklý CuCN jsem odsála, promyla vodou a nechala vysušit.

Výtěžek 25,4 g (70 %) bílých krystalků.

Do dvojhrdlé baňky jsem dala 9,3 g (25,8 mmol) **5** a 9,2 g (103,2 mmol) rozetřeného CuCN a 10 minut probublávala argonem. Přilila jsem 27 ml 1-methyl-pyrrolidin-2-onu a nechala reagovat 3 hodiny při 200 °C. Poté jsem reakční směs naředila 29 ml DMF a nalila jsem ji do horkého vodného roztoku EDTA 118 g v 740 ml vody, vznikla sraženina. Nechala jsem tuto suspenzi míchat při 90 °C a současně jsem ji probublávala kyslíkem 2 hodiny. Z heterogenní směsi vznikl homogenní tmavě zelený roztok, který jsem ještě horký několikrát extrahovala ethyl-acetátem. Extrakty jsem promyla několikrát vodou, vysušila síranem sodným a odstranila jsem rozpouštědlo za sníženého tlaku. Nakonec jsem produkt překrystalizovala z ethanolu/vody (1:3). Získaný produkt musí být uchováván pod argonem.

Výtěžek 2,9 g (72 %) béžovohnědých krystalků.

Pomalou se rozkládá od 245 °C (lit. 260- 264 °C rozklad¹³⁹).

¹H NMR (aceton- d_6) δ (ppm) 5,38 (bs; 4H; NH_2); 7,03 (s; 2H; aromH).

¹³C NMR (aceton- d_6) δ (ppm) 104,36; 117,72; 139,99.

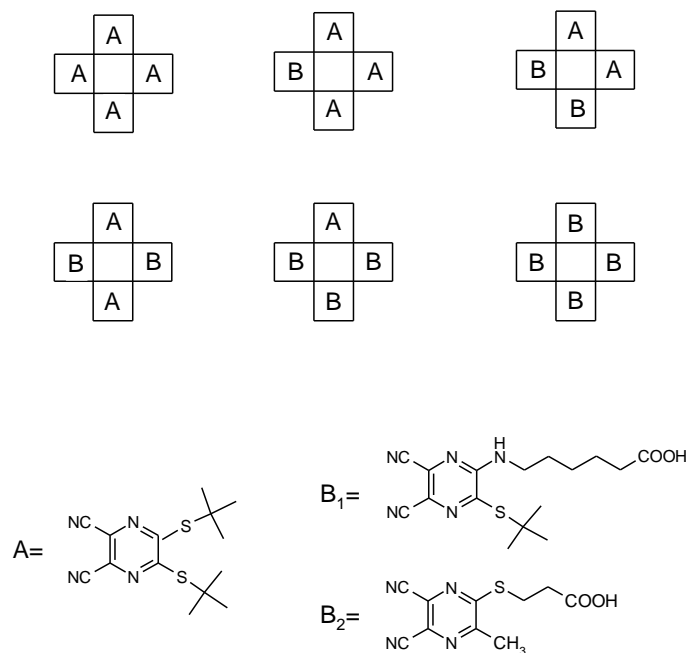
4. DISKUSE

V první fázi své práce jsem syntetizovala nesymetrické deriváty AzaPc s jednou volnou karboxylovou skupinou. AzaPc jsou skupinou látek, které se obvykle připravují cyklizací svých prekurzorů. Jako prekurzory jsem použila různě substituované deriváty pyrazin-2,3-dikarbonitrilu.

Použila jsem právě tyto tři prekurzory: 5,6-bis(*tert*-butylsulfanyl)pyrazin-2,3-dikarbonitril (A), 6-(3-*tert*-butylsulfanyl-5,6-dikyanpyrazin-2-ylamino)hexanovou kyselinu (B₁) a 3-(5,6-dikyano-3-methyl-pyrazin-2-ylsulfanyl)propionovou kyselinu (B₂), protože u každého z nich nalezneme vlastnosti potřebné pro aplikaci AzaPc v PDT, které se odrážejí v samotném konečném produktu. Jednak je to *tert*-butylsulfanylová skupina, jejíž objemnost umožňuje dobrou monomerizaci plochých molekul AzaPc v roztoku a usnadňuje separaci a čištění. Druhou dobrou vlastností alkylsulfanylových substituentů je jejich pozitivní vliv na produkci singletové kyslíku⁶⁶. Dále je to pak karboxylová skupina, kterou je možno využít do dalších reakcí (možnost konjugace s biomolekulami).

Cyklizační reakce probíhaly bez problému podle již ověřených postupů za použití octanu zinečnatého. Pro přípravu jsem použila „statistický přístup“ (viz. Metodická část – 2.2.3.1 Syntéza A₃B azaftalocyaninů - Statistická kondenzace) s následným chromatografickým dělením vzniklé směsi. Díky přítomnosti různého počtu silně polárních COOH skupin jednotlivé deriváty ve směsi (typ AAAA, AAAB, ABAB, AABB, ABBB,BBBB - obr. 39) vykazovaly dostatečně rozdílné hodnoty R_f a tak jsem bez větších problémů vyizolovala požadovaný derivát typu AAAB - s jednou volnou karboxylovou kyselinou. U derivátů typu AABB, ABAB, ABBB a BBBB vzniká navíc větší množství polohových izomerů, které ovšem nebyly detekovány.

Připravené látky byly poté podrobeny testům na singletový kyslík a výsledky publikovány: Zimcik, P., M. Miletin, Z. Musil, K. Kopecky, D. Slajsova: Synthesis and characterization of novel unsymmetrical azaphthalocyanines with one carboxylic group, *Dyes Pigment. in press.* [doi:10.1016/j.dyepig.2007.05.013](https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2007.05.013) (viz příloha).



Obr. 39

Ve druhé části své práce jsem připravovala prekurzory pro syntézu rozšířených AzaPc. Cílovou látkou, kterou jsem měla syntetizovat, byl 1,2-diaminoftalonitril, který lze následně podrobit různým kondenzacím s vybranými vicinálními diketony, a je proto zajímavým prekurzorem pro syntézu substituovaných chinoxalin-6,7-dikarbonitrilů. Výchozí látkou byl *o*-nitroanilin, který byl převeden v několika krocích na 1,2-diaminoftalonitril a to podle syntéz W. J. Youngblooda¹³⁸. V prvním kroku byl *o*-nitroanilin oxidován na 1,2-dinitrobenzen, ten byl následně podroben jodaci v polohách 4 a 5 a nitroskupiny byly redukovány. Posledním krokem byla substituce atomů jodu kyanoskupinami. Jednotlivé kroky syntézy probíhaly bez problémů až na jeden, a tím byla jodace dinitroderivátu.

K jodaci jsem použila 20%-ní oleum (kyselina sírová nasycená oxidem sírovým) a jodu, kde se jodačním činidlem stává I_3^+ (viz. Metodická část - 2.3.1.1 Jodace benzenu, jeho homologů a derivátů). Při prvním pokusu zřejmě k jodaci nedošlo. Tomu nasvědčovala naměřená teplota tání (116,6-117,9 °C) získaného produktu, která spíše odpovídala výchozímu 1,2-dinitrobenzenu. Tato domněnka byla potvrzena i na TLC s mobilní fází chloroform, kde se objevila jen skvrna odpovídající výchozí látce. K jodaci opravdu nedošlo a výchozí látka byla tedy jen přečištěna. Protože jsem měla k dispozici několik lahví s oleem, reakci jsem opakovala. Zvolila jsem láhev, ze které při otevření oleum dýmalo nejvíce (zřejmě dost nasycené SO_3). Navíc jsem velmi opatrně během 1 hodiny zvedala reakční teplotu až na 120 °C, protože jod velmi rychle sublimoval u usazoval se v chladiči. Tentokrát se reakce zdařila, došlo k jodaci.

Je zřejmé, že je potřeba použít dostatečně nasycené oleum, aby došlo k jodaci. Oxid sírový oxiduje jod na I_3^+ , který následně joduje aromatický kruh. Při nedostatečné nasycenosti olea nevzniká vlastní reakční činidlo, a proto k reakci nedochází.

Látky z této druhé části byly charakterizovány pouze teplotou tání a NMR spektry, aby byla potvrzena jejich totožnost. Jedná se ve všech případech o již syntetizované a popsané látky, které byly připravovány pouze k použití do dalších reakcí.

5. ZÁVĚR

V rámci své rigorózní práce jsem se pokoušela připravit jednak prekurzory pro přípravu rozšířených AzaPc, tak i samotné nesymetrické AzaPc s jednou volnou karboxylovou skupinou. Tyto typy azaftalocyaninů by v budoucnu mohly být použity jako PS třetí generace v PDT.

Pro cyklizaci zinečnatých komplexů nesymetrických AzaPc jsem použila tři různé prekurzory:

- 5,6-bis(*terc*-butylsulfanyl)pyrazin-2,3-dikarbonitril
- 6-(3-*terc*-butylsulfanyl-5,6-dikyanpyrazin-2-ylamino)hexanovou kyselinu
- 3-(5,6-dikyano-3-methyl-pyrazin-2-ylsulfanyl)propionovou kyselinu

Při tetramerizaci vzniká směs šesti isomerů a bylo tedy potřeba jednotlivé isomery od sebe oddělit. Pro separaci jsem použila sloupcovou chromatografii, čímž jsem získala požadované produkty:

- [2,9,10,16,17,23,24-heptakis(*terc*-butylsulfanyl)-3-(5-karboxypentylamino)-1,4,8,11,15,18,22,25(oktaaza)ftalocyaninato] zinečnatý komplex
- [9,10,16,17,23,24-hexakis(*terc*-butylsulfanyl)-2-(2-karboxyethylsulfanyl)-3-methyl-1,4,8,11,15,18,22,25(oktaaza)ftalocyaninato] zinečnatý komplex

Dále jsem připravila prekurzory pro syntézu rozšířených AzaPc. Za výchozí látku byl zvolen *o*-nitroanilin, ze kterého byl v několika krocích (oxidace aminoskupiny, jodace, redukce nitroskupin a substituce atomů jodu kyanoskupinami) přes meziprodukty:

- 1,2-dinitrobenzen
- 1,2-dijod-4,5-dinitrobenzen
- 1,2-diamino-4,5-dijodbenzen

nasyntetizován:

- 1,2-diaminoftalonitril

6. PŘÍLOHA

SYNTÉZA NESYMETRICKÝCH DERIVÁTŮ AZAFTALOCYANINŮ PRO TŘETÍ GENERACI FOTOSENZITIZÉRŮ A JEJICH PREKURZORŮ

Šlajsová Dana

*Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv, Farmaceutická fakulta v Hradci
Králové, Univerzita Karlova v Praze*

Nesymetrické zinečnaté komplexy azaftalocyaninů (AzaPc) typu tetrapyrazinoporfyrazinů s jednou karboxylovou kyselinou (typu AAAB) byly připraveny statistickou kondenzací 5,6-bis(*terc*-butylsulfanyl)pyrazin-2,3-dikarbonitrilu (A) s 6-(3-*terc*-butylsulfanyl-5,6-dikyanpyrazin-2-ylamino)hexanovou kyselinou (B₁) nebo 3-(5,6-dikyano-3-methyl-pyrazin-2-ylsulfanyl)propionovou kyselinou (B₂). Byly použity právě tyto tři prekurzory, protože každý z nich má vlastnosti vhodné pro aplikaci AzaPc ve fotodynamické terapii. Tyto vlastnosti se odrážejí i v samotném konečném produktu – objemnost *terc*-butylsulfanylové skupiny umožňující dobrou monomerizaci plochých molekul AzaPc v roztoku a usnadňující separaci a čištění, pozitivní vliv alkylsulfanylových substituentů na produkci singletového kyslíku a karboxylová skupina, kterou lze využít do dalších reakcí (možnost konjugace s biomolekulami). Pro cyklizaci byla zvolena standardní metoda za použití bezvodého octanu zinečnatého. Konečné sloučeniny byly charakterizovány pomocí IČ, NMR a UV-Vis spektrálních metod.

Při přípravě prekurzorů pro syntézu rozšířených AzaPc (např. benzimidazoporfyrazinů, chinoxalinoporfyrazinů, aj.) byl výchozí látkou zvolen *o*-nitroanilin, ze kterého byl ve čtyřech krocích (oxidace aminoskupiny, jodace, redukce nitroskupin a substituce atomů jodu kyanoskupinami) nasyntetizován 1,2-diaminoftalonitril. Tuto sloučeninu lze následně podrobit různým kondenzacím s vybranými vicinálními diketony, a proto je zajímavým prekurzorem pro syntézu substituovaných chinoxalin-6,7-dikarbonitrilů.

SYNTHESIS OF UNSYMMETRICAL DERIVATES OF AZAPHTALOCYANINES FOR THE THIRD GENERATION OF PHOTSENSITISERS AND SYNTHESIS OF THEIR PRECURSORS

Slajsova Dana

Department of Pharmaceutical Chemistry and Drug Control, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Charles University in Prague

Unsymmetrical zinc complexes of azaphtalocyanines (AzaPc) of tetrapyrazinoporphyrazine type with one carboxylic acid (AAAB) were synthesized using statistical condensation of 5,6-bis(*tert*-butylsulfanyl)pyrazine-2,3-dicarbonitrile (A) with 6-(3-*tert*-butylsulfanyl-5,6-dicyanopyrazine-2-ylamino)hexanoic acid (B₁) or 3-(5,6-dicyano-3-methyl-pyrazine-2-ylsulfanyl)propionic acid (B₂). These precursors were chosen because each of them takes advantage of suitable properties to application of AzaPc in photodynamic therapy. These properties are demonstrated in final products too. Bulky *tert*-butylsulfanyl ensures good monomerisation of planar molecules of AzaPc in a solution and consequently allows efficient separation and purification. Positive influence of alkylsulfanyl substituent on singlet oxygen production has been already shown earlier. Carboxy group that can be further functionalized (e.g. conjugation with biomolecules) brings into the AzaPc the modifiable moiety. The standard cyclization process with anhydrous zinc acetate was applied. The final compounds were characterized using IR, NMR, UV-Vis spectroscopic methods.

O-nitroanilin was chosen as a starting material for the synthesis of precursors of enlarged AzaPc (for example benzimidazoporphyrazines, chinoxalinoporphyrazines etc.). It was converted to 1,2-diaminofalonitril in four steps (oxidation of aminogroup, iodation, reduction of nitrogroups and substitution of iodine atoms by cyanogroups). This product can be used in different condensation reactions with vicinal diketones and thus it is a suitable compound to preparation of substituted chinoxaline-6,7-dicarbonitriles.

7. LITERATURA

1. BONNET, R.: *Rev. Contemp. Pharmacother.*, **1999**, 10, 1.
2. AHMAD, N.; MUKHTAR, H.: *Methods Enzymol.*, **2000**, 319, 342.
3. ALLEN, C. M.; SHARMAN, W. M.; MADELEINE, C. et al.: *Photochem. Photobiol.*, **1999**, 70, 512.
4. EDELSON, M. F.: *Sci. Am.*, **1988**, 68,259.
5. SCHMITT, I. M.; CHIMENTI, S.; GASPARRO, F. P.: *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, **1995**, 27, 101.
6. RAAB, O.: *Z. Biol.*, **1900**, 39, 524.
7. VON TAPPEINER, H.: *Muench. Med. Wochenschr.*, **1903**, 47, 2042.
8. MEYER-BETZ, F.: *Dtsch. Arch. Klin. Med.*, **1913**, 112, 476.
9. POLLICARD, A.: *C. R. Hebd. Soc. Biol.*, **1925**, 91, 1422.
10. DIAMOND, I.; GRANELLI, S. G.; McDONAGH, A. F. et al.: *Lancet*, **1972**, 2, 1175.
11. LIPSON, R. L.; GAY, M. J.; BALDES, E. J.: *Ninth Internat. Cancer Congr., Tokyo, Japan*, **1966**, 393.
12. DOUGHERTY, T. J.; GRINDEY, G. B.; FIEL, R.: *J. Natl. Cancer Inst.*, **1975**, 55, 155.
13. SCHWARTZ, S. K.; ABSOLON, K.; VERMUD, H.: *Univ. Minn. Med. Bull.*, **1955**, 27, 7.
14. STERNBERG, E. D.; DOLPHIN, D.; BRÜCKNER, CH.: *Tetrahedron*, **1998**, 54, 4151.
15. DOUGHERTY, T. J.: *Photochem. Photobiol.*, **1993**, 58, 895.
16. MOSS, G. B.: *Pure Appl. Chem.*, **1987**, 59, 779.
17. NYMAN, E.; HYNINEN, P. H.: *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, **2004**, 73, 1.
18. PADNEY, R. K.; HERMAN, CH. K.: *Chem. Ind.*, **1998**, 739.
19. QLT, inc. [online] (2006) [cit. 2007-01-08]. Dostupné z www.qlt-pdt.com.
20. DUSA Pharmaceuticals [online] (2006), [cit.2003-10-06]. Dostupné z www.Dusapharma.com.
21. PHOTOCURE ASA [online] (2006), [cit. 2007-01-08]. Dostupné z www.photocure.com.
22. BIOLITECPHARMA, ltd. [online] (2003), posled. revize 5.8.2005, [cit. 2007-01-08]. Dostupné z www.biolitecpharma.com.
23. LIGHT SCIENCES CORPORATION [online] (2006), [cit. 2007-01-08]. Dostupné z www.lightsciences.com.
24. SHARMAN, W. M.; ALLEN, C. M.; VAN LIER, J. E.: *Methods Enzymol.*, **2000**, 319, 376.
25. PHILLIPS, D.: *Progr. React. Kinet.*, **1997**, 22, 175.
26. STABLES, G. I.; ASH, D. V.: *Cancer Treat. Rev.*, **1996**, 21, 311.
27. MOAN, J.; PENG, Q.; SORENSEN, R. et al.: *Endoscopy*, **1998**, 30, 387.
28. FUCHS, J.; THIELE, J.: *Free Radic. Biol. Med.*, **1998**, 24, 835.
29. DOUGHERTY, T. J.; GOMER, C. J.; HENDERSON, B. W. et al.: *J. Natl. Cancer Inst.*, **1998**, 90, 889.
30. HENDERSON, B. W.; DOUGHERTY. T. J.: *Photochem. Photobiol*, **1992**, 55, 145.
31. JORI, D.; SPIKES, J. D.: *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, **1990**, 6, 93.
32. FOOTE, C. S.: *Photochem. Photobiol.*, **1991**, 54, 659.
33. PATTERSON, M. S.; MADSEN, S. J.; WILSON, B. C.: *J. Photochem. Photobiol., B: Biol.*, **1990**, 5, 69.

-
34. SHARMAN, W. M.; ALLEN, C. M.; VAN LIER, J. E.: *Drug Discov. Today*, **1999**, 4, 507.
 35. ZIMČÍK, P.; MILETÍN, M.: *Ceska Slov. Farm.* **2004**, 53, 272.
 36. BONNET, R.; MARTÍNEZ, G.: *Tetrahedron*, 2001, 57, 9513.
 37. DOUGHERTY, T. J.; MANG, T. S.: *Photochem. Photobiol.*, **1987**, 46, 67.
 38. HUEGER, B. D.; LAWTER, J. R.; WARINGREKAR, V. H. et al.: United States patent No. 5059619, **1991**.
 39. GOMER, C. J.; FERRARIO, A.: *Cancer Res.*, **1990**, 505, 3985.
 40. DOLMANS, D. E. J. G. J.; FUKUMURA, D.; JAIN, R. K.: *Nat. Rev. Cancer*, **2003**, 3, 380.
 41. AXCAN [online] (2006) [cit. 2007-01-08]. Dostupné z www.axcan.com.
 42. RICHTER, A. M.; ERRUTI-SOLA, S.; STERNBERG, E. D. et al.: *J. Photochem. Photobiol., B: Biol.*, **1990**, 5, 231.
 43. BERENBAUM, M. C.; BONNET, R.; CHEVRETTON, E. B. et al.: *Laser Med. Sci.*, **1993**, 8, 235.
 44. RONN, A. M.; NOURI, M.; LOFGREN, L. A. et al.: *Laser Med. Sci.*, **1996**, 11, 267
 45. MACDONNALD, I. J.; DOUGHERTY, T. J.: *J. Porphyrins Phthalocyanines*, **2001**, 5, 105.
 46. MIRAVANT MEDICAL TECHNOLOGIES [online] (2006), [cit. 2007-01-08]. Dostupné z www.miravant.com.
 47. BOYLE, R. W.; DOLPHIN, D.: *Photochem. Photobiol.*, **1996**, 63, 469.
 48. STEWART, F.; BAAS, P.; STAR, W.: *Radiother. Oncol.*, **1998**, 48, 233.
 49. PHARMACYCLICS [online] (2006), [cit. 2007-01-08]. Dostupné z www.pharmacyclics.com.
 50. ZIMČÍK, P.: *Disertační práce, Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta, Hradec Králové*, **2003**.
 51. MOHR, H.; LAMBRECHT, B. SCHMITT, H.: *Imunol. Invest.*, **1995**, 24, 73.
 52. BRASSUER, N.; MENARD, I.; FORGET, A. et al.: *Photochem. Photobiol.*, **2000**, 72, 780.
 53. SZEIMIES, R. M.; KARRER, S.; ABELS, CH. et al.: *J. Photochem. Photobiol., B: Biol.*, **1996**, 34, 67.
 54. LENARD, J.; RABSON, A.; VANDEROEF, R.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1993**, 90, 158.
 55. OLIVO, M.; LAU, W.; MANIVASAGER, V. et al.: *Int. J. Oncol.*, **2003**, 23, 1501.
 56. KRÁL, V.; DAVIS, J.; ANDRIEVSKI, A. et al.: *J. Med. Chem.*, **2002**, 45, 1073.
 57. SCHNEIDER, R.; SCHMITT, F.; FROCHOT, C. et al.: *Bioorg. Med. Chem.*, 2005, 13, 2799-2808.
 58. DEMIDOVA, T. N.; HAMBLIN, M. R.: *Antimicrob. Agents Chemother.*, **2005**, 49, 2329-2335.
 59. LINARES, R.; PACHECO, J. R.; GOOD, T. A.: *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, **2004**, 77, 17-26.
 60. KHAN, E. H.; ALI, H.; TIAN, H. et al.: *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2003**, 13, 1287-1290.
 61. HAMBLI, M. R.; NEWMAN, E. L.: *Photochem. Photobiol.* **1994**, 26, 45.
 62. ANNEHEIM-HERBELIN, G.; PERRÉE.FAUVET, M.; GAUDEMÉR, A. et al.: *Tetrahedron*, **1993**, 33, 7263.
 63. ZIMCIK, P.; MILETIN, M.; PONEC, J. et al.: *J. Photochem. Photobiol., A: Chem.*, **2003**, 155, 127-131.
 64. PETRIK, P.; ZIMCIK et al.: *J. Porphyrins Phthalocyanines*, **2007**, 11, 487-495.

-
65. KUDREVICH, S. V.; VAN LIER, J.: *Coord. Chem. Rev.*, **1996**, 156, 163.
 66. ZIMČÍK, P.; MILETÍN, M.; KOSTKA, M. et al.: *J. Photochem. Photobiol., A: Chem.*, **2004**, 163, 21-28.
 67. GALPERN, M. G.; LUK'YANETS, E. A.: *Khim. Geterosykl. Soed.*, **1972**, 6, 858.
 68. OHTA, K.; WATABENE, T.; HASEBE, H. et al.: *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, **1989**, 1611.
 69. KLEINWÄCHTER, J.; SUBRAMANIAN, L. R.; HANACK, M.: *J. J. Porphyrins Phtalocyanines*, **2000**, 4, 498.
 70. FREYER, W. J.: *J. Pract. Chem.*, **1994**, 336, 693.
 71. OHTA, K.; WATABENE, T.; HASEBE, H. et al.: *Mol. Cryst. Liq. Cryst.*, **1991**, 196, 13.
 72. GEMA DE LA TORRE; CLAESSENS, G.; TORRES, T.: *Eur. J. Org. Chem.*, **2000**, 2821-2830.
 73. BRADBROOK, E. F.; LINSTED, R. P.: *J. Chem. Soc.*, **1936**, 1744-1748.
 74. WÖHRLE, D.; GITZEL, J.: *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, **1985**, 1171-1178.
 75. HANACK, M.; SCHMID, G.; SOMMERAUER, M.: *Engl. Chem. Int. ED Engl.*, **1993**, 32, 1422-1424.
 76. SOMMERAUER, M.; RAGER, C. ; HANACK, M.: *J. Am. Chem. Soc.*, **1996**, 118, 10085-10093.
 77. LEZNOFF, C.C.; HU, M.; NOLAN, K. J. M.: *Chem. Commun.*, **1996**, 1245-1246.
 78. KOBAYASHI, N.; KOBAYASHI, Y.; OSA, T.: *J. Am. Chem. Soc.*, **1993**; 115, 10994-10995.
 79. DREW, D. M.; LEZNOFF, C. C.: *Synlett*, **1994**; 623-624.
 80. AODIA, M.; CHENG, G.; KENNEDY, V. O. et al.: *J. Am. Chem. Soc.*, **1997**, 119, 6029-6039.
 81. ROJO, G.; DE LA TORRE G.; GARCÍA-RUIZ, J. et al.: *Chem. Phys.*, **1999**; 245, 27-34.
 82. ZIMCIK, P.; MILETIN, M.; MUSIL, Z. et al.: *J. Photochem. Photobiol., A: Chem.*, **2006**, 183, 59-69.
 83. McKEOWN, N. B.; CHAMBRIER, I.; COOK, M. J.: *J. Chem. Soc Perkin Trans.*, **1990**, 1169-1177.
 84. KOBAYASHI, N.; KONDO, R.; NAKAJIMA, S. I. et al.: *J. Am. Chem. Soc.*, **1990**, 112, 9640-9641.
 85. SASTRE, A.; TORRE, T.; HANACK, M.: *Tetrahedron Lett.*, **1995**; 36, 8501-8504.
 86. WEITEMEYER, A.; KLIESCH, H.; WÖHLER, D.: *J. Org. Chem.*, **1996**; 60, 4900-4904.
 87. SASTRE, A.; del REY, B.; TORRES, T.: *J. Org. Chem.*, **1996**; 61, 8591-8597.
 88. LEZNOFF, C. C.; HALL, T.W.: *Tetrahedron Lett.*, **1982**, 23, 3023-3026.
 89. HUDLICKÝ, M.: *Preparativní reakce v organické chemii, díl II., Halogenace a dehalogenace*, Nakladatelství Československé akademie věd, Praha, **1955**.
 90. SHARPE, A. G.: *J. Chem. Soc.*, **1952**, 4538.
 91. FISCHER, E.: *Ann.*, **1882**, 381, 123.
 92. HOFMANN, A. W.: *Ann* 67, **1848**, 61, 64.
 93. HÜBNER, H.; LELLMANN: *Ber.*, **1881**, 14, 207.
 94. FORBES, G. S.; NELSON, A. F.: *J. Am. Chem. Soc.* 59, **1937**, 693.
 95. GHOSH, J. C.; BHATTACHARYYA, S. K.: *Science and Culture (India)* 3, **1937**, 120; *Chem. Abstracts* 32, **1938**, 414.
 96. BREWSTER, R. Q.: *Org. Syntheses, Coll. Vol. II.*, **1943**, 347.

-
97. ALLEN, C. F. H.; CRESSMANN, H. W. J.; JOHNSON, H. B.: *Org. Syntheses*, **1947**, 27, 78.
 98. KEKULÉ, A.: *Ann.* 137, **1866**, 162.
 99. TCHITCHIBABINE, A.; VIALOTUT, M.: *Bull. Soc. Chim. France*, **1942**, 9, 631.
 100. WHEELER, H. L.; LIDDLE, L. M.: *Am. Chem. J.*, **1909**, 42, 498.
 101. GAERTNER, R.: *J. Am. Chem. Soc.*, **1952**, 74, 4950.
 102. JURD, L.: *Australian J. Sci. Research, Ser. A*, **1949**, 2, 111.
 103. BARKER, I. R. L.; WATERS, W. A. J.: *Chem. Soc.*, **1952**, 150.
 104. ALDOŠIN, T. D.; ČALYŠJAN, V. S.: *Žur. obščej chim.*, **1939**, 9, 748.
 105. BRENANS, P.; GIROD, C.: *Compt. Rend.*, **1928**, 186, 1553.
 106. DATTA, R. L.; CHATTEJEE, N. R.: *J. Am. Chem. Soc.*, **1917**, 39, 435.
 107. VARMA, P. S.; SEN-GUPTA, N. B.: *J. Indian Chem. Soc.*, **1934**, 11, 293.
 108. ALLEN, C. F. H.; CRESMANN, H. W. J.; JOHNSON, H. B.: *Org. Syntheses*, **1947**, 27, 78.
 109. BATKOWSKI, T.; PLAZEK, E.: *Roczniki Chem.*, **1951**, 25, 251.
 110. JURD, L.: *Australian J. Sci. Research, Ser. A*, **1950**, 3, 587.
 111. ELBS, K.; JAROSLAWZEW, A.: *J. Prakt. Chem.*, **1913**, 88, 92.
 112. KLAGES, A.; STORP, W.: *J. Prakt. Chem.*, **1902**, 65, 568.
 113. NEUMANN, G. S.: *Ann.*, **1887**, 241, 84.
 114. DAINS, F. B.; BREWSTER, R. Q.: *Org. Syntheses, Coll. Vol. I.*, **1932**, 316.
 115. BERLINER, E.: *J. Am. Chem. Soc.*, **1951**, 73, 4307.
 116. MESSINGER, J.; VORTMANN, G.: *Ber.*, **1889**, 22, 2312.
 117. HOFMANN, A. W.: *Ann.*, **1848**, 61, 64.
 118. WHEELER, H. L.; LIDDLE, L. M.: *Am. Chem. J.*, **1909**, 42, 498.
 119. ATORSKY, J.; BUTLER, R.; DARBY, A. C.: *Chem. Comm.*, **1966**, 650.
 120. MINNIS, W.: *Org. Syntheses, Coll. Vol. II.*, **1943**, 357.
 121. PECHMANN, H.: *Ber.*, **1894**, 27, 1889.
 122. RUPP, E.: *Ber.*, **1896**, 29, 1625.
 123. DATTA, R. L.; MITTER, H. K.: *J. Am. Chem. Soc.*, **1919**, 41, 287.
 124. BRADFIELD, A. E.; ORTON, K. J. P; ROBERTS, I. C.: *J. Chem. Soc.*, **1982**, 782.
 125. VARMA, P. S.; YASHODA, K. M.: *J. Indian Chem. Soc.*, **1939**, 16, 477.
 126. CIAMICIAN, G.; SILBER, P.: *Ber.* 18, **1763**, 1885.
 127. OST, H.: *J. Prakt. Chem.*, **1883**, 27, 279.
 128. BIRCKENBACH, L.; GOUBEAU, J.: *Ber.* 65, **1932**, 395.
 129. KOSTKA, M.; ZIMCIK, P. et al.: *J. Photochem. Photobiol., A: Chem.*, **2006**, 178, 16-25.
 130. MUSIL, Z.; ZIMCIK, P. et al.: *J. Porphyrins Phthalocyanines*, **2006**, 10, 122-131.
 131. ZIMCIK, P., MILETIN, M. et al.: *Dyes Pigment.* in press.
 132. SAMPATRAO, D.; NAIR, P.: *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2*, **1988**; 637-640.
 133. ATORSKY, J. et al.: *J. Chem. Soc.*, **1970**, 1480-1485.
 134. VIVIAN: *J. Org. Chem.*, **1956**, 21, 1188.
 135. ULLMANN; BIELECKI: *Chem. Ber.*, **1901**, 34, 2176.
 136. DEORHA, D. S.; SHARMA, H. L.: *J. Indian Chem. Soc.*; **1965**; 42, 101-104.
 137. STRUTSCHKOW; SOLENOWA: *Bull. Acad. Sci. USSR, Div. Chem. Sci.*, **1960**, 93.
 138. YOUNGBLOOD, W. J.: *J. Org. Chem.*, **2006**, 71, 3345-3356.
 139. MITZEL, F.; FITZGERALD, S.; BEEBY, A.; FAUST, R.: *Chem. Eur. J.*, **2003**, 9, 1233-1241.