

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



DIPLOMOVÁ PRÁCE

Syntéza asymetrických derivátů azaftalocyaninů VI.

Hradec Králové, 2008

Lenka Váchová

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

Datum

Podpis

*Ráda bych poděkovala PharmDr. Petru Zimčíkovi Ph.D. za jeho trpělivost,
ochotu i dobrou náladu.*

Věnováno vědě, moudrosti, mé rodině a psovi.

Obsah

1	Seznam zkratek	6
2	Cíl práce	7
3	Teoretická část	8
3.1	Postavení fotosenzitizéru v procesu PDT	8
3.2	Fotosenzitizér- jeho vlastnosti a struktura	11
3.3	Přehled fotosenzitizérů užívaných v PDT	13
3.3.1	Porfyriny	14
3.3.1.1	Porfimer sodný	14
3.3.1.2	5-aminolevulinová kyselina	17
3.3.2	Chloriny	19
3.3.2.1	Verteporfin	19
3.3.2.2	Temoporfin	21
3.3.2.3	Talaporfin	22
3.3.2.4	2-(1-hexyloxyethyl)-2-devinyl pyrofeoforbid a	23
3.3.3	Bakteriochloriny	25
3.3.3.1	Padoporfin	25
3.3.4	Ftalocyaniny	26
3.3.5	Naftalocyaniny	27
4	Metodická část	28
4.1	Syntéza ftalocyaninů a azaftalocyaninů	28
4.1.1	Syntéza nesymetrických Pc – metoda nesymetrického prekurzoru	30
4.1.2	Syntéza nesymetrických Pc – metoda dvou různých prekurzorů 31	
4.1.2.1	Syntéza A ₃ B ftalocyaninů	32
4.1.2.2	Syntéza ABAB ftalocyaninů	36
4.1.2.3	Syntéza AABB ftalocyaninů	37
5	Experimentální část	39
5.1	Měřicí přístroje a chemikálie	39
5.2	Schéma přípravy	40
5.3	Syntéza	42
5.3.1	Příprava 2,9,16,23-tetrakis(terc-butylsulfanyl)-3,10,17,24-tetrakis (diethylamino)-1,4,8,11,15,18,22,25-(oktaaza)ftalocyaninato zinečnatého komplexu (2)	42
5.3.2	Příprava 5-chlor-6-(2-hydroxyethylmethylamino)pyrazin-2,3-dikarbonitrilu (4)	43

5.3.3	Příprava 5-(terc-butylsulfanyl)-6-(2-hydroxyethylmethylamino)pyrazin-2,3-dikarbonitrilu (6)	43
5.3.4	Syntéza látek (8) – (22)	45
6	Diskuze	48
7	Závěr	51
8	Seznam použité literatury.....	54

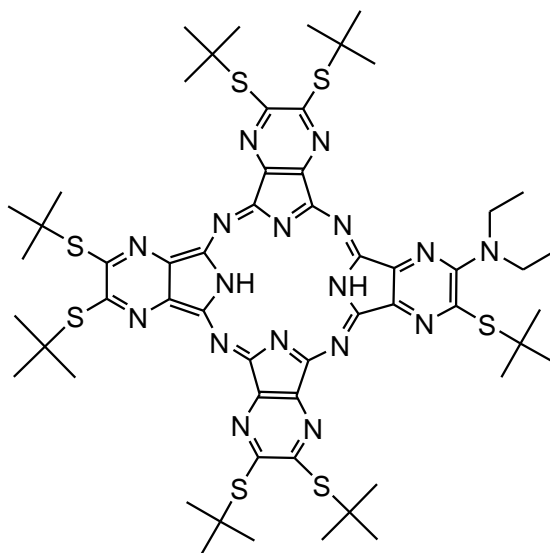
1 Seznam zkratek

5-ALA	5- aminolevulinová kyselina
AMD	věkem podmíněná makulární degenerace
AzaPc	azaftalocyanin
DBU	diazabicyklo-[5,4,0]-undec-7-en
HpD	hematoporfyrinové deriváty
HPPH	2-(1-hexyloxyethyl)-2-devinyl pyrofeoforbid a
PDT	fotodynamická terapie
PEG	polyethylenglykol
PpIX	protoporfyrin IX
PS	fotosenzitizér
TFA	kyselina trifluoroctová
TPPS ₄	<i>meso</i> -tetra(<i>p</i> -sulfofenyl)porfyrin
VEGF	cévní endoteliální růstový faktor (vascular endothelial growth factor)

2 Cíl práce

Cílem mé diplomové práce byla syntéza nesymetrických dusíkatých analogů ftalocyaninů s různými substitucemi na periferii (př. **Obr. 1.**). Tyto fotoaktivní látky mají potenciál používat se při fotodynamické terapii (photodynamic therapy, PDT), v současné době intenzivně studované, nové možnosti terapie nádorových i nerakovinných onemocnění. Snažila jsem se připravit látky, díky nimž by se daly objasnit závislosti chemické struktury, resp. periferní substituce, na produkci singletového kyslíku jako ukazateli účinnosti PDT. Syntéza byla zaměřena na látky s odlišným počtem dusíkatých skupin na periferii azaftalocyaninového makrocyklu. Protože tyto sloučeniny nebyly ještě připravovány, bylo mým cílem nalézt nejvhodnější postup syntézy.

Součástí mé diplomové práce bylo i vypracování rešerše o používaných fotosenzitizérech, jejich vlastnostech a struktuře.



Obr. 1. Příklad jednoho ze syntetizovaných azaftalocyaninů

3 Teoretická část

3.1 Postavení fotosenzitizéru v procesu PDT

Využití světelné energie jako hnací síly chemické reakce můžeme nalézt u nejdokonalejšího systému, a to přírody. Světlo je nezbytné k přeměně oxidu uhličitého a vody na sacharidy. Fotosyntéza je tak důkazem nejjednodušší a velmi efektivní modifikace světelné energie na energii chemickou. Její princip se stal inspirací pro řadu oblastí lidské činnosti. Terapeutický účinek světla byl již před tisíciletími využíván k léčbě některých kožních onemocnění. Poznatky z fototerapie daly základ i dnešní fotodynamické terapii, která využívá při svém účinku tři základních komponent. Vedle světla je to přítomnost tkáňového kyslíku a fotosenzitizující látky (photosensitizer, PS), tedy složek, které jsou (nebo by měly být) samostatně netoxické. Až po jejich vzájemné interakci dochází působením světla k přeměně kyslíku na volné kyslíkové radikály a singletový kyslík. Ty napadají okolní biomolekuly a způsobují jejich oxidaci, která vede k destrukci zasažených buněk.

Fotosenzitizér plní v procesu PDT nejdůležitější úlohu a je pro účinnost fotosenzitizace klíčovým faktorem. Jedná se o látku, která má schopnost absorbovat kvanta světelné energie určité vlnové délky a použít je k uskutečnění chemických reakcí v buňkách. V případě PDT se jedná o produkci cytotoxických reaktivních forem kyslíku, které jsou zhruba tisíckrát reaktivnější než základní molekulární stav. Po absorpci světla dochází ve fotosenzitizéru ke vzniku excitovaných stavů a k přesunu transformované energie na kyslík se vznikem singletového kyslíku (fotoproces typu II, **Schéma 1**), který vede k oxidaci membránových lipidů a proteinů. Tento proces má největší schopnost poškodit tkáň při fotodynamické terapii¹. Dále může excitovaná forma fotosenzitizéru reagovat přímo se substrátem a pomocí přenosu protonu nebo elektronu zde vytvořit volné radikály substrátu nebo radikálové ionty, které mohou interagovat s kyslíkem (fotoproces typu I). Volné radikály, především radikály lipidických složek buněčných membrán, jsou pak příčinou destrukce nádoru. Předpokládá se, že oba mechanismy mohou probíhat při PDT současně, avšak jejich relativní podíl na destrukci nádoru závisí na typu a koncentraci PS, na koncentraci

kyslíku v nádoru a na vazbě fotosenzitizéru na substrát. Výsledným terapeutickým efektem je nekróza, současně s apoptózou nádorových buněk.

Významnou vlastností barviv, která vykazují fotodynamický efekt, je jejich fluorescence. Excitovaný stav - první singletový, který se uplatňuje při fluorescenci, nemá pro fotodynamický účinek význam z důvodu krátké doby života (10^{-9} s). Fotodynamicky aktivní jsou sloučeniny, které mohou tvořit excitované stavy s dlouhou dobou života (10^{-6} s), tzv. tripletové stavy, vznikající vnitřním přechodem ze svých excitovaných singletových stavů².

Mechanismus fotodynamické reakce tedy spočívá v absorpci kvanta světelné energie fotosenzitizérem, který vstupuje do vysokoenergetického tripletového stavu. Tripletový stav má relativně dlouhou dobu života a vrací se do základního stavu přenosem energie na molekulární kyslík, z něhož vzniká cytotoxický singletový kyslík (znázorněno na **Schéma 1**). Ten následně způsobuje alteraci celulárních membránových systémů cestou lipidové peroxidace a poškození proteinů, což se projeví cytolýzou a tumorózní destrukcí.

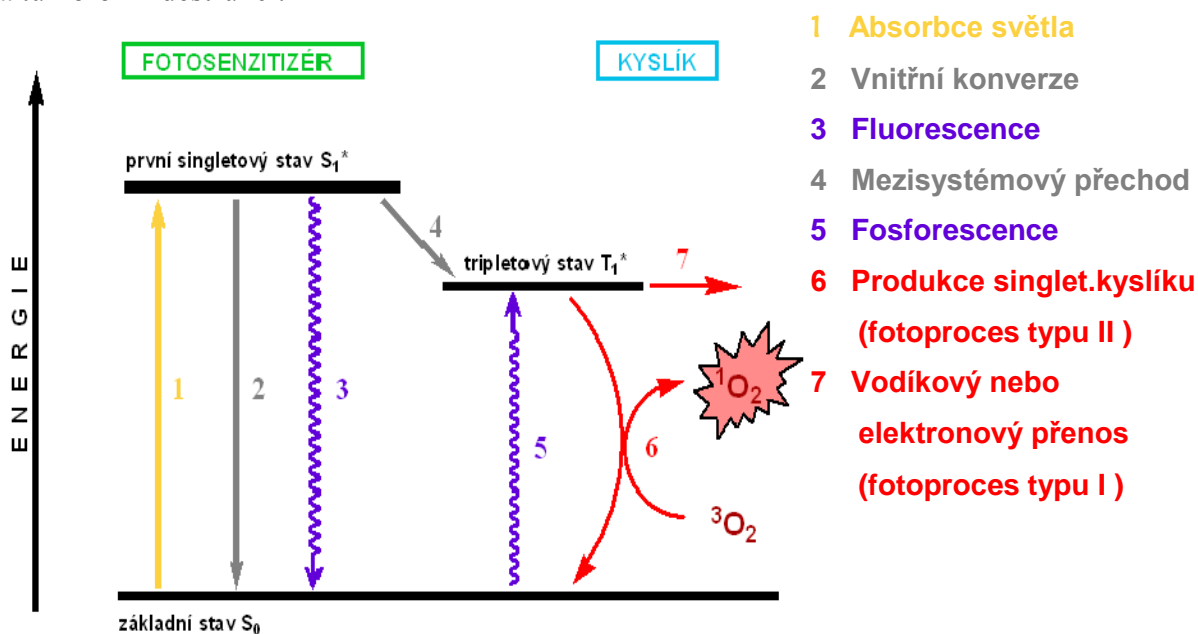
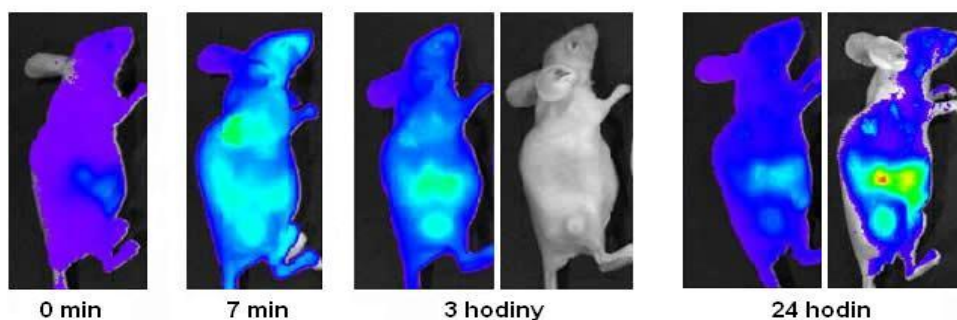


Schéma 1. Zjednodušený Jablonského diagram

Ne všechny molekuly absorbující světlo se dají považovat za fotosenzitizéry. Většina světlo pohlcujících molekul získanou energii následovně ztratí prostřednictvím nezářivého rozkladu (vnitřní konverze- viz proces 2 na předchozím schématu), a to většinou v podobě uvolněného tepla. Fotosenzitizéry na druhé straně spíše převádí excitační energii dalším molekulám, nejčastěji molekulovému kyslíku. Ve většině případů je důvodem větší efektivity přenosu elektronu či energie u PS fakt, že se lépe

konvertují přes mezisystémový přechod ze singletového do tripletového stavu (proces 4)³.

Specifickým místem zásahu na subcelulární úrovni jsou různé oblasti pro různé třídy fotosenzitizérů se vztahem k aktuální lokalizaci fotosenzitizéru v buňce v čase fotoaktivace. Selektivní tumorózní destrukce při fotodynamické léčbě je dosaženo přednostním hromaděním fotosenzitizéru v maligní tkáni. Nejčastěji používané hematoporfyrinové deriváty včetně Photofrinu jsou po *i.v.* podání nejprve vychtány většinou normálních tkání i nádorových buněk, ale po 24 hodinách zůstávají selektivně retinovány v tumorózní tkáni, kůži a v parenchymatózních orgánech. Na následujícím obrázku je znázorněn časový průběh saturace nádorových buněk fotosenzitizérem u myši⁴.



Obr. 2.

Po ozáření patologického ložiska zářením příslušné vlnové délky světla postihuje fotochemická reakce nejen vlastní nádorové buňky, ale i cévní složku tumoru, což vede k ischemické nekróze. PDT v nízkých dávkách naopak ovšem může stimulovat sekreci cytokinů a růstových faktorů, které mohou mít pro-angiogenní efekt².

Nádorové buňky nemusí být přímým cílem fotodynamické terapie, ale mohou být usmrceny nepřímo, jako důsledek poškození jiných typu buněk, např. cévních endoteliálních buněk⁵. Citlivost cév na PDT je výsledkem fyziologických faktorů, např. vysoké koncentrace jak kyslíku, tak PS v krevním řečišti. Někdy mohou být pro výsledek PDT důležitější rozdíly mezi integritou cévního systému nádorů a sousedních normálních tkání než to, jak proniká léčivo do nádorových buněk. To platí v případech, je-li primárním místem působení fotodynamické terapie cévní systém nádoru.

3.2 Fotosenzitizér- jeho vlastnosti a struktura

Fyzikální, spektrální i farmakokinetické vlastnosti fotosenzitizéru jsou dány jeho strukturou. Ta určuje konkrétní účinnost, selektivitu k nádoru, způsob podání, zdroje záření a míru dlouhodobé citlivosti na světlo, která je jedním z hlavních nežádoucích účinků PDT. Výběrem vhodných charakteristik jako je agregace, iontový náboj, rozpustnost ve vodě a lipidech, jsme schopni ovlivnit dobu zadržení PS v tkáních⁶.

Obecně platí, že prostupnost světla biologickými tkáněmi roste s vyšší vlnovou délkou. Limitujícím faktorem je skutečnost, že světlo potřebné k aktivaci fotosenzitizéru prochází maximálně do 3 cm tkáně. To je důvodem, proč je léčba u metastazujících a rozsáhlých maligních ložisek méně účinná⁷.

Podobně jako u všech barviv dochází u fotosenzitizéru k „photobleachingu“, neboli vyblednutí. Makrocycl po ozáření podléhá sebedestrukci, která má za následek ztrátu intenzity absorpce. Stabilita fotosenzitizéru na světle se snižuje s absorpcí ve vyšších vlnových délkách. Tato nízká stabilita může být při terapii omezením, ale také výhodou, protože fotosenzitizér je pak vylučován z těla rychleji, což snižuje dlouhodobou fototoxicitu.

Současné úsilí je soustředěno k tomu, aby se vlastnosti přiblížily ideálnímu fotosenzitizéru, který:

▶ ***je chemicky čistá látka známého složení***

Porfimer sodný, PS první generace, je necharakterizovaná směs mono-, di- a oligomerů derivatizovaného hematoporfyrinu v různém stupni purifikace, z čehož vyplývají i problémy čistoty, stanovení konkrétního množství a délky záření. Stejnorodé složení je i podmínkou reprodukovatelnosti výsledků.

▶ ***má vysokou absorpci v červené oblasti viditelného světla***

S vyšší vlnovou délkou světla roste schopnost penetrace tkáněmi, ale klesá jeho energie, a tím i schopnost excitovat fotosenzitizér⁸. Optimální penetrace tkáně světlem nastává mezi 680 nm do 800 nm, kdy je prostup světla v poměru k energii nutné pro účinnou produkci singletového kyslíku nejvýhodnější.

▶ ***má značnou schopnost preferenčně se kumulovat v patologické tkáni oproti tkáni zdravé***

Tím by se snížila systémová toxicita i problém hromadění PS v kůži a podkoží, jež má za následek velmi omezující dlouhodobou kožní fototoxicitu (u HpD trvající až 8 týdnů). Selektivita může být způsobena vyšší rychlostí dělení neoplastických buněk,

horším lymfatickým systémem, děravým krevním systémem nádoru a lepší interakcí PS díky náboji, velikosti a struktuře sloučeniny⁹.

▶ ***dosahuje dobrých kvantových výtěžků tripletového stavu a následně singletového kyslíku***

Pro účinnost léčby je produkce singletového kyslíku důležitým kvantitativním aspektem. Naprostá většina PS momentálně používaných v klinické praxi nebo testovaných v PDT dosahuje produkce singletového kyslíku v rozmezí od 0,2 do 0,8.

▶ ***je rychle extrahován, především z kůže a očí***

Polarita molekuly určuje rychlost distribuce i extrakce. Zatímco polární charakter umožňuje molekulám lepší transport krví, rychlejší vstřebávání i vylučování, nepolární naopak dovoluje průchod do buněk skrz biologické membrány. Na druhou stranu lipofilita napomáhá kumulaci zbylého PS, který zůstane v krevním řečišti a způsobuje systémovou toxicitu. Je proto výhodné, aby PS měl amfifilní charakter.

▶ ***je minimálně toxický ve tmě***

PS i jeho rozkladné metabolity by měly vyvolat toxicitu pouze při ozáření světlem vhodné vlnové délky¹⁰.

▶ ***je snadno dostupný, finančně přijatelný a modifikovatelný***

Předností je snadná výroba a syntéza. Modifikace postranního řetězce slouží zejména k vylepšení farmakokinetických vlastností.

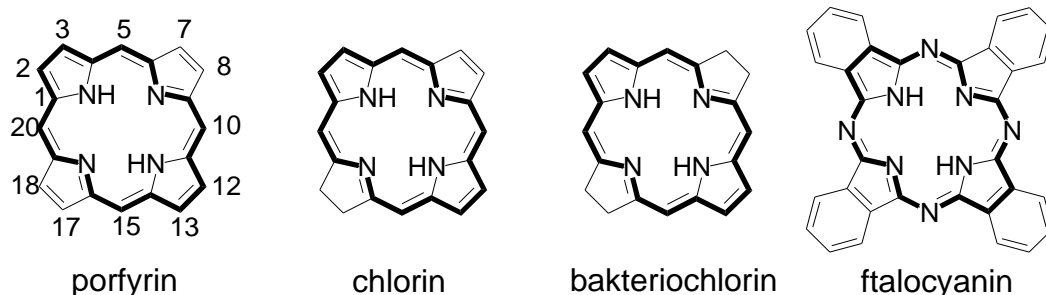
▶ ***vykazuje fluorescenci***

Fotoaktivní látku produkující fluorescenci je možné vizuálně kontrolovat, a to jednak *in vitro* nebo *in vivo*. Makrocikly by za použití fluorescenční mikroskopie mohly být využity ke značení subcelulárních struktur⁸.

▶ ***je stabilní při skladování i aplikaci na světle***

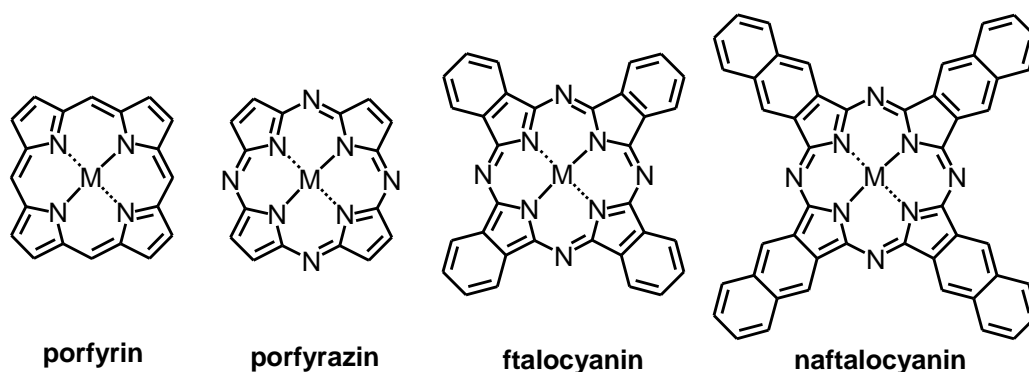
Je zřejmé, že všechny z výše uvedených kritérií nemůže žádná z látek splňovat. U novějších PS se pouze k vlastnostem takového ideálu přibližujeme.

Struktura většiny v současné době používaných fotosenzitizérů vychází z porfyrinového kruhu, aromatického systému obsahujícího 22 π -elektronů, z nichž jen 18 je delokalizováno. Základní skelet tvoří 4 pyrrolové kruhy spojené můstky do aromatického makrociklu. Takto vzniklý systém konjugovaných dvojných vazeb podstatně mění fotofyzikální vlastnosti (**Obr. 3**).



Obr. 3. Na struktuře významných PS je tučně vyznačen 18 π -elektronový [18]-annulenový systém konjugovaných dvojných vazeb

Všechny porfyrinové sloučeniny mají dva důležité absorpční pásy – Soretův (známý jako B- pás) kolem 400 nm a Q-pás v oblasti 600- 800 nm. Q - pás je pro PDT důležitější, protože leží v oblasti uplatňující se při excitaci. Další skupiny absorpčních pásů, které se ve spektrech objeví, mohou patřit kovovým ligandům nebo přenosu náboje mezi ligandem a centrálním kovem či excitační vazbě mezi π -systémy dimerových komplexů¹¹. Silný Q-absorpční pás ftalocyaninu je posunut k vyšším vlnovým délkám 650 – 700 nm, díky tomu makrocyclyk vykazuje výraznou intenzitu a čistotu barvy. Zvětšením ftalocyaninu o další benzenové jádro vzniká naftalocyanin (**Obr. 4**) s ještě větším posunem do červeného absorpčního spektra (Q- band je v 760–810 nm)¹².



Obr. 4. Porfyrinový (PM), porfyrizinový (PzM), ftalocyaninový (Pc) a naftalocyaninový (Nc) komplex kovového iontu M

3.3 Přehled fotosenzitizérů užívaných v PDT

V současné době existuje celá řada fotosenzitizérů, které jsou v různé fázi výzkumu či praxe. Soustředila jsem se na ty látky, které již byli schválené ke klinickému použití, podstupují klinické zkoušení nebo jsou příslibem do budoucna.

Nesnažila jsem se podat vyčerpávající seznam zástupců, ale spíše se zaměřit na významnější z nich.

Vývoj postupoval často souběžně v různých výzkumných skupinách, proto mohou mít některé PS více názvů nebo zkratk. Například talaporfin je znám i pod označeními Npe6, LS11, MACE, mono-*L*-aspartyl chlorin e6 nebo Laserphyrin[®]. Ve většině případů se budu řídit mezinárodními nechráněnými názvy (INN), které doporučila WHO.

Fotosenzitizující látky mohou existovat přirozeně v buňkách a tkáních (flavin, bilirubin, chlorofyl, atd.) nebo jsou získávány synteticky či biotechnologicky. Endogenní PS v celulárním prostředí nevykazují zjevné potenciální fotosenzitizační efekty. Podobně je tomu i u skupiny porfyrinů, která je též přítomna *in vivo*, ale nedokáže produkovat singletový kyslík a působit jako efektivní fotosenzitizér. Významnější skupina exogenních PS zahrnuje mnoho různorodých barviv a biomolekul, které jsou středem zájmu dnešního výzkumu.

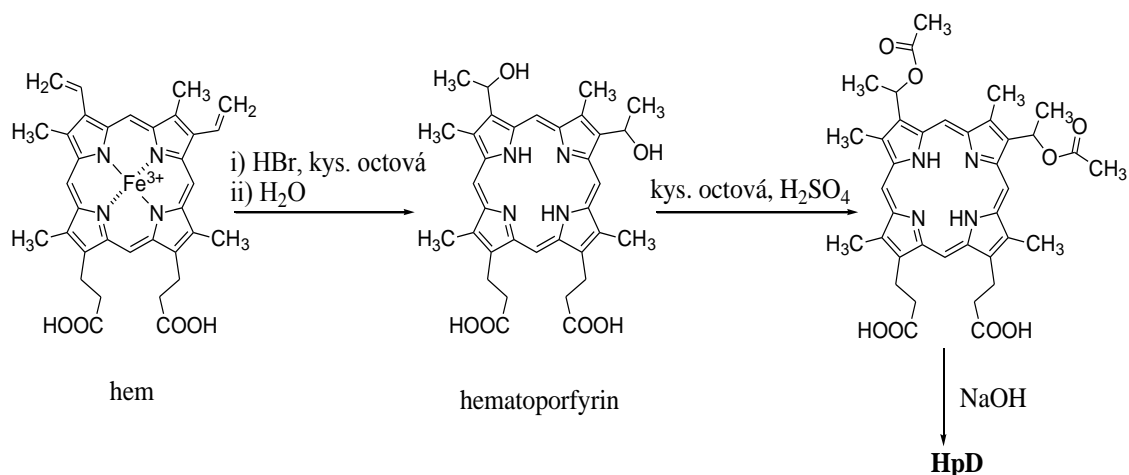
Na rozhraní mezi oběma kategoriemi stojí látky, které se vyskytují ve formě nečinného prekurzoru, který až poté co je metabolizován biologickým organismem, se stává plně funkčním fotosenzitizérem. Tento případ je znám např. u 5-aminolevulinové kyseliny, prekurzoru, který je mnoha rostlinami a zvířaty metabolizován na účinný fotosenzitizér protoporfyrin IX. Jedná se o normální intermediát v biosyntetických drahách vyskytující se v cytochromech, hemoglobinu nebo myoglobinu. Za standardních podmínek je koncentrace volného protoporfyrinu IX příliš nízká k tomu, aby vyvolala fotosenzitizační reakce, ale pokud je dodána kyselina 5-aminolevulinová v nadbytku nebo jsou-li zhoršené metabolické pochody, protoporfyrin IX se může nahromadit a zapříčinit fotosenzitivní reakci. Podrobněji je tato problematika zpracována v příslušné kapitole.

3.3.1 Porfyriny

3.3.1.1 Porfimer sodný

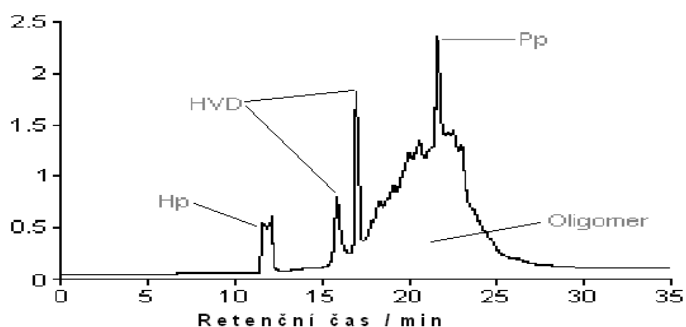
Další užívané názvy: derivát hematoporfyrinu, HpD, Photofrin[®] (USA), Photocarcinorin[®] (Čína), Photosan[®] (Německo), Photogem[®] (Rusko), Haematodrex[®] (Bulharsko).

HpD a Photofrin[®] byly prvními klinicky užívanými fotosenzitizéry a dosud i přes své značné nežádoucí účinky zůstávají nejrozšířenější. HpD byl poprvé popsán Lipsonem v roce 1961 a byl připraven acetylací hematoporfyrinu (Hp) s následnou neutralizací a alkalickou hydrolýzou (**Obr. 5**).



Obr. 5. Syntéza HpD

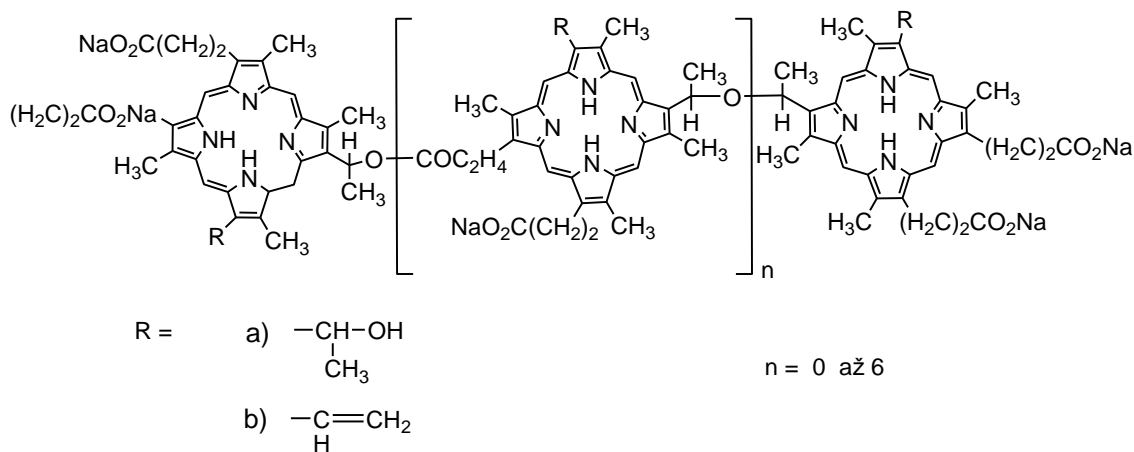
Vzniklá reakční směs obsahuje hematoporphyrin, hydroxyethylvinyldeuteroporphyrin (HVD), protoporphyrin (Pp) a složitou směs komplexů dimerů i oligomerů spojených esterovou a éterovou vazbou (**Obr. 6⁶** a **Obr. 7**).



Obr. 6. HPLC analýza porfimeru

HpD je tvořen zhruba 45 % monomerními/dimerními porfyriny a 55 % oligomerními⁶. Samotný hematoporphyrin je sice dobrým fotosenzitizérem, ale má nedostatečnou selektivitu vychytávání v tumorózní tkáni. Ukázalo se, že za její zlepšení jsou zodpovědné oligomerní frakce tvořící se během izolace Hp z krve¹³. Proto je k PDT používána gelovou chromatografií částečně vyčištěná směs s obsahem 85 % oligomerních frakcí, která se stala základem Photofrinu[®]. Porfimer byl schválený

ve více než čtyřiceti zemích a řadí se jako jediný zástupce do první generace fotosenzitizérů.



Obr. 7. Obecný vzorec HpD - komplex tvořený jednotkami a) hematoporfyrinu ;
b) protoporfyrinu IX

V absorpčním spektru HpD ve viditelné oblasti se nachází 5 pásů. Nejsilnější má své maximum v 400 nm (Soret). Další absorpční pásy jsou méně intenzivní s maximy v 520 nm, 540 nm, 590 nm a 630 nm¹⁴. Pro potřebu PDT je vlnová délka vhodná pro aktivaci nízká a nízký je též extinkční koeficient (3000 M⁻¹cm⁻¹ při 630 nm), což pro léčebný účinek vyžaduje vysoké dávky PS i světla.

Metabolismus a způsob účinku HpD není plně objasněný. Vycházíme z toho, že po *i.v.* aplikaci HpD vstupuje do všech somatických buněk a je metabolizován v cytoplasmě. Koncentrace HpD je 2-2,5krát vyšší v nádorové tkáni než v normálních buňkách. Ovšem jeho vysoké koncentrace byly nalezeny také v kůži¹⁵, kde přetrvává až 8 týdnů a způsobuje dlouhodobou fototoxicitu, která u pacientů vylučuje kontakt s ostrým světlem. Nejvyšších efektů bylo dosaženo po *i.v.* podání v dávce 1 až 2 mg/kg hmotnosti s kompletní inhibicí epidermální DNA, RNA a proteinové syntézy po ozáření. Ve snaze odstranit případné nežádoucí systémové projevy fototoxicity někteří autoři injikují látku intralezionálně². Další nevýhodnou vlastností je skutečnost, že Photofrin® je směsí asi šedesáti látek, a tudíž je velice složité reprodukovat přesné složení.

V dnešní době bylo připraveno mnoho druhů HpD, které se mohou lišit původem i složením. V Číně byly zkoumány tři látky rozdílného složení od různých výrobců (BeijingHpD, YangzhouHpD, Photocarcinorin) patřící mezi HpD¹⁶. Stejně tak i v Rusku

byl odlišnou technologií připraven v roce 1996 Photogem^{®17}. Chceme-li klinické studie těchto látek korektně posoudit, je nezbytné dbát na jejich správné korelace.

Jako první fotosenzitizér pro PDT byl Photofrin[®] schválený v Kanadě v roce 1993 na léčbu superficiálního karcinomu močového měchýře. Od té doby bylo jeho použití rozšířeno na terapii pokročilého karcinomu jícnu, pokročilého i počátečního stadia rakoviny plic, karcinomu děložního krčku, žaludku a Barretova jícnu¹⁸. Navíc je dále v testování pro léčbu dalších nádorových onemocnění, jako je rakovina hlavy a krku¹⁹, mozku, nádorů centrální nervové soustavy²⁰ a cholangiokarcinom²¹.

Fotosenzitizéry druhé generace jsou ověřovány a vyvíjeny od roku 1991. Jejich předností je nevýrazná kožní fotosenzitivita po léčbě a vyšší absorpční vlnová délka. Vzhledem k tomu, že se jedná o chemicky jednotné látky, jsou i snadno charakterizovatelné a výsledky reprodukovatelné. Patří sem odvozené látky ze skupiny porfyrinů, dále ftalocyaniny, naftalocyaniny, chloriny, bakteriochloriny, texafyriny, porfyceny, purpuriny, feoforbidy, pyrofeoforbidy a mnoho dalších.

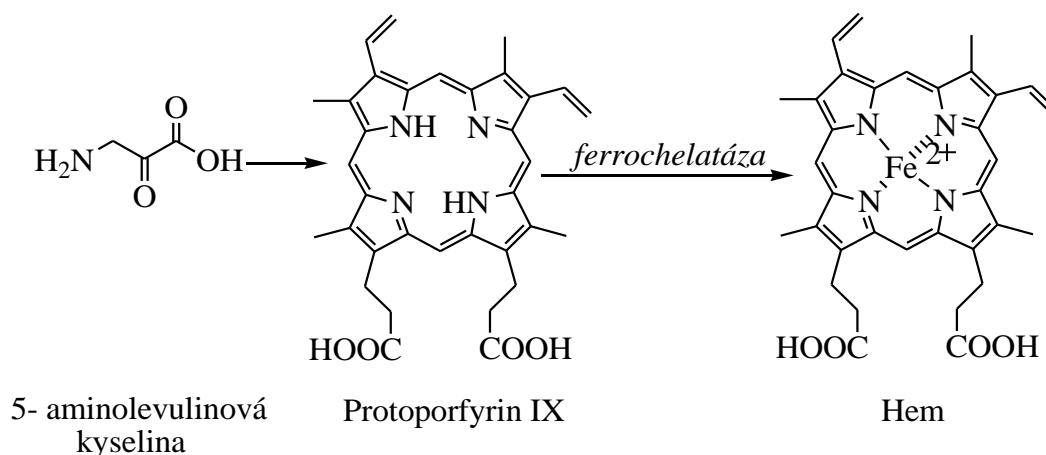
Souběžně se studiem hematoporfyrinových derivátů byl syntetizován v roce 1962 Winkelmanem *meso*-tetra(*p*-sulfofenyl)porfyrin (TPPS₄), který byl po chemické stránce přesně definovanou látkou, ale ve velkých koncentracích byl neurotoxický. V České republice byl Jirsou připraven speciálně purifikovaný TPPS₄, u kterého již nebyly zjištěny neurotoxické účinky².

3.3.1.2 5-aminolevulinová kyselina

Další užívané názvy: δ -aminolevulinová kyselina, 5-ALA, ALA, Levulan[®], Metvix[®] (methylester ALA), Hexvix[®] (hexylester ALA), Benzvix[®] (benzylester ALA).

5-ALA (chemicky kyselina 5-amino-4-oxo-pentanová) má mezi PS poněkud odlišné postavení. Jedná se o endogenní látku, která je výchozí sloučeninou biosyntézy hemu u všech savců. V eukaryotních buňkách je produkována enzymem *ALA syntetázou* z glycinu a sukcinyl CoA. Nejdůležitějšími enzymy ovlivňující rychlost syntézy jsou *ALA syntetáza* a *ferrochelatáza* umožňující přeměnu protoporfyrinu IX (PpIX) na hem²². Vyšší koncentrace hemu zpětnou vazbou brání konverzi glycinu a sukcinyl CoA na 5-ALA. Pokud je 5-ALA dodána exogenně, můžeme tento mechanismus obejít a biosyntéza relativně rychle pokračuje až k PpIX, poslednímu intermediátu přeměny na hem, kterému chybí pouze centrální atom železa (**Obř. 8**).

Inkorporace kovu do molekuly hemu je katalyzována *ferrochelatazou*, jejíž kapacita v mitochondriích je limitována, což má za následek nahromadění PpIX v buňce v závislosti na dostupnosti 5-ALA²³. Samotný hem i 5-ALA nejsou fotodynamicky aktivní, naopak kvantový výtěžek singletového kyslíku PpIX je okolo 0,56, což zaručuje efektivní podmínky pro PDT²⁴.



Obr. 8. Kondenzace 5-ALA na PpIX a následná přeměna na hem

Oproti ostatním PS má 5-ALA řadu výhod. Jako pro léčivo nezpůsobuje takovou toxicitu fotodynamického procesu. Fotosenzitizace je relativně krátká a nízká díky menšímu hromadění PpIX v kůži. Tkáň se vrací do normativního stavu asi za 24-48 hodin²⁵. Další předností je selektivita vychytávání v tumorózní tkáni, která je způsobena následujícími důvody. Jednak je v některých nádorech zvýšena biosyntéza PpIX v porovnání s normálními buňkami^{26,27}, jednak může být nižší aktivita *ferrochelatazy*^{26,28} příčinou snížení konverze PpIX na hem, a tím hromadění PpIX. PpIX rychle podstupuje photobleaching, proto určuje účinek PDT nikoli světlá dávka radiace, ale koncentrace PS v tkáni⁶. A v neposlední řadě omezená dostupnost železnatých iontů v rychle se množící rakovinné tkáni také přispívá k pomalejší přeměně na hem²⁹.

Za hlavní nevýhody při použití 5-ALA v PDT lze označit silnou hydrofilitu, která značně omezuje penetraci zvláště skrz vrchní vrstvy kůže, stratum corneum a skrz buněčné membrány. Proto se užívá jen pro povrchovou léčbu³⁰. V roztocích mimo fyziologických hodnoty pH může vykazovat nestabilitu. Absorpční maximum Q-pásu PpIX (630 nm) také omezuje použití 5-ALA v PDT jen na povrchové kožní poruchy.

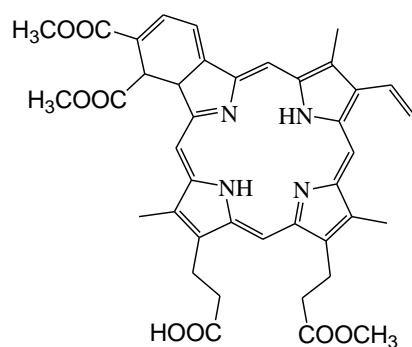
Navzdory problémům je 5-ALA užívaná v PDT relativně často. Od roku 1999 je schválena na topickou léčbu aktinoidní keratózy pokožky hlavy (USA, Levulan[®] Kerastick[®], DUSA Pharmaceuticals).

Velké úsilí ve vědecké práci směřuje k tomu, aby se vyřešily výše uvedené stinné stránky 5-ALA. V některých případech toto úsilí bylo přinejmenším částečně úspěšné. Hydrofilita může být do jisté míry snížena chemickými modifikacemi nebo technologickými postupy přípravy. Jako nejvhodnější obměna pro zvýšení lipofility a penetrace při zachování aktivity se ukázala esterifikace volné karboxylové skupiny³¹. Byla připravena řada esterů 5-ALA včetně nerozvětvených a rozvětvených alifatických esterů³², halogenovaných alicyklických, aromatických esterů³³, ethylenglykol esterů, nitrofenyl esterů, thioesterů³⁴, dendron a dendrimer esterů. Do klinické praxe byly prozatím zavedeny pouze metyl ester (Metvix[®], Photocure ASA, Oslo, Norsko) na terapii aktinoidní keratózy a hexyl ester (Hexvix[®], Photocure ASA, Oslo, Norsko) užívaný při fotodiagnostické detekci. Narozdíl od 5-ALA je možno estery podat systémově, přičemž plazmatická koncentrace je mnohem nižší, vzrůstá buněčný influx i selektivita vychytávání v rakovinné tkáni. Proto byl Hexvix[®] schválen také na detekci rakoviny močového měchýře.

V dnešní době jsou 5-ALA i její esterové deriváty schváleny a indikovány hlavně v dermatologii (Bowenova choroba, aktinoidní keratóza a bazocelulární karcinom)³⁵. Výzkum pokračuje i v mnoha dalších experimentálních léčebných a diagnostických aplikacích, například povrchové plísňové infekce³⁶, akné³⁷, svrab³⁸, bradavice³⁹ a dalších kožní virové infekce⁴⁰.

3.3.2 Chloriny

3.3.2.1 Verteporfin



Obr. 9. Verteporfin

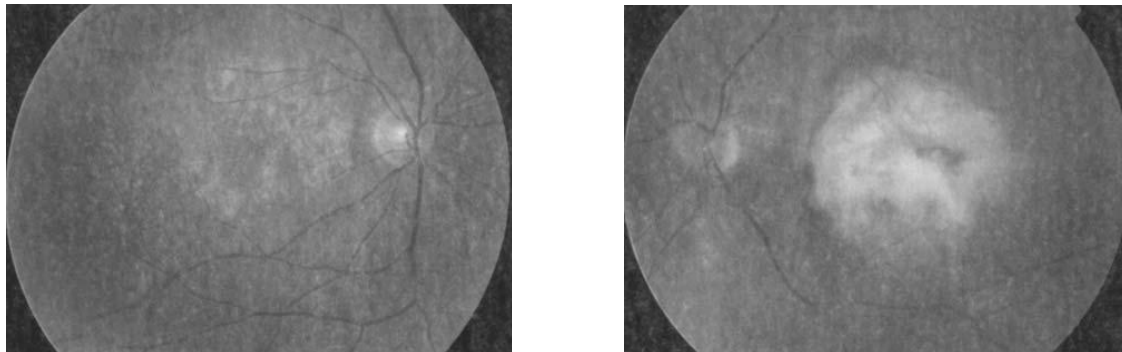
Další užívané názvy: benzoporfyrin derivát mono acid ring A, BPD-MA, Visudyne[®].

Přes zavádějící název patří benzoporfyrin do skupiny chlorinů, která má narozdíl od porfyrinů o jednu konjugovanou vazbu v makrocyklu méně (**Obr. 3**). Získává se semisynteticky z protoporfyrinu

Diels - Alderovou reakcí. Chromatografickým

přečištěním a parciální hydrolyzou získáme požadovaný benzoporfyrin derivát mono acid ring A⁴¹. Absorpčního maxima dosahuje při vlnové délce 690 nm ($\epsilon \sim 35000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), při níž světlo proniká dvakrát hlouběji než při 630 nm Photofrinu[®]. Tato vlnová délka umožňuje snadný průnik světla i přes melanin, krev a fibrotickou tkáň do subretinálních struktur⁴². Verteporfin je špatně rozpustný ve vodě, což lze zlepšit podáním ve formě liposomů. Velice rychle je absorbován tumorózní tkání a též je i rychle vylučován z tkání i těla. Díky tomu kožní fotosenzitivita ustupuje zhruba po 48 hodinách.

Ačkoli byl verteporfin testován pro léčbu rakoviny, nejvyšší pozornost získal v oftalmologii při terapii věkem podmíněné makulární degeneraci (AMD). AMD je onemocněním s velmi úzkou věkovou vazbou a jeho prevalence roste s věkem. U pacientů mezi 50-60 rokem věku činí asi 2 %, naproti tomu u pacientů starších 75 let představuje již téměř 30 % a u pacientů starších 90 let je to více než 40 %^{43,44}. Rozlišují se 2 formy AMD: suchá a vlhká (**Obr. 10**)⁴⁵. Suchá forma značně převažuje a je jí postiženo asi 85 % pacientů. Vlhkou formou je postiženo zbylých 15 %. Co do závažnosti postižení centrální zrakové ostrosti je však vlhká forma zodpovědná v 85 % za těžkou ztrátu zraku⁴³.



Obr. 10. Terminální stadia suché (vlevo) a vlhké (vpravo) formy AMD

Fotosenzitizér se predilekčně váže k molekulám lipoproteinů, především low-density lipoproteinům (LDL). Receptory pro LDL jsou expromivány nejvíce na nádorových buňkách a endoteliálních buňkách neovaskulárních membrán. Komplex fotosenzitizéru, molekuly LDL a receptoru je poté fagocytován do nitra endoteliální buňky a po jeho aktivaci červeným světlem 690 nm je vyvolána přímá buněčná smrt (nekróza)⁴⁶. Efekt terapeutického zásahu není viditelný bezprostředně, tak jako u klasické laserové koagulace. Úspěšná cévní okluze je patrná nejdříve po 1-2 týdnech po PDT. Hlavní výhodou verteporfinu vůči ostatním fotosenzitizérům je jeho krátký

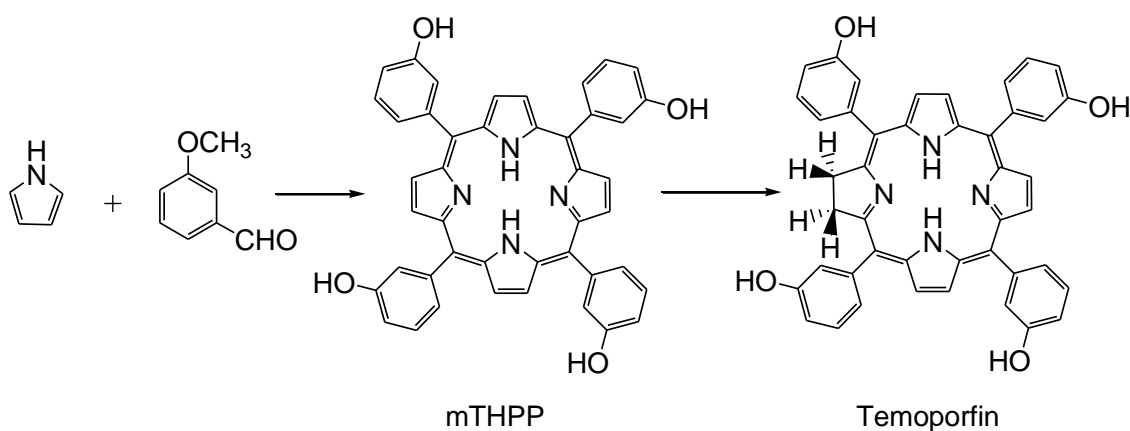
sérový poločas (2-5 h), který výrazně snižuje riziko systémové fototoxicity. U AMD nastala stabilizace nebo zlepšení u 52 % nemocných, u zánětlivých a idiopatických membrán dokonce u 83% případů⁴⁷. Je studován též efekt aplikace protilátky proti VEGF (cévní endoteliální růstový faktor) v kombinaci s PDT. VEGF hraje významnou úlohu v normální funkci sítnice⁴⁸. Při poruše rovnováhy mezi produkcí a potřebou VEGF dochází k nadprodukci VEGF retinou, a tím ke stimulaci tvorby neovaskulárního komplexu⁴⁹. Kombinací obou terapeutických postupů zároveň blokuje rozvoj neovaskularizace obsazením receptorů pro VEGF a též ničíme proliferující endoteliální buňky cév uvnitř neovaskulárního komplexu aktivovanými molekulami verteporfinu. Protilátka proti VEGF (anti-VEGF aptamer) je ve III. fázi klinického výzkumu⁴⁵. Nové možnosti farmakoterapie zahrnují také aplikaci verteporfinu se steroidy či jejich analogy (triamcinolon, dexamethason, anecortave-acetát) do prostoru sklivce. Podle posledních klinických studií synergií těchto anti-angiogenních látek dochází k výraznému zlepšení terapeutického efektu⁵⁰. V České republice jsou 4 centra zabývající se fotodynamickou terapií AMD.

Verteporfin se ukázal účinný také v dermatologii na léčbu nemelanoidní rakoviny kůže⁵¹ a kapilárních malformací⁵².

3.3.2.2 **Temoporfin**

Další užívané názvy: *m*-tetrahydroxyfenylchlorin, *m*THPC, Foscan[®]; chemicky: 5,10,15,20-tetrakis(*m*-hydroxyfenyl)chlorin.

Temoporfin je připravován diimidovou redukcí dvojně vazby *m*THPP připraveného kondenzací jednotek pyrrolu a 3-hydroxybenzaldehydu⁴¹ (**Obr. 11**).



Obr. 11. Syntéza temoporfinu

Polohový *ortho*- izomer THPP se pro výraznou kožní fotosenzitivitu v klinické PDT neuplatňuje⁵³. Při srovnání *meta*- a *para*- substituovaných derivátů hydroxyfenylchlorinu se *meta*- izomer ukázal mnohem lepší v poměru poškození normální a tumorózní tkáně⁵⁴.

Absorpční maximum temoporfinu je jen 652 nm, ale při extinkčním koeficientu $\epsilon \sim 30000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ dosahuje zhruba 10x vyšší fototoxicity oproti Photofrinu[®]. Špatnou rozpustnost ve vodě lze řešit podáním *m*THPC ve směsi vody, ethanolu a PEG. Nevýhodu použití v PDT v minulých letech znamenala nízká selektivita vychytávání nádorovou tkání (poměr rakovinná/zdravá tkáň 1,3 – 2,9)⁵⁵ a též poměrně dlouhá doba k dosažení tohoto poměru (4 dny). Nedávné výzkumné práce ukázaly, že liposomálním podáním temoporfinu lze při zachování stejné účinnosti⁵⁶ zvýšit selektivitu vychytávání a taktéž snížit interval mezi dobou podání a ozářením na několik málo hodin⁵⁷. Temoporfin se podává ve velmi malých dávkách (0,15 mg/kg) a díky takto silnému účinku patří mezi jedny z nejúčinnější PS. Kožní fotosenzitivita přetrvává nejméně 15 dnů.

Poprvé byl temoporfin schválen roku 2001 jako jediné PS na léčbu rakovinu hlavy a krku⁵⁸. V klinických studiích dosahuje dobrých výsledků při terapii bazocelulárního karcinomu⁵⁹, fotodetekci mozkových nádorů⁶⁰ a rakoviny prostaty⁶¹.

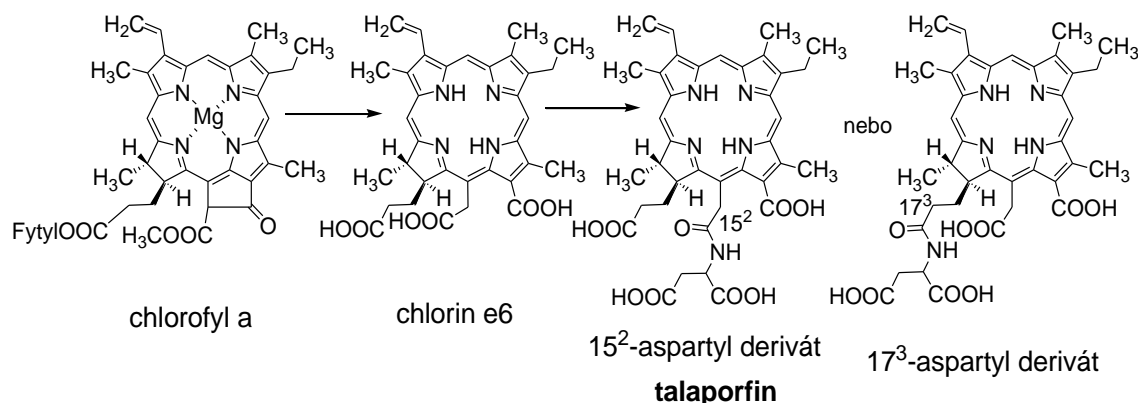
3.3.2.3 **Talaporfin**

Další užívané názvy: mono-*L*-aspartyl chlorin e6, Npe6, LS11, MACE, Laserphyrin[®], Litx[™].

Talaporfin je semisyntetický derivát chlorinu e6. Ten je syntetizován přímo z chlorofylu a v silně bazickém prostředí⁴¹. Reakcí chlorinu e6 s kyselinou asparagovou vzniká mono-*L*-aspartyl chlorin e6⁶² (**Obr. 12**). Během syntézy mohou být amidovány 3 karboxy skupiny. Zpočátku byla struktura přisuzovaná 17³-aspartyl derivátu, a to hlavně díky teoretickým prognózám reaktivity a sterického bránění. Později 2D NMR studie⁶³ a v novější době také monokrystalová rentgenová analýza⁶⁴ potvrdily, že struktura odpovídá 15²-aspartyl derivátu. Ten byl také přijat WHO a INN název talaporfin byl přisouzen právě 15²-regioizomeru.

Q- absorpční pás je posunut ještě výše na 664 nm s $\epsilon \sim 40000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Talaporfin ve formě tetrasodné soli je dobře rozpustný ve vodě a může být aplikován *i.v.* v dávce 40 mg/m² bez potřeby přidání zvláštní solubilizační látky. Ozáření nádorů se provádí 15- 60 minut po aplikaci PS. Nejoptimálnější interval byl určen z výzkumu

zvířecích modelů, které ukázaly, že je pro citlivost k PDT důležitější spíše dosažení plazmatické hladiny PS než hromadění v nádorové tkáni⁶⁵. Kožní fotosenzitivita je minimální, obvykle kolem 3- 7 dnů⁶⁶ s kompletním vymizením po 2 týdnech⁶⁷.



Obr. 12. Syntéza talaporfinu

Sodná sůl talaporfinu, pod názvem Laserphyrin[®], byla schválena v Japonsku k léčbě časného stádia bronchopulmonární rakoviny. Společnost Light Sciences Oncology používá talaporfin v Litx[™] technologii k terapii rakoviny jater, a to jednak rakoviny primární, a též metastáz kolorektálního karcinomu do jater⁶⁸. Ve fázi klinických pokusů je talaporfin indikován při terapii gliomu (nádoru mozku), různých rakovinových kožních onemocněních⁶⁹, povrchních spinocelulárních karcinomů plic⁶⁷, kde se ukazuje do budoucna jako účinný a bezpečný fotosenzitizér. Nejnovější *in vitro* testy ukázaly možnou kombinaci této látky se sonodynamickou terapií⁷⁰.

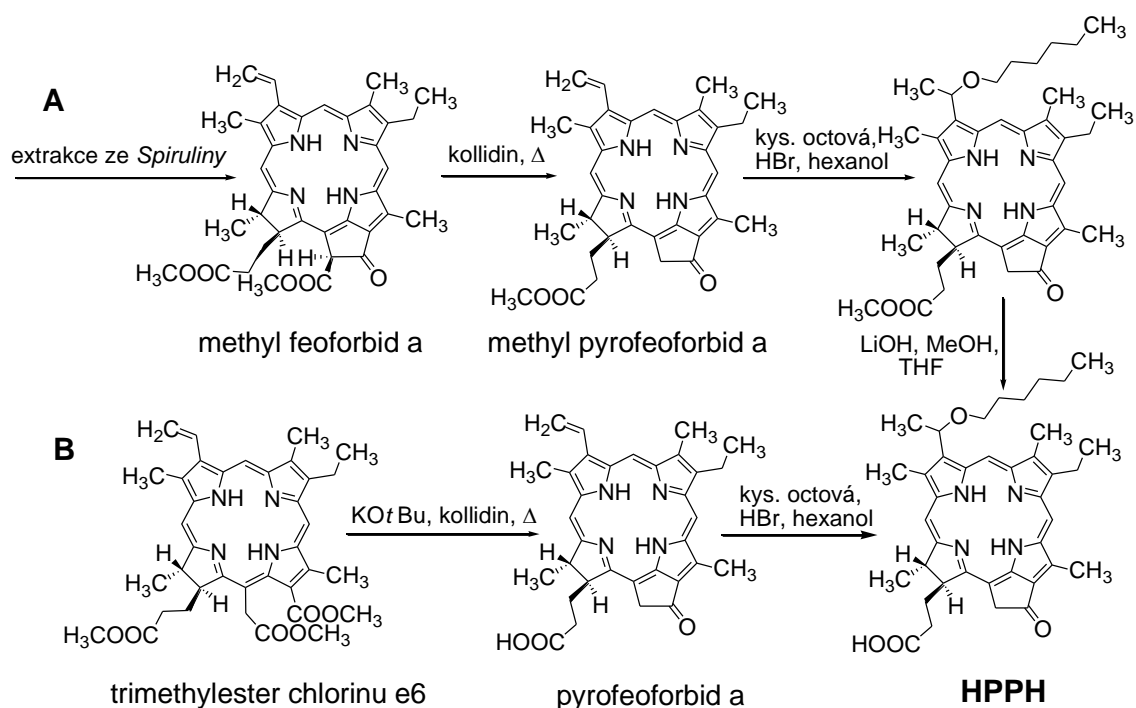
3.3.2.4 2-(1-hexyloxyethyl)-2-devinyl pyrofeoforbida

Další užívané názvy: HPPH, Photochlor.

Tento fotosenzitizér je příkladem semisyntetické látky připravené z přirozeně se vyskytujícího porfyrinoidu⁷¹. HPPH je vysoce hydrofobní sloučenina, kterou se podařilo vyselektovat při kvantitativní studii vztahu struktury a aktivity. Byl tak nejefektivnějším fotosenzitizérem mezi homology s různým množstvím methylenových skupin na éterové vazbě⁷². Původní pětistupňová syntéza vychází z prekurzoru methyl feoforbida a, který je izolován ze *Spirulina maxima* a převedený na methyl pyrofeoforbida. Jeho vinylová skupina je v dalším kroku hydrobromidovaná a ihned

poskytnuta do reakce s hexanolem. Metylester je pak hydrolyzován LiOH (**Obr. 13- A**)⁷³. Tato starší metoda byla nedávno nahrazena jednodušší a rychlejší (**Obr. 13- B**)⁷⁴. Je založena na Dieckmannově kondenzaci snadno dostupného trimethylester chlorinu e6 s následnou dekarboxylací, která zaručuje vysoké výtěžky HPPH.

Fotosenzitizér má silné absorpční maximum (při 665 nm) s $\epsilon \sim 47000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ a je obvykle aplikován v dávkách 2-6 mg/m². Nízká rozpustnost ve vodě vyžaduje přítomnost solubilizátorů, a proto je podáván v 5% roztoku dextransu ve sterilní vodě obsahující 2 % acetaldehydu a 1 % polyoxyethylen sorbitan monooleátu (Tween 80). Nedávno byly úspěšně testovány také nové nanokrystalické suspenze HPPH bez přidaných stabilizátorů a jejich *in vitro* a *in vivo* účinnost byla porovnatelná s výše uvedeným způsobem aplikace se solubilizátory⁷⁵. Kvůli vysoké lipofilitě dosahuje farmakokinetika pomalých biologických poločasů 7,7 hod a 596 hod a HPPH se může



Obr. 13. Metody přípravy HPPH

v plazmě vyskytovat dokonce několik měsíců po jedné infuzi⁷⁶. Navzdory tak pomalé exkreci je kožní fotosenzitivita jen minimální⁷⁷.

HPPH se dostal do první fáze klinických zkoušek v Roswell Park Cancer Institute pro léčbu časného i pozdního stádia rakoviny plic⁷⁸. Pokračují také klinické pokusy na terapii karcinomu jícnu, hlavy a krku a nemelanoidní rakoviny kůže⁷⁹.

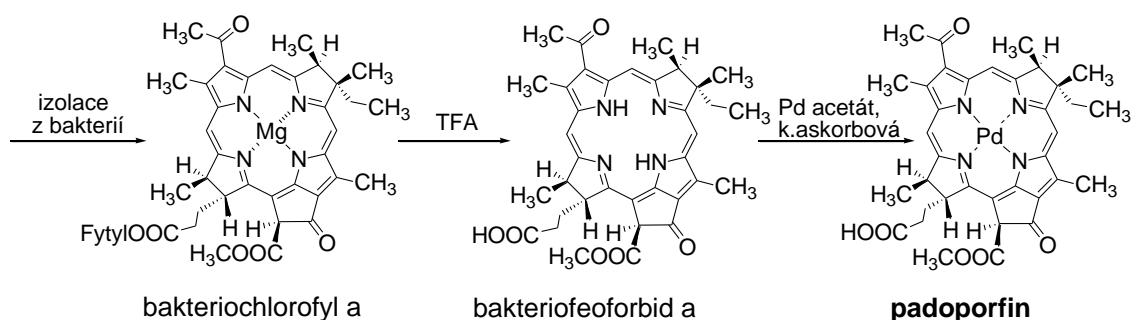
3.3.3 Bakteriochloriny

3.3.3.1 Padoporfin

Další užívané názvy: WST09, palladium bakteriofeoforbid a, Pd-BPheid, Tookad[®].

Padoporfin vzniká semisyntetickou modifikací přirozeně se vyskytujícího bakteriochlorinu. V prvním kroku je bakteriochlorofyl izolovaný z lyofilizovaných bakterií *Rhodovolum sulfidophilum* převeden na bakteriofeoforbid a v podmínkách kyseliny trifluoroctové (TFA) nebo enzymu *chlorofylázy*. TFA zároveň hydrolyzuje fytyl ester a z komplexu odstraňuje centrální atom kovu, zatímco *chlorofyláza* pouze hydrolyzuje fytyly a je ještě nutné provést následné acidické odkovení. Palladium se obvykle zavádí použitím acetátu palladia v přítomnosti kyseliny askorbové (**Obr. 14.**)⁸⁰.

Padoporfin jako zástupce bakteriochlorinů má rozdíl od porfyrinů v [18]-annulenovém makrocyklu o 2 konjugované dvojné vazby méně (**Obr. 3.**). Absorpce je posunuta hlouběji do červené oblasti viditelného světla (763 nm) a silnější je i extinkční koeficient ($\epsilon \sim 88000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Padoporfin není rozpustný ve vodě, aplikuje se speciální formou obsahující Cremophor, kdy část léčiva je při podání agregována, ale v organismu se rychle monomerizuje. Běžná dávka pro lidskou i zvířecí terapii je 2 mg/kg.



Obr. 14. Syntéza padoporfinu

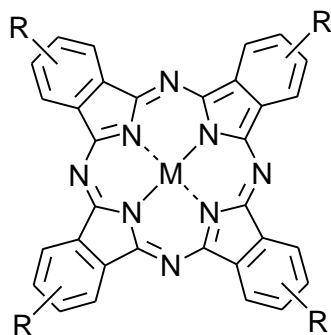
Biologický poločas u lidí je asi 20 minut, poté je PS rychle z těla vyloučen bez výrazného hromadění. U zkoumaných myších nebylo léčivo objeveno v kůži ani svalstvu a během 3 hodin dochází k celkovému očištění plazmy⁸¹. Pravděpodobně následkem toho, že nedochází k žádnému hromadění v kůži, nebyla v rámci první fáze klinických studií pozorována žádná fotosenzitivita⁸². Kvůli rychlé exkreci z těla začíná

ozáření obvykle již během podání PS. Místo působení PDT je téměř výlučně na cévní složku⁸³.

Padoporfin je testován jako potenciální fotosenzitizující látka pro rakovinu prostaty a nachází se v II/III fázi klinických pokusů⁷⁹. Jeho účinnost a bezpečnost byly již potvrzené na lidských⁸³ a psích⁸⁴ studiích. Pro svůj vaskulární efekt způsobující cévní okluzi je také nadějný v léčbě chorioideální neovaskularizace⁸⁵.

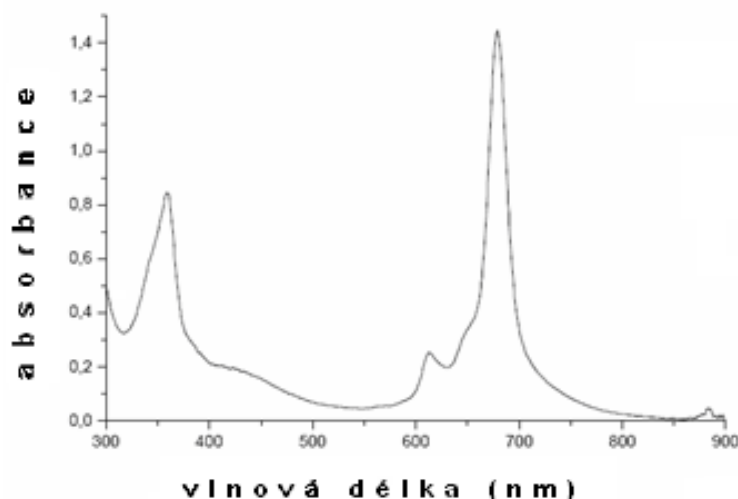
3.3.4 Ftalocyaniny

Další užívané názvy: Pc, Pc4, Photosense



Obr. 15. Ftalocyanin

Ftalocyaniny představují další velmi nadějnou skupinu PS. Delokalizací π -elektronů celého makrocyklu získávají mnoho jedinečných optických a elektrických vlastností. Mezi nejdůležitější patří možnost vysoké polarizovatelnosti a rychlé nábojové redistribuce konjugovaných molekul⁸⁶. Bezkovový Pc byl poprvé připraven v roce 1907 jako vedlejší produkt během přípravy 2- kyanobenzamidu⁸⁷. Později, v roce 1927, byl syntetizován měďnatý komplex ftalocyaninu reakcí 1,2-dibrombenzenu s kyanidem měďným v pyridinu ve 23% výtěžku⁸⁸. Objasněním struktury a způsobu přípravy se zabýval Linstead⁸⁹, který také sloučeninu poprvé pojmenoval ftalocyanin⁹⁰, odvozením z řeckých slov *nafta-* (ropa) a *cyanin* (modrý). Čtverečná planární struktura Pc s koordinačním číslem 4 dovoluje vazbu mnoha kovů majících vyšší koordinační čísla¹¹. Čistota a intenzita barvy ftalocyaninu je dána izolovaným a intenzivním Q-absorpčním pásem na konci červené oblasti viditelného spektra světla, mezi 650 a 720 nm (**Obr. 16.**). Při této vlnové délce dosahuje silné absorpce (ϵ až 200 000 M⁻¹cm⁻¹). Ftalocyaniny vstupují do buněk endocytózou a jsou lokalizovány v lysozomech. Poté se akumulují v mikrozomech a mitochondriích. PDT má cytotoxický účinek na většinu nádorových buněk, bez ohledu na to, o jaký druh nádoru se jedná². Centrálně chelátované kovy a polokovy (např. Zn, Al, Si) mohou prodloužit trvání tripletového stavu, a tím zvyšují účinnost Pc v PDT. Některé ftalocyaniny mají velice špatnou rozpustnost ve vodě i v organických rozpouštědlech. Tomu se lze vyhnout ať již relativně snadnou možností substituce na periferii, inkorporací do lipozómů nebo micel či vazbou na vhodný nosič (cukry, polylysinové řetězce atd.) Jednu z možností jak



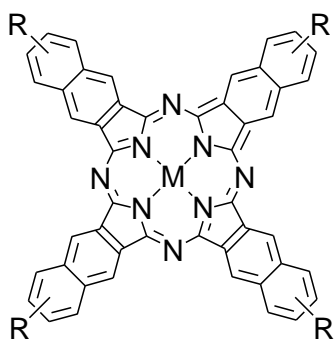
Obr. 16. UV/Vis spektrum (RO)₈PcMg (R = 2-ethylhexyl)

zvýšit rozpustnost ve vodě představuje sulfonace, při níž vzniká poměrně obtížně separovatelná směs sulfonových produktů. Zjistilo se, že disulfonované deriváty mají účinnost nejvyšší. Neseparovanou směs vzniklých produktů testují v Rusku pod názvem Photosens proti rakovině

plic, kůže, prsu a gastrointestinálního traktu⁹¹. Pc4 (křemičitý komplex ftalocyaninu) byl testován ke sterilizaci krevních produktů⁹¹, léčbě kutánních a subkutánních lézí způsobených různými solidními nádory⁹² nebo jako imunosupresivum⁹³.

Vedle využití v PDT jsou Pc zajímavou a široce používanou sloučeninou z hlediska svých elektrických a optických vlastností. Původní uplatnění ftalocyaninů jako pigmentů v textilním zboží, polymerech a barvách je stále vysoké⁹⁴. V dnešní době výzkum směřuje také k aplikaci v oboru materiálů^{95,96}. Je studováno použití ftalocyaninů jako kapalných krystalů⁹⁷, plynných senzorů⁹⁸, molekulových polovodičů⁹⁹, při elektrofotografických aplikacích¹⁰⁰, v optickém ukládání dat¹⁰¹, v palivových článcích¹⁰², ve fotoelektrochemických buňkách¹⁰³, ve fotočláncích¹⁰⁴, jako organické polovodiče^{95,105} a v nelineární optice¹⁰⁶.

3.3.5 Naftalocyaniny



Obr. 17. Naftalocyanin

Další benzenového kruhy na periferii molekuly naftalocyaninu posouvají vlnové délky, při nichž absorbují, k ještě vyšším hodnotám (770 nm). Proto je lze použít při léčbě vysoce pigmentovaných nádorů, jako jsou melanomy. Stejně jako u Pc zůstává nevýhodou jejich velmi špatná rozpustnost.

4 Metodická část

4.1 Syntéza ftalocyaninů a azaftalocyaninů

Molekula ftalocyaninů i jejich azaanalogů je tvořena čtyřmi isoindolovými jednotkami spojenými v polohách 1 a 3 dusíkovým můstkem.

Obecně vychází syntéza ftalocyaninů z jednokrokových reakcí, většinou cyclotetramerizací kyseliny ftalové nebo jejích derivátů, například ftalanhydridu, ftalimidu, *o*-kyanbenzamidů, ftalonitrilu nebo isoindolindiiminu^{11,107} s různými výtěžky (Schéma 2.).

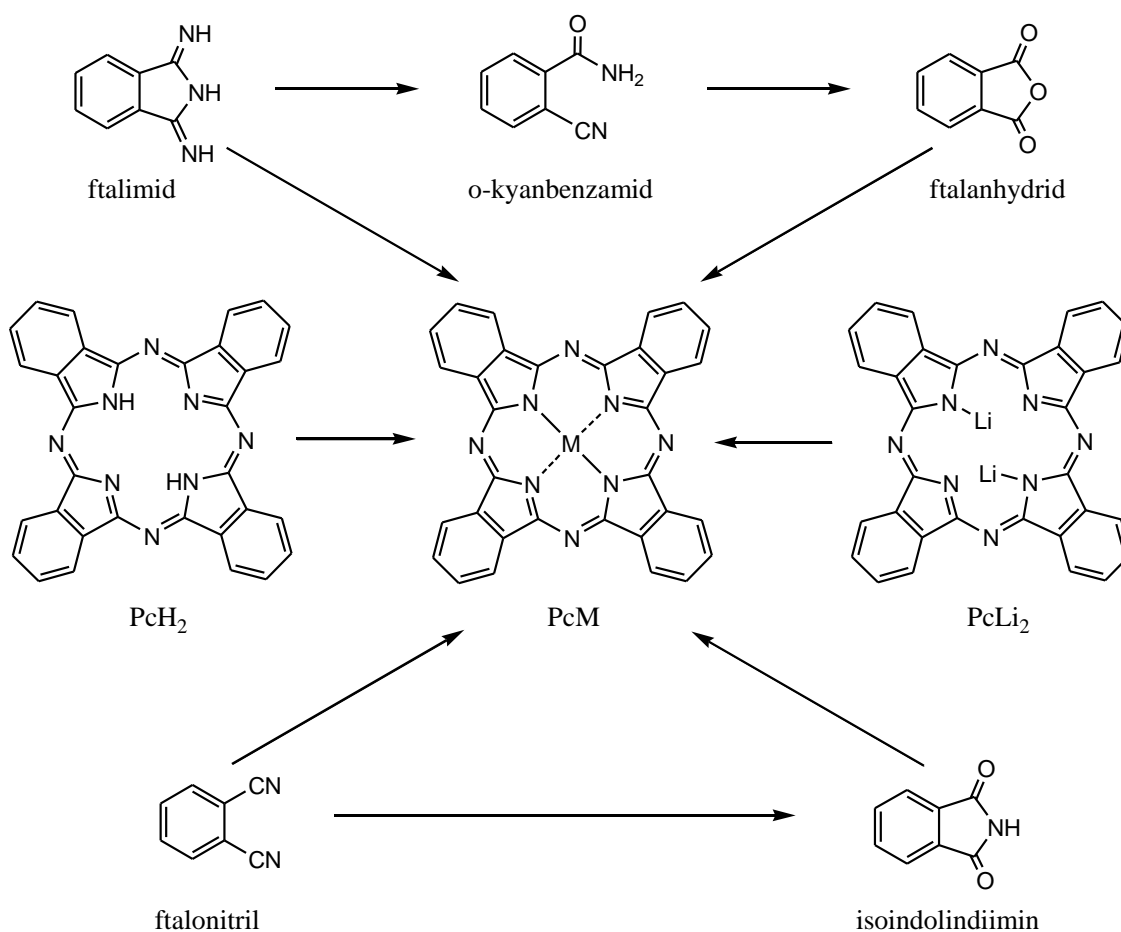
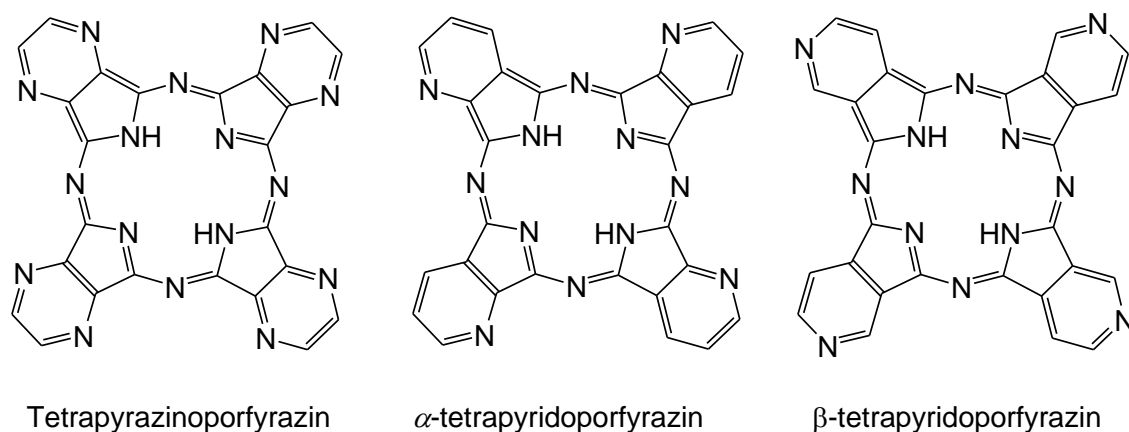


Schéma 2. Obecné schéma přípravy ftalocyaninů

Nejčastěji používaným prekurzorem syntézy Pc je substituovaný ftalonitril, nebo v některých případech, kdy brání nízká reaktivita prekurzoru vzniku makrocyklu, vychází příprava z 1,3-diiminoisoindolinu. Cyklotetramerizace se provádí různými postupy. Příkladem může být reakce ftalonitrilu za silného působení katalyzátoru 1,8-diazabicyklo-[5,4,0]-undec-7-enu (DBU). Silně bazický DBU v roztoku (např. pentanolu nebo oktanolu) s kovovým iontem pomáhá vzniku ftalocyaninu s centrálně vázaných kovem¹¹.

Azaftalocyaniny (AzaPc) jsou dusíkatými analogy Pc. Narozdíl od ftalocyaninů jsou na přikondenzovaných benzenových jádrech nahrazeny methinové skupiny izosterními atomy dusíku. V rámci své diplomové práce jsem pracovala s tetrapyrazinoporfyraziny, které se od ostatních azaftalocyaninů liší pozicí dusíku (polohy 1 a 4) na periférii (**Obr. 18.**).



Obr. 18. Ukázka dusíkatých derivátů ftalocyaninu

Vzhledem k strukturální i reakční podobnosti vychází syntéza AzaPc z již prostudované skupiny ftalocyaninů. Nejvíce používanými prekurzory jsou 5,6-disubstituované deriváty pyrazin-2,3-dikarbonitrilu. Ty za použití různých postupů tetramerizují a vytváří makrocyclický systém AzaPc.

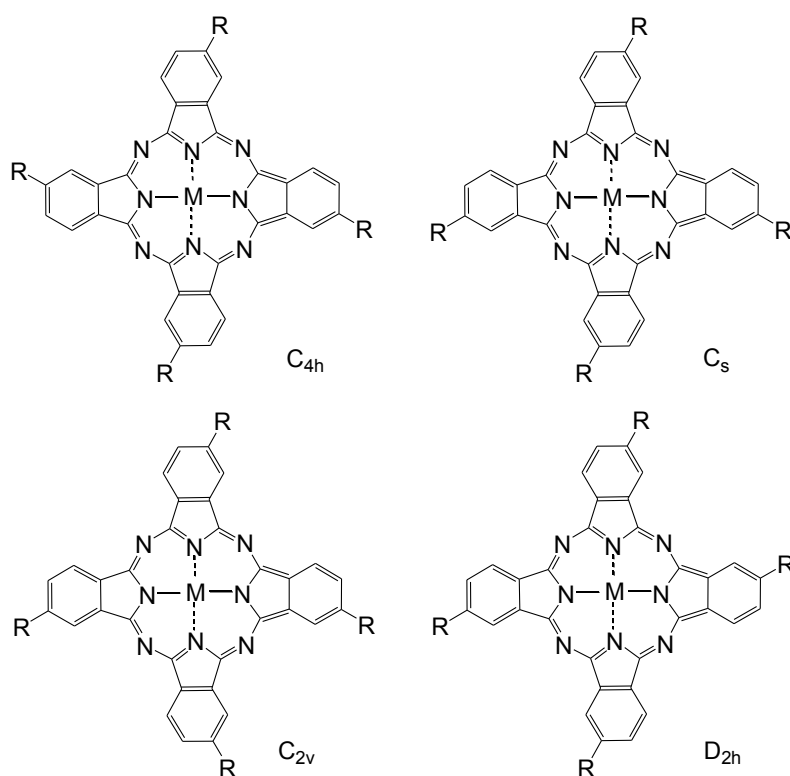
Široce popsána příprava nesubstituovaných nebo symetricky substituovaných azaftalocyaninů a Pc je založena na cyklizaci pouze jedné výchozí látky. Zatímco při nesymetrických syntézách spolu reagují minimálně dva odlišné prekurzory nebo jeden nesymetricky substituovaný prekurzor bez roviny zrcadlové souměrnosti k aromatickému kruhu (např. monosubstituovaný pyrazin-2,3-dikarbonitril u AzaPc či monosubstituovaný ftalonitril u Pc). V obou případech vede nesymetrická

kondenzace ke vzniku směsi izomerů. Požadovaný AzaPc je poté nutné izolovat, nejčastěji s využitím chromatografických metod. Tyto neselektivní metody obvykle vedou k zisku velkého počtu vedlejších produktů a současnému snížení výtěžků. Bylo vyvinuto značné úsilí k vyřešení tohoto problému a vyřešit se ho částečně podařilo zavedením specifických postupů syntézy nesymetrických Pc¹⁰⁸. Jak již bylo uvedeno výše, příprava azaftalocyaninů je úzce spjata s přípravou Pc, proto budou vycházet z metod užívaných u ftalocyaninů.

4.1.1 Syntéza nesymetrických Pc – metoda nesymetrického prekurzoru

Obecně mají nesymetrické Pc oproti symetrickým derivátům řadu výhodnějších fyzikálních a chemických vlastností např. vyšší rozpustnost, bathochromní posun Q-pásu a zejména možnost specificky vázat molekulu Pc na daný nosič.

Geometrickou kombinací čtyř shodných nesymetrických diiminoisoindolinových



podjednotek ve struktuře ftalocyaninů se získají čtyři konstituční izomery se symetriemi C_s , D_{2h} , C_{2v} a C_{4h} (Obr. 19.). Statistická směs těchto čtyř izomerů by teoreticky obsahovala 12,5 % D_{2h} izomeru, 12,5 % C_{4h} izomeru, 25 % C_{2v} a 50 % C_s izomeru.

Obr. 19. Možné polohové izomery cyklizace nesymetrického prekurzoru

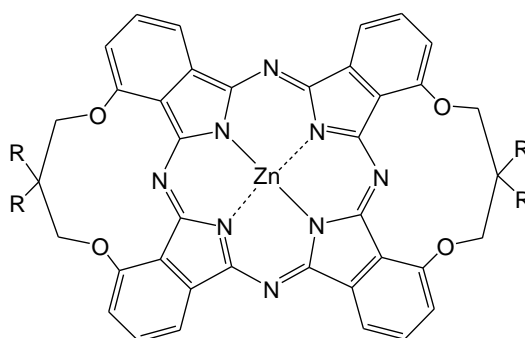
Pro selektivní přípravu pouze jednoho ze čtyř konstitučních izomerů se ukázaly přínosné následující dvě metody syntézy:

► **STATISTICKÝ PŘÍSTUP („statistical approach“)**

Při této metodě lze upravením reakčních podmínek, volbou vhodného centrálního atomu kovu či pozic substituentů na diiminoisoindolonových jednotkách směřovat syntézu pouze k jednomu ze čtyř možných izomerů (obzvláště C_{4h}). Toho lze dosáhnout např. přidáním alkoholátu lithného jako katalyzátoru, použitím kovového nosiče (Zn^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+}) nebo změnou reakční teploty¹⁰⁹.

► **PŘÍMÝ PŘÍSTUP („directed approach“)**

Tímto způsobem lze získat především D_{2h} izomery. Metoda spočívá v symetrickém spojení dvou ftalonitrilových jednotek příslušným můstkem, tzv. „spacerem“. Na následujícím **Obr. 20** je uveden příklad struktury D_{2h} izomeru tvořeného dimerem složeným z dvou ftalonitrilů spojených v pozicích 3 můstkem, 2,2-disubstituovaným propan-1,3-diolem¹¹⁰.



Obr. 20. Dimer složený z dvou D_{2h} ftalonitrilů

4.1.2 Syntéza nesymetrických Pc – metoda dvou různých prekurzorů

Selektivní syntéza, do níž vstupují jako prekurzory dvě odlišně substituované isoindolové jednotky (označované **A** a **B**), vede na základě zvolené metody a prekurzorů ke vzniku ftalocyaninů strukturního typu A_3B nebo A_2B_2 , ale i dalších možných kombinací.

4.1.2.1 Syntéza A₃B ftalocyaninů

► STATISTICKÁ KONDENZACE („statistical condensation“)

Vzhledem ke své jednoduchosti se jedná se o široce užívanou metodu syntézy Pc i AzaPc. Proto jsem také tento přístup zvolila při cyklizaci svých látek. Jedná se v podstatě o neselektivní metodu, při níž vzniká směs 6-ti odlišných látek znázorněných na zjednodušeném **Schéma 3**.

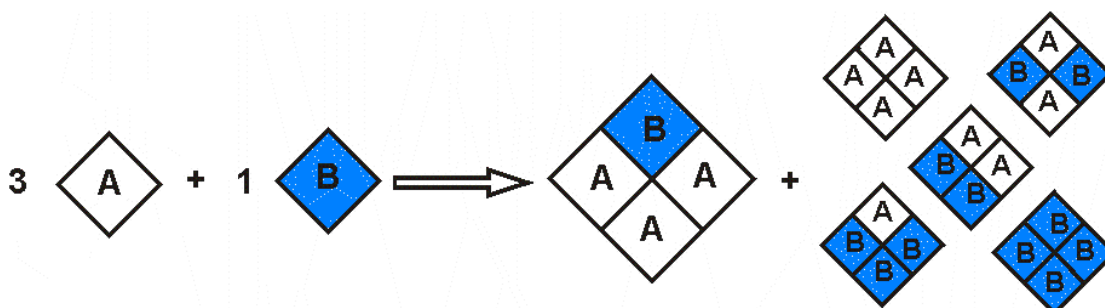


Schéma 3. Metoda statistické kondenzace

Reakce se provádí za katalýzy kovu nebo silné báze (např. DBU) a výsledkem jsou "kongenery" strukturálního typu AAAB, AABB, ABAB, ABBA a symetrické molekuly AAAA a BBBB. Odlišný typ symetrie zaujímají kongenery ABAB a AABB, které představují dva různé izomery A₂B₂ ftalocyaninů. Pokud jsou stejné jednotky proti sobě (ABAB), označuje se tento izomer jako "opposite" (trans izomerie), pokud spolu stejné jednotky sousedí (AABB), nazýváme tento izomer jako "adjacent" (cis izomerie). Oba mají podobné fyzikálně-chemické vlastnosti, tudíž jejich separace probíhá velmi obtížně, většinou s využitím chromatografických metod. Kromě toho mají makrocykly tendenci k agregaci, která znehodnocuje konečný výsledek syntézy. Výzkum byl zaměřen k nalezení nových postupů v rámci této metody, které by zvýšily výtěžek požadovaných kongenerů.

Statistická kondenzace se obecně užívá pro přípravu ftalocyaninů obsahujících ve své molekule jednu odlišnou a tři shodné isoindolové podjednotky (A₃B)¹¹¹. Syntéza těchto sloučenin probíhá jinými metodami obtížněji a v nižších výtěžcích. Obzvláště se snahy soustředily na přípravu makrocyklů, jejichž podjednotky A nesly donorové skupiny a podjednotky B elektron-akceptorové skupiny, a naopak^{112,113}. Použitím vhodného stechiometrického poměru reaktantů A a B docílíme přednostního vytvoření

sloučenin s uspořádáním A_3B . Statistickým výpočtem lze zjistit, že reakce dvou různých ftalylderivatů stejné reaktivity v poměru 3:1 poskytne směs produktů v následujícím procentuálním zastoupení: A_4 (33 %), A_3B (44 %) a další kondenzační produkty (23 %). V praxi při běžném molárním poměru 3:1 se pohybují výtěžky požadované sloučeniny A_3B pouze v rozmezí 10-20 %¹¹¹. Upřednostňuje se použití ftalonitrilů s různým stupněm rozpustnosti, což usnadňuje oddělení nesymetrických Pc díky odlišným chromatografickým vlastnostem. Vazba objemných *tert*-butylových skupin nebo uhlovodíkového řetězce v poloze 3 a 6 na jednom z prekurzorů (obvykle tom v nadbytku) usnadňuje izolaci A_3B produktu. Substitucí se jednak zvyšuje rozpustnost Pc a díky sterickému bránění se také znemožní agregace makrocyclů¹¹⁴.

V dalších výzkumných pracích bylo zjištěno, že při chromatografické separaci je dosaženo vynikajících výsledků u směsi látek s různým stupněm alkylové a oligo(oxyethylenové) substituce, která způsobuje rozdílnou polaritu¹¹⁵. Přítomnost rozvětvených substituentů také umožňuje oddělení A_3B ftalocyaninů¹¹⁶.

Zvýšením stechiometrického poměru reaktantů na 9:1 sice vzroste množství A_4 a poklesne výtěžek požadovaného A_3B , ale netvoří se již žádné další kondenzační produkty a látky A_4 a A_3B lze snadněji separovat¹¹⁷. Tento poměr může být použit i v případě, má-li B vyšší reaktivitu než A¹¹².

Další způsob, jak omezit množství vzniklých strukturálních typů a potlačit agregaci, představuje použití ftalonitrilu (A) nesoucího v polohách 3 a 6 objemné a rigidní skupiny, např. fenyl společně s ftalonitrilem bez substitucí (B)¹¹⁸. Protože důsledkem sterického bránění spolu nemohou dvě podjednotky A sousedit ani být v jedné rovině, tvoří se převážně sloučeniny typu BBBB, BBBA a BABA.

► SUBFTALOCYANINOVÁ METODA

(„The Subphthalocyanine Approach“)

Tato selektivní syntéza nesymetricky substituovaných Pc typu A_3B byla vyvinuta v 80. letech 20. stol. Kobayashim a dalšími chemiky¹¹⁹. Dochází k rozšíření kruhu subftalocyaninu (SubPc) působením sukcinimidu nebo diiminoisindolinu. Uvnitř struktury SubPc dochází ke geometrickému pnutí, které má v přítomnosti diiminoisindolinu za následek snadné rozštěpí vazeb, načež je diiminoisindolin včleněn do makrocyclu (**Schéma 4.**). Vzniká tak Pc, jehož struktura odpovídá typu

A₃B. Tato reakce je na rozdíl od předchozí metody vysoce selektivní a umožnila přípravu Pcs, které byly dříve nedosažitelné¹²⁰.

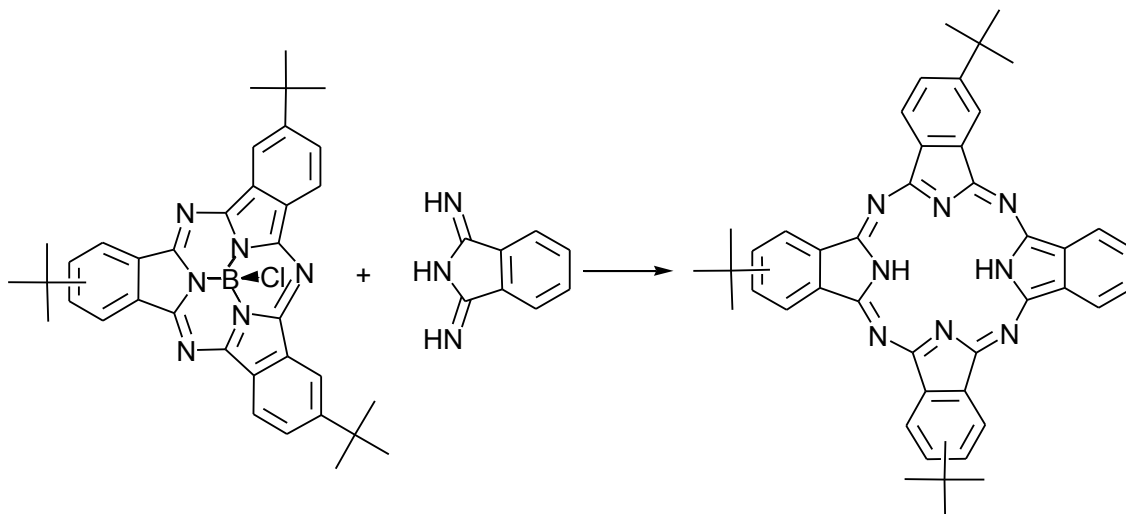


Schéma 4. Expanze SubPc kruhu

Později bylo zjištěno, že průběh syntézy je ovlivněn reakčními podmínkami¹²¹. Expanze kruhu probíhá nejlépe, reaguje-li derivát diiminoisoindolinu v 6 – 9-ti násobném nadbytku oproti roztoku SubPcs ve směsi DMSO/1-chlornaftalen nebo dichlorbenzenu (1:4 až 4:1) nebo dimethylaminoethanolu při teplotě 80 – 100 °C po dobu 5–12 hodin. Výtěžek se pak pohyboval mezi 3 – 90%.

I přesto že se jedná o selektivní metodu, vznikají během syntézy vedlejší produkty, protože může dojít k částečné nebo úplné fragmentaci kruhu SubPc a následné statistické kondenzaci jednotlivých fragmentů poskytující směs všech šesti možných kongenerů (viz **Schéma 5**).

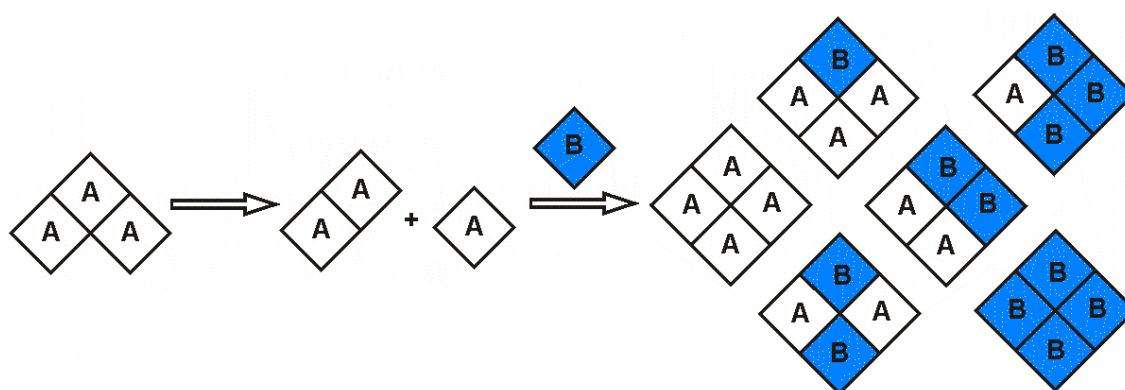


Schéma 5. Fragmentace SubSb během subftalocyaninové syntézy a statistická kondenzace

Výtěžek reakce a selektivita mohou být zvýšeny, pokud na SubPc navážeme elektron odtahující substituenty a na diiminoisoindolin substituenty poskytující elektrony.

► **METODA S VYUŽITÍM PEVNÉ FÁZE („Polymeric Support Method“)**

V roce 1982 publikoval Leznoff práci, v níž představil jednofázovou syntézu s využitím polymeru¹²². Vhodně substituovaný ftalonitril (B) navázaný na nerozpustný polymerní nosič podrobil reakci s odlišně substituovaným volným ftalonitrem (A), čímž získal A₃B ftalocyanin navázaný na pevné fázi (**Schéma 6**). Reakcí vzniklé vedlejší produkty A₄ ftalocyaniny mohou být jednoduše ze směsi odstraněny promytím pevné fáze ve vhodně zvoleném rozpouštědle. Poté je A₃B Pc odštěpen z polymerní fáze.

Tato metoda je omezena použitím funkčních skupin ftalonitrilů schopných se navázat a následovně oddělit z polymerního nosiče. Nicméně díky expanzi technologie polymerních nosičů a jejich široké dostupnosti je tato metoda slibnou cestou k selektivní syntéze nesymetricky substituovaných A₃B Pcs. Nevýhodu může představovat ekonomická náročnost polymerních nosičů a tím i provádění syntéz ve větším množství.

Ostatní výzkumné skupiny, které se snažily zdokonalit tento postup, používaly speciálně modifikované pevné fáze pro zvýšení selektivity a výtěžnosti reakce¹²³.

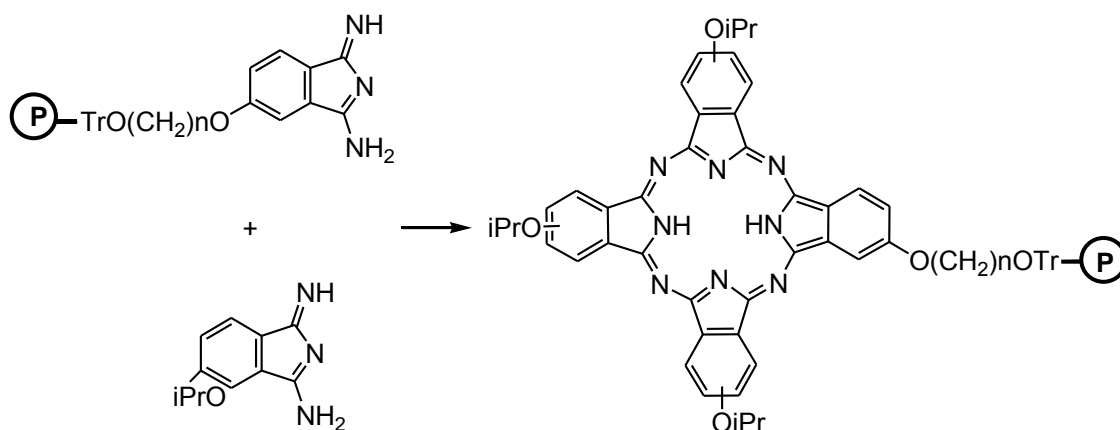


Schéma 6. Syntéza Pc s využitím pevné fáze

4.1.2.2 Syntéza ABAB ftalocyaninů

► SYNÉZA PŘÍČNĚ SUBSTITUOVANÝCH PC

(„Crosswise-Substituted Pc“, „Cross condensation“)

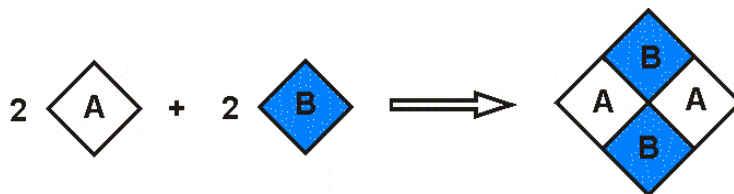


Schéma 7. Metoda „cross condensation“

Jedná se o první skupinu A_2B_2 derivátů tvořenou příčně substituovanými jednotkami. Dají se jen velmi obtížně izolovat ze statistické směsi, protože jejich AABB izomery vykazují podobné charakteristiky rozpustnosti a jsou často eluovány ve stejné frakci. Přesto byly v posledních desetiletích nalezeny specifické metody přípravy pouze jednoho ze dvou polohových izomerů.

V roce 1990 patentoval Young a kol.¹²⁴ metodu selektivní syntézy D_{2h} symetrických derivátů, z níž vycházela i příprava ABAB makrocyklů tzv. „cross couplingem“¹²⁵. Jako prekurzory použili ekvivalentní množství 1,3-diiminoisoindolinu (A) a 1,3,3-trichlorisoindoleninu (B) (Schéma 8.). Při mírných reakčních podmínkách v přítomnosti báze a redukčního činidla se výtěžek pohyboval poměrně vysoko (až 50 %).

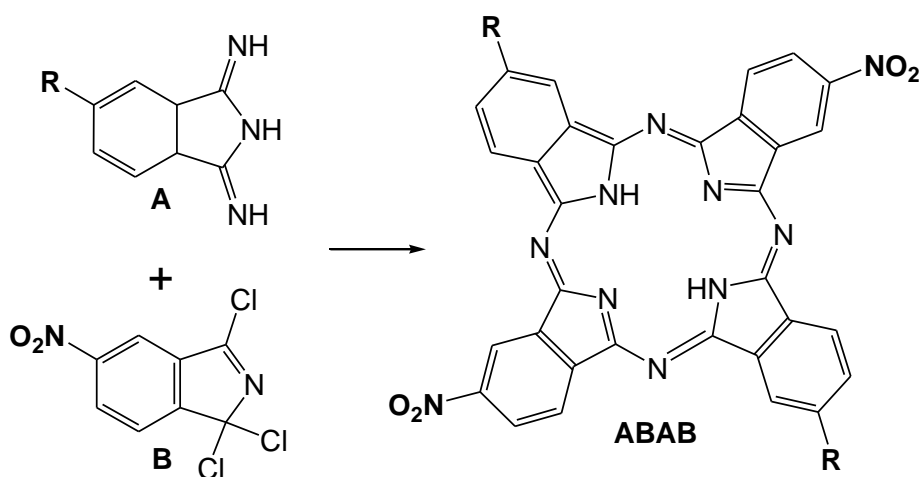


Schéma 8. Příprava ABAB Pc

Leznoff a kol. popsali další způsob syntézy založený na reakci 1,3-diiminoisoindolinu a 1*H*-isoindol-1,3(2*H*)-dithionu v molárním poměru 1:1¹²⁶ (**Schéma 9**). V tomto případě vzniklo kromě požadovaného ABAB typu malé množství vedlejších produktů z řady ostatních kongenerů.

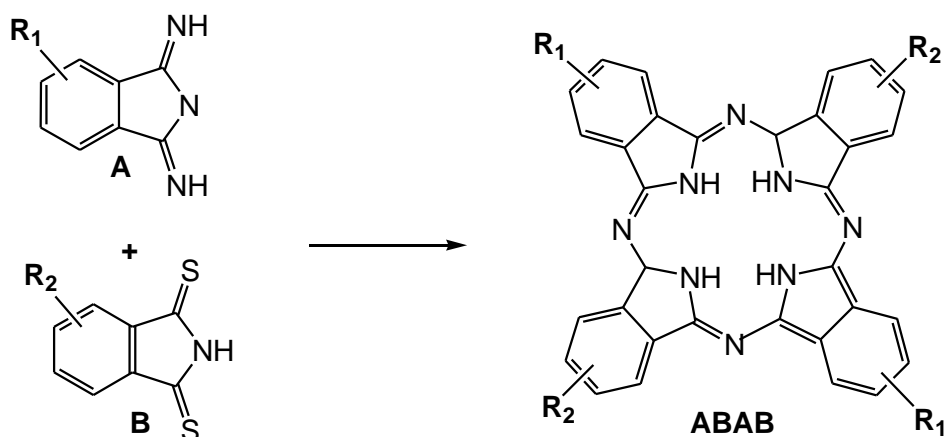


Schéma 9. Příprava ABAB Pc

4.1.2.3 Syntéza AABB ftalocyaninů

► **SYNÉZA SOUMĚRNĚ SUBSTITUOVANÝCH PC („Adjacent Pc“)**

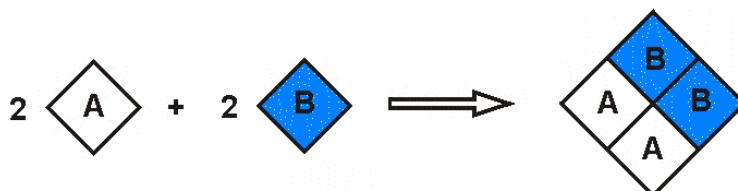


Schéma 10. Metoda přípravy „adjacent Pc“

Leznoff a jeho spolupracovníci¹²⁷ se zabývali i přípravou Pc typu AABB. Pro jejich přípravu použili meziprodukt tzv. poloviční ftalocyaninu (AA) (z angl. „half-Pc“), který byl podroben reakci s odlišně substituovaným ftalonitrilem (B) za velmi mírných podmínek (**Schéma 11**). Příprava stabilního a izolovatelného meziproduktu vyžaduje použití ftalonitrilů se substituenty silně odtahující elektrony. Reakcí takto substituovaného ftalonitrilu s LiOMe v prostředí metanolu získal AABB produkt ve výsledném výtěžku okolo 20 %.

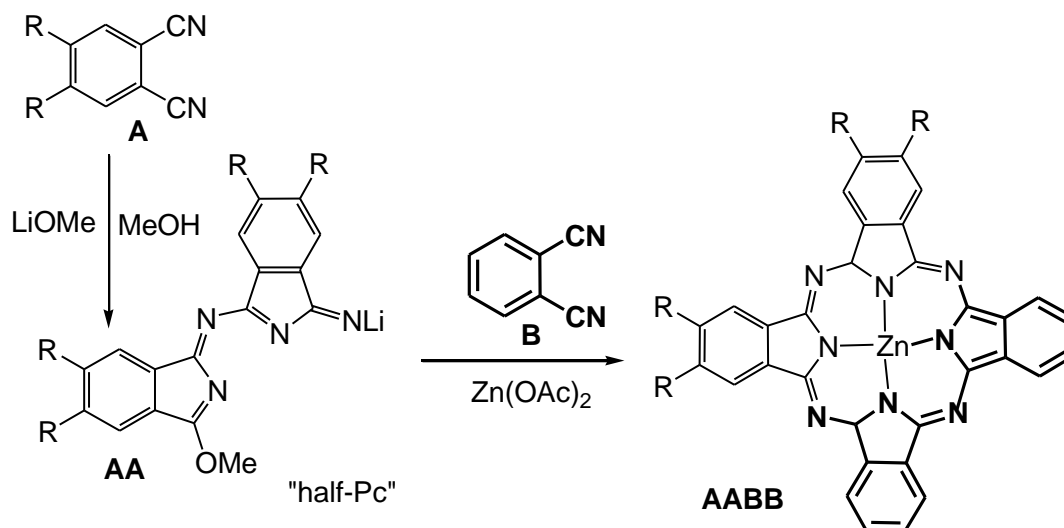


Schéma 11. Příprava AABB Pc z half-Pc intermediátu

Dalším způsobem, jak získat pouze izomer AABB, zavedl Kobayashi¹²⁸. Podobně jako u syntézy „directed approach“ (viz kapitola 4.1.1.) použil 2 jednotky spojené „spacerem“. Vycházel z prekurzoru bis(ftalonitrilu) (A) spojeného přes řetězec (např. 2,2'-dihydroxy-1,1'-binaftyl). Po přidání odlišně substituovaného ftalonitrilu (B) docházelo vlivem velkému pnutí v molekulách reaktantů k tvorbě energeticky výhodnějšího Pc typu AABB ve výtěžku asi 20–25 % (Schéma 12.).

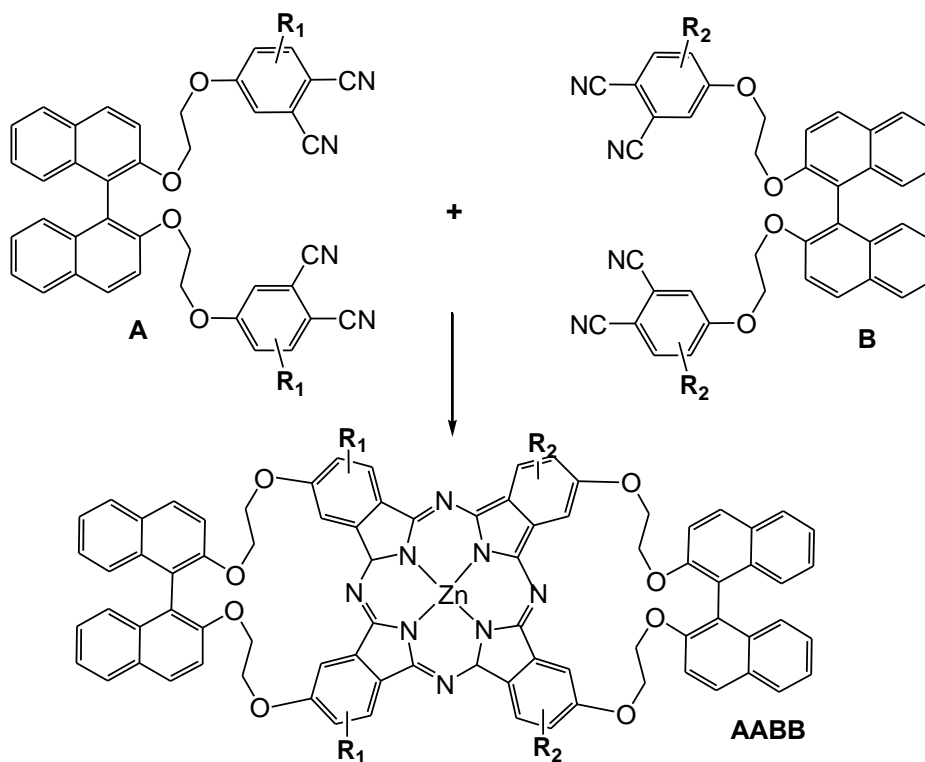


Schéma 12. Příprava AABB Pc

5 Experimentální část

5.1 Měřicí přístroje a chemikálie

Pro identifikaci, ověření struktury, čištění produktů a meziproduktů byly využity následující měřicí přístroje a chemikálie.

Teplota tání byla měřena na digitálním přístroji ELECTROTHERMAL IA9200 a nebyla korigována.

Průběh reakcí, čistota produktů a meziproduktů byly kontrolovány tenkovrstvou chromatografií na deskách Silikagel Merck 60 F254. Detekce byla prováděna UV světlem vlnové délky 254 nm a 366 nm. Vytvářecí soustavy jsou uvedeny u jednotlivých reakcí.

Sloupcová chromatografie byla prováděna na silikagelu Merck Kieselgel 60 (0,040-0,063 mm).

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

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

Hmotnostní spektra MALDI-TOF byla měřena na hmotnostním spektrometru Voyager-DE STR (Applied Biosystems, Framingham, MA, USA).

Prekurzory **1**, **3**, **7** a standard látky 2,3,9,10,16,17,23,24-oktakis(*tert*-butylsulfanyl)-1,4,8,11,15,18,22,25-(oktaaza)ftalocyaninato zinečnatého komplexu byly připraveny dříve na KFCHKL FaF UK v Hradci Králové. Butanol byl predestilován a sušen hořčíkem. Chemikálie 2-methylaminoethanol a 2-methyl-2-propanthiol byly zakoupeny u firmy Fluka. Bezvodý dimethylformamid byl zakoupen u firmy Acros.

5.2 Schéma přípravy

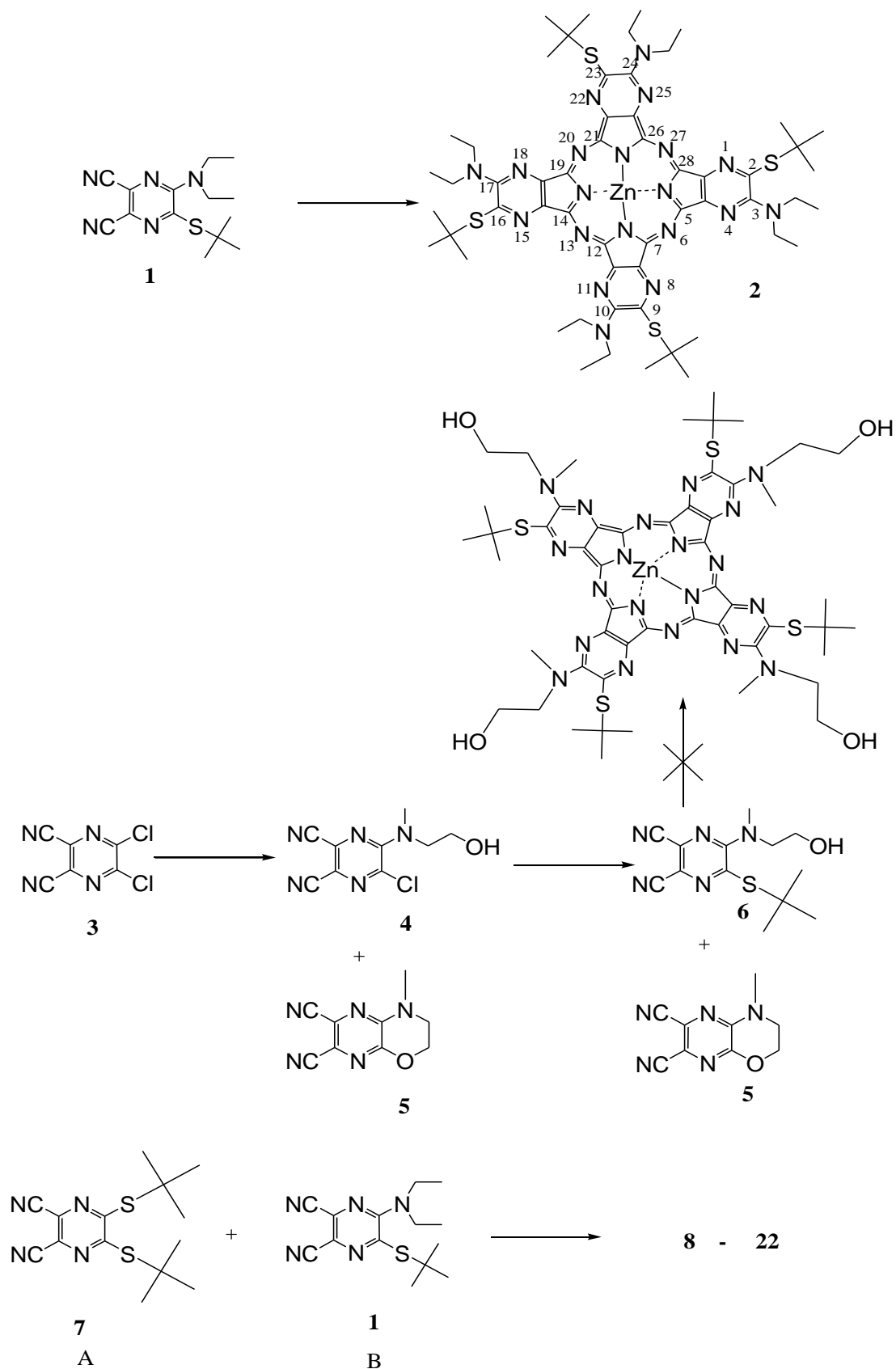


Schéma 13. Přehled přípravy AzaPc

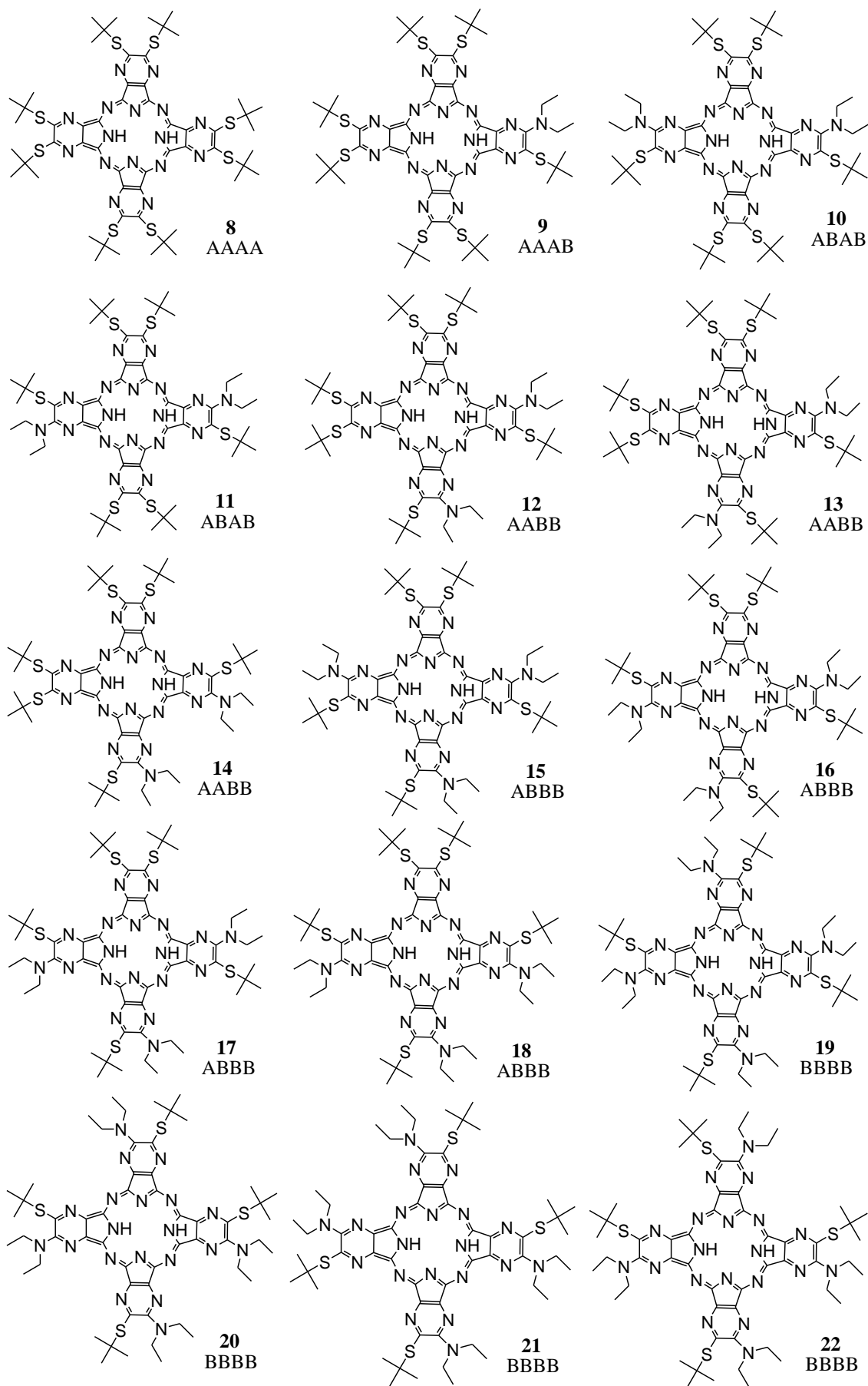
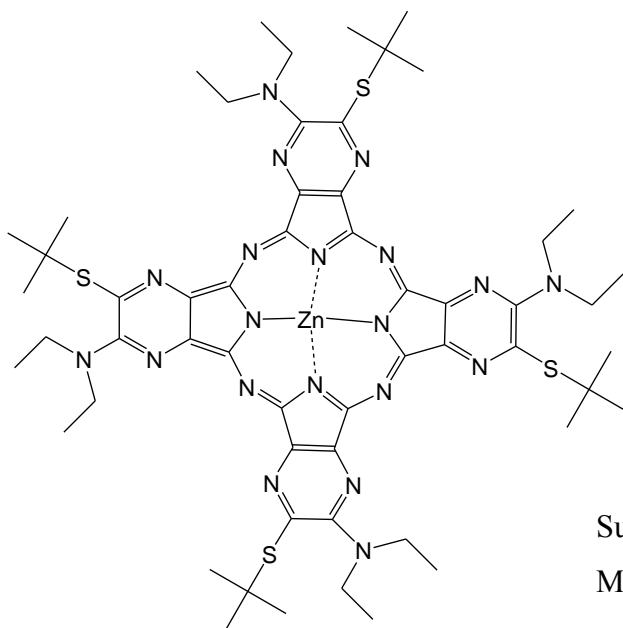


Schéma 14. Cyklizace látek **1** a **7** metodou statistické kondenzace

5.3 Syntéza

5.3.1 Příprava 2,9,16,23-tetrakis(terc-butylsulfanyl)-3,10,17,24-tetrakis (diethylamino)-1,4,8,11,15,18,22,25-(oktaaza)ftalocyaninato zinečnatého komplexu (2)



Sumární vzorec: C₅₆H₇₆N₂₀S₄Zn

Molekulová hmotnost: 1222,99

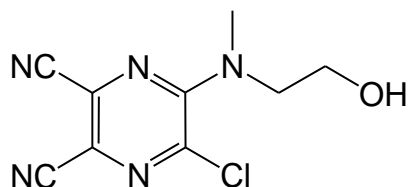
5-(*terc*-butylsulfanyl)-6-(diethylamino)pyrazin-2,3-dikarbonitril (1) (96 mg) v molárním poměru 1:2 s bezvodým octanem zinečnatým (122 mg, M = 183) jsem zahřívala pod vzdušným chladičem po dobu dvou hodin v prostředí bezvodého dimethylformamidu (1 ml) při teplotě 160 °C. Reakční směs jsem nalila do vody, ze které vypadla zelenomodrá sraženina. Tu jsem následně odfiltrovala, vysušila a promyla methanolem.

Produkt jsem po reakci vyčistila sloupcovou chromatografií, jako mobilní fázi jsem použila soustavu chloroform/tetrahydrofuran 30:1. Výtěžek 10 mg zelenomodré pevné látky (tj. 11,6 % teoretického výtěžku).

MS MALDI-TOF m/z 1221,5 [M+H]⁺

UV-vis λ_{\max} 657; 598; 374.

5.3.2 Příprava 5-chlor-6-(2-hydroxyethylmethylamino)pyrazin-2,3-dikarbonitrilu (4)

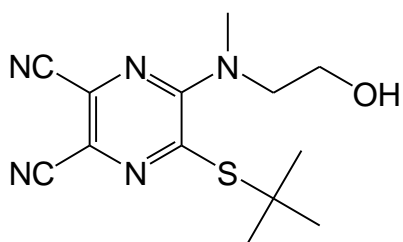


Sumární vzorec: C₉H₈ClN₅O
Molekulová hmotnost: 237,65

5,6-dichlorpyrazin-2,3-dikarbonitril (3) (1,0 g, 5 mmol) jsem rozpustila v tetrahydrofuranu (50 ml), směs jsem ochladila pomocí směsi led/sůl na přibližně -10 °C a po kapkách injekcí přidávala 2-methylaminoethanol (0,82 ml, 9,37 mmol) v tetrahydrofuranu (15 ml). Směs jsem nechala za stálého míchání jednu hodinu reagovat, dokud nevypadly ze směsi krystalky soli hydrochloridu použitého aminu. Průběh reakce jsem sledovala pomocí tenkovrstvé chromatografie s mobilní fází dichlormethan/acetone 20:1. Produkt má R_f hodnotu 0,23, vzniká i výrazný vedlejší produkt s R_f hodnotou 0,52. Vzniklou sůl jsem odfiltrovala přes fritu a roztok jsem odpařila. Produkt nebyl izolován, ale směs byla použita přímo do další reakce.

Žádná data.

5.3.3 Příprava 5-(terc-butylsulfanyl)-6-(2-hydroxyethylmethylamino)pyrazin-2,3-dikarbonitrilu (6)



Sumární vzorec: C₁₃H₁₇N₅OS
Molekulová hmotnost: 291,37

2-methyl-2-propanthiol (0,675 ml, 6 mmol) jsem míchala s 1-M vodným roztokem hydroxidu sodného (5,5 ml). Poté jsem ke směsi přidala dříve připravený roztok látky (4) (vše z předchozí reakce) v tetrahydrofuranu (40 ml). Průběh reakce jsem sledovala pomocí tenkovrstvé chromatografie s mobilní fází dichlormethan/acetone 20:1. Z jejího výsledku bylo patrné, že veškerá výchozí látka zreagovala na produkt s R_f

hodnotou 0,4. Látka s R_f hodnotou 0,52 z předchozí reakce se nezměnila. Rozpouštědlo jsem odpařila na vakuové rotační odparce a vzniklou žlutou olejovitou látku jsem promyla vodou. Sloupcovou chromatografií jsem vyizolovala jednotlivé látky (s hodnotami R_f 0,4 a 0,52, označené jako látky X6 a X5). Jako mobilní fázi jsem použila soustavu dichlormethan/acetone v poměru 30:1 a obě látky jsem vyizolovala.

Látka X6 (R_f 0,4):

Výtěžek: 730 mg (tj. 50 % teoretického výtěžku)

T.t. 68,5-69,5 °C za rozkladu

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ (ppm) 3,98 (t; 2H; $J = 5,6$ Hz; CH_2OH), 3,81 (t; 2H; $J = 5,0$ Hz; CH_2N), 3,29 (s; 3H; NCH_3), 1,58 (s; 9H; CCH_3)

$^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3) δ (ppm) 29,9; 39,8; 52,0; 54,4; 60,0; 113,9; 114,4; 119,3; 125,0; 150,6 a 153,1

Potvrzena jako látka (6)

5-(*tert*-butylsulfanyl)-6-(2-hydroxyethylmethylamino)pyrazin-2,3-dikarbonitril.

Látka X5 (R_f 0,52):

Výtěžek 170 mg (17 % počítáno na látku 3)

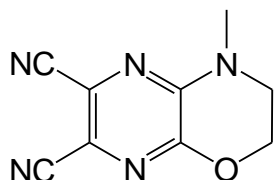
T.t. 192,3 – 193,7 °C za rozkladu

$^1\text{H NMR}$ (acetone d_6) δ (ppm) 4,63 (t; 2H; $J = 4,8$ Hz; O-CH_2), 3,85 (t; 2H; $J = 4,8$ Hz; N-CH_2) a 3,25 (s; 3H, CH_3)

$^{13}\text{C NMR}$ (acetone d_6) δ (ppm) 149,6; 146,2; 126,4; 117,1; 115,3; 65,5; 47,6 a 35,9

Potvrzena jako látka (5)

4-methyl-3,4-dihydro-2H-pyrazino[2,3-b][1,4]oxazin-6,7-dikarbonitril.



Sumární vzorec: $\text{C}_9\text{H}_7\text{N}_5\text{O}$
Molekulová hmotnost: 201,18

Při reakci 4-methyl-3,4-dihydro-2H-pyrazino[2,3-b][1,4]oxazin-6,7-dikarbonitrilu (5) (30 mg, 0,15 mmol) s acetanhydridem (1,5 ml, 15 mmol) v prostředí tetrahydrofuranu (10 ml) za přítomnosti pyridinu (1 ml) za laboratorní teploty nedošlo

k žádné reakci (monitorováno TLC), což dokázalo, že se v molekule nevyskytují volné hydroxylové skupiny.

5.3.4 Syntéza látek (8) – (22)

Příprava butanolátu hořečnatého

Bezvodý butanol (50 ml) jsem v lázni pod zpětným chladičem a sušící rourkou zahřála na teplotu 130 °C. Po ohřátí butanolu jsem přidala na kousky nakrájený hořčík (69,1 mg, 28,44 mmol) aktivovaný 10 % kyselinu sírovou, promytý vodou a ethanolem. Přidala jsem pár zrnek jódu. Směs jsem zahřívala za stejných podmínek po dobu dvou hodin a ihned použila k cyklizaci.

Cyklizace látek (8) – (23)

Do horkého butanolátu hořečnatého jsem přidala 5-(*tert*-butylsulfanyl)-6-(diethylamino)pyrazin-2,3-dikarbonitril (**1**) (58,7 mg, 0,2 mmol) a 5,6-bis(*tert*-butylsulfanyl)pyrazin-2,3-dikarbonitril (**7**) (62,3 mg, 0,2 mmol) v molárním poměru 1:1. Směs jsem zahřívala pod zpětným chladičem při teplotě 130 °C osm hodin. Poté jsem butanol odpařila na vakuové odparce za pozvolna snižovaného tlaku při teplotě 65 °C do sucha. Ke zbytku jsem přidala 50% kyselinu octovou a nechala hodinu míchat, aby došlo k odstranění veškerého nezreagovaného hořčíku. Po odsátí přes fritu mi zůstala zelená sraženina, kterou jsem rozpustila v chloroformu, odpařila a promyla vodou a methanolem pro odstranění balastních látek. Filtr a na něm ulpěný produkt jsem vylouhovala v chloroformu, rozpouštědlo jsem odpařila, přidala k hlavnímu podílu produktu a vše rozpustila v chloroformu.

Odkovování

K odstranění hořčíku jsem použila reakci s kyselinou *p*-toluensulfonovou. Hořečnatý komplex jsem rozpustila v chloroformu, přidala stejné množství tetrahydrofuranu a nechala s kyselinou *p*-toluensulfonovou (380 mg, 2 mmol) reagovat třicet minut. Produkt jsem na vakuové odparce odpařila, několikrát promyla hydrogenuhličitanem sodným, vodou, dostatečným množstvím methanolu, přefiltrovala a rozpustila v malém množství chloroformu.

Preparativní chromatografie TLC

Bezkovový komplex AzaPc jsem nanesla na 2 chromatografické desky o rozměrech 20 x 20 cm. Jako nejvhodnější mobilní fázi pro oddělení jednotlivých derivátů AzaPc se jevila soustava chloroform/toluen/ethylacetát v poměru 30:6:1. Jednotlivé skvrny (viz **Obr. 21.**) jsem vystříhala, seškrabala společně se silikagelem a vyextrahovala do tetrahydrofuranu.

Frakce A

MS MALDI TOF m/z 1227,44 $[M+H]^+$, počítáno pro látku **8** 1227,4 $[M+H]^+$

UV-vis (tetrahydrofuran) λ_{\max} (nm) 671; 640; 615; 588; 477; 366.

Frakce B

MS MALDI TOF m/z 1210,49 $[M+H]^+$, počítáno pro látku **9** 1210,45 $[M+H]^+$

UV-vis (tetrahydrofuran) λ_{\max} (nm) 672; 646; 619; 593; 477; 366.

Frakce C

MS MALDI TOF m/z 1193,49 $[M+H]^+$, počítáno pro látky **10-14**

1193,49 $[M+H]^+$

UV-vis (tetrahydrofuran) λ_{\max} (nm) 674; 650; 618sh; 591sh; 478; 365.

Frakce D

MS MALDI TOF m/z 1193,45 $[M+H]^+$, počítáno pro látky **10-14**

1193,49 $[M+H]^+$

UV-vis (tetrahydrofuran) λ_{\max} (nm) 674; 646; 618sh; 590sh; 476; 365.

Frakce E

MS MALDI TOF m/z 1176,55 $[M+H]^+$, počítáno pro látky **15-18** 1176,53 $[M+H]^+$

UV-vis (tetrahydrofuran) λ_{\max} (nm) 676; 653; 620sh; 594sh; 507; 365.

Frakce F

MS MALDI TOF m/z 1176,56 $[M+H]^+$, počítáno pro látky **15-18** 1176,53 $[M+H]^+$

UV-vis (tetrahydrofuran) λ_{\max} (nm) 675; 649; 621sh; 590sh; 499; 360.

Frakce G

MS MALDI TOF m/z 1176,52 $[M+H]^+$, počítáno pro látky **15-18** 1176,53 $[M+H]^+$

UV-vis (tetrahydrofuran) λ_{\max} (nm) 674; 651; 620sh; 592sh; 505; 365.

Frakce H

MS MALDI TOF m/z 1159,53 $[M+H]^+$, počítáno pro látky **19-22** 1159,57 $[M+H]^+$

UV-vis (tetrahydrofuran) λ_{\max} (nm) 679; 651; 621sh; 593sh; 495; 365.

Frakce I

MS MALDI TOF m/z 1159,53 $[M+H]^+$, počítáno pro látky **19-22** 1159,57 $[M+H]^+$

UV-vis (tetrahydrofuran) λ_{\max} (nm) 677; 652; 620sh; 593sh; 503; 364.

Možné konstituční izomery azaftalocyaninů jsou znázorněny na **Schéma 14.**

6 Diskuze

Ve své diplomové práci jsem se snažila nalézt nejvhodnější postup syntézy azaftalocyaninů s různým počtem dusíkatých substituentů na periférii. Připravit tak statistickou kondenzací škálu látek od dusíkem nesubstituovaných po mono-, di-, tri- a tetra-substituované cykly, u nichž by se dal sledovat vliv množství dusíkatých substituentů na produkci singletového kyslíku. V předchozích pracích na KFCHKL bylo zjištěno, že přítomnost dusíku jako heteroatomu vázajícího periferní řetězec výrazně snižuje produkci singletového kyslíku – hlavního cytotoxického agens v PDT. Cílem měly být zinečnaté komplexy, u kterých by byly rozdíly mezi produkcí singletového kyslíku nejvíce patrné.

V prvním kroku jsem se pokoušela zjistit, zda se krajní produkty statistické cyklizace budou od sebe lišit a zda umožní separaci i ostatních kongenerů. Pro práci jsem jako prekurzor použila 5-(*tert*-butylsulfanyl)-6-(diethylamino)pyrazin-2,3-dikarbonitril (**1**) s jednou *tert*-butylsulfanylovou a jednou diethylaminovou skupinou. Cyklizací vznikl zinečnatý komplex (**2**) složený ze čtyř jednotek tohoto prekurzoru. AzaPc ovšem svou hodnotou R_f přesně odpovídal symetrickému 2,3,9,10,16,17,23,24-oktakis(*tert*-butylsulfanyl)-1,4,8,11,15,18,22,25-(oktaaza) ftalocyaninato zinečnatému komplexu, který je substituován pouze *tert*-butylsulfanylovými skupinami a stojí v pomyslné řadě plánovaných AzaPc podle počtu dusíků na opačném konci. Při následné separaci na chromatografické koloně by tak bylo nemožné oddělit jednotlivé skupiny látek od sebe.

Bylo nutné zvýšit hydrofilitu jednoho prekurzoru, čímž by se zároveň zvýšily rozdíly hodnot R_f jednotlivých produktů. Tak bychom dosáhli jejich snadnější izolace z poměrně složité směsi látek. Proto jsem diethylaminovou skupinu v látce **1** nahradila 2-hydroxyethylmethylamino skupinou ve stejné pozici. Z 5,6-dichlorpyrazin-2,3-dikarbonitrilu (**3**), výchozí látky pro přípravu většiny substituovaných pyrazin-2,3-dikarbonitrilů, jsem nukleofilní substitucí jednoho chloru získala 5-chlor-6-(2-hydroxyethylmethylamino)pyrazin-2,3-dikarbonitril (**4**). Jednalo se pouze o meziprodukt, který jsem kvůli vysoké nestabilitě neizolovala a použila přímo do následující reakce. V dalším kroku syntézy jsem na místo druhého chloru substituovala *tert*-butylsulfanylovou skupinu. Připravila jsem tak 5-(*tert*-butylsulfanyl)-6-(2-hydroxyethylmethylamino)pyrazin-2,3-dikarbonitril (**6**) pro následnou cyklizaci.

Při reakci prekursoru (**6**) s bezvodým octanem zinečnatým v prostředí bezvodého dimethylformamidu se mi bohužel molekulu nepodařilo zacyklit.

Z průběžně pořizovaných TLC během syntézy látky **4**, ale i **6** jsem zjistila přítomnost ještě další látky, která vznikala již při prvním kroku přípravy. Podle NMR spekter a elementárního složení jsme ji identifikovali jako 4-methyl-3,4-dihydro-2H-pyrazino[2,3-b][1,4]oxazin-6,7-dikarbonitril (**5**). Terminální hydroxylová skupina hydroxyethylmethylaminu se po navázání aminoskupinou zacyklila za vzniku morfolinového kruhu jak je patrné na **Schéma 15**. K ověření struktury jsem se pokoušela vzniklou látku acetylovat, čímž by se případně zjistila přítomnost hydroxylové skupiny. Reakce podle očekávání neprobíhala, čímž se dále potvrdila předpokládaná struktura produktu **5**.

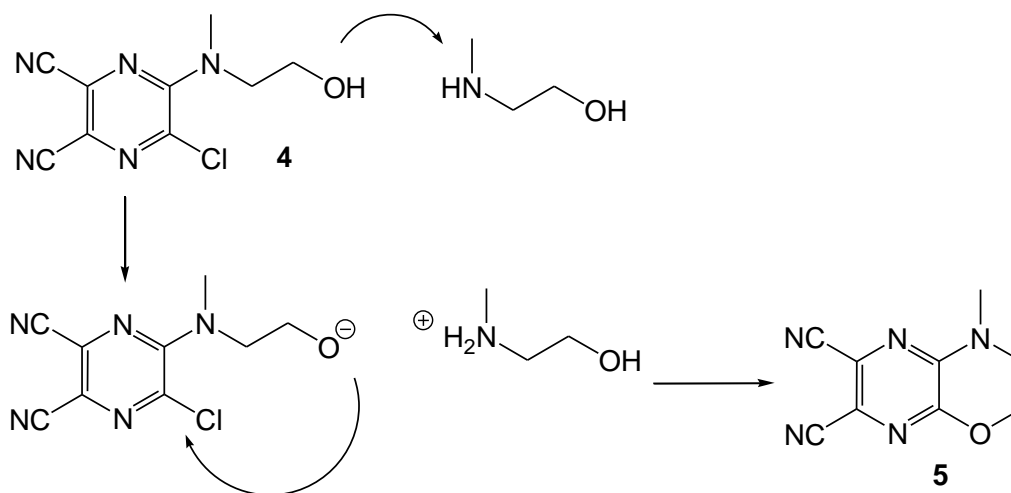
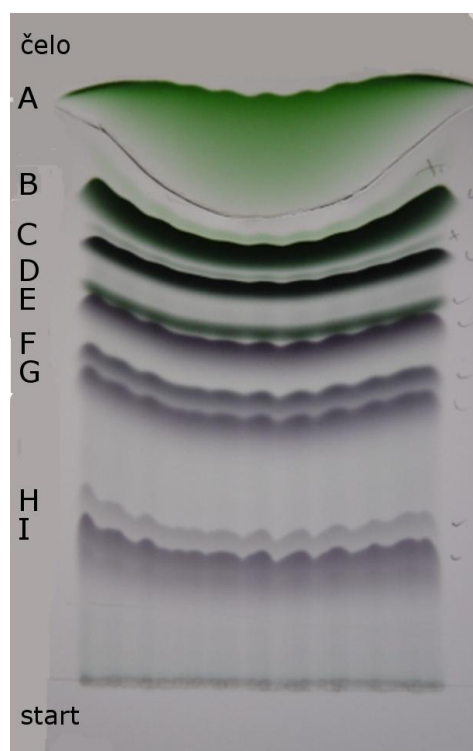


Schéma 15. Mechanismus vzniku morfolinového kruhu

Tuto cestu přípravy jsem opustila. Mezitím se díky náhodnému objevu podařilo zjistit, že u bezkovových derivátů dochází k výrazným rozdílům v R_f hodnotách u látek podobných méjím sérii. Rozhodla jsem se proto provést cyklizaci metodou statistické kondenzace dvou různých prekursorů - 5,6-(*tert*-butylsulfanyl)-2,3-dikarbonitrilu (**7**) a již dříve použitým prekurzorem (**1**) – pomocí butanolátu hořečnatého s následným odkovováním vzniklé směsi. Vycházela jsem z předpokladu, že prekursorů mají srovnatelnou reaktivitu, proto jsem použila výchozí látky v molárním poměru 1:1. AzaPc s centrálním atomem zinku vykazují sice vysokou produkci singletového kyslíku, ale nízkou fluorescence. Naopak hořečnaté komplexy dosahují nízké produkce singletového kyslíku, ale naproti tomu vysoké fluorescence. Pro lepší měření fluorescence jsem k cyklizaci použila hořečnaté ionty. Vznikla velmi složitá směs

reakčních produktů (8) – (22) včetně jejich izomerů. Směs hořečnatých komplexů se díky blízkým R_f hodnotám nedala na TLC rozdělit, bylo nutné převést ji na bezkovové deriváty. K odstranění hořčíku jsem použila reakci s kyselinou trifluoroctovou (TFA). Z pořízeného TLC byly patrné fluorescenční skvrny za startem, proto jsem odkovování zopakovala, tentokrát jsem pro polovinu produktu použila reakci s TFA a pro druhou reakci s kyselinou *p*-toluensulfonovou za stejných reakčních podmínek. Jako výhodnější se ukázala kyselina *p*-toluensulfonová, s kterou jsem odkovování veškerého produktu zopakovala .



Obr. 21. TLC chromatografie látek
8-22

Pro identifikaci jednotlivých skvrn jsem provedla preparativní TLC. Jednotlivé frakce jsem poté vyškrábala z desky a extrahovala do tetrahydrofuranu. Přiřazení jednotlivých kongenerů daným frakcím proběhlo na základě MALDI-TOF spektroskopie.

Zvláštností byl přechod skvrny D na TLC desce pod skvrnu E nebo nad ní podle koncentrace. Je-li skvrna D více koncentrovaná nepřejde přes E a zůstává pod ní. V opačném případě, je-li koncentrace nižší, zůstává D nad E (jako je tomu i na **Obr. 21.**).

Pro rozlišení polohových izomerů bylo nutné provést separaci pomocí sloupcové chromatografie, kterou jsem z časových důvodů nedokončila. Z dalších výsledků ovšem vyplynulo, že jednotlivé kongenery nebude nakonec potřeba separovat.

7 Závěr

V rámci mé diplomové práce jsem připravila tyto prekurzory AzaPc:

- 4-methyl-3,4-dihydro-2H-pyrazino[2,3-b][1,4]oxazin-6,7-dikarbonitril (**5**)
- 5-(*tert*-butylsulfanyl)-6-((2-hydroxyethylmethylamino)pyrazin-2,3-dikarbonitril) (**6**)

Tetramerizací prekurzoru se mi podařilo syntetizovat AzaPc:

- 2,9,16,23-tetrakis(*tert*-butylsulfanyl)-3,10,17,24-tetrakis(diethylamino)-1,4,8,11,15,18,22,25-(oktaaza)ftalocyaninatozinečnatý komplex (**2**)

Ze sloučenin 5-(*tert*-butylsulfanyl)-6-(diethylamino)pyrazin-2,3-dikarbonitrilu (**1**) a 5,6-bis(*tert*-butylsulfanyl)pyrazin-2,3-dikarbonitrilu (**7**) jsem cyklizací připravila směs nesymetrických AzaPc (**8-22**) s různým počtem periferních aminoskupin, ze které jsem vyizolovala preparativní TLC 8 frakcí a charakterizovala je pomocí MALDI-TOF.

SYNTÉZA NESYMETRICKÝCH DERIVÁTŮ
AZAFTALOCYANINŮ VI.

Váchová Lenka

Cílem bylo nalézt nejvhodnější postup syntézy azaftalocyaninů (AzaPc) s různým počtem dusíkatých substituentů na periferii. Cyklizací prekurzoru 5-(*tert*-butylsulfanyl)-6-(diethylamino)pyrazin-2,3-dikarbonitril (**1**) s jednou *tert*-butylsulfanylovou a jednou diethylaminovou skupinou vznikl zinečnatý komplex (**2**) složený ze čtyř jednotek tohoto prekurzoru. Jeho R_f hodnota se pohybovala okolo hodnot symetrického 2,3,9,10,16,17,23,24-oktakis(*tert*-butylsulfanyl)-1,4,8,11,15,18,22,25-(oktaaza)ftalocyaninatozinečnatého komplexu, což by znemožnilo jejich izolaci ze směsi. Dvoustupňovou syntézou byl připraven více hydrofilní prekurzor 5-(*tert*-butylsulfanyl)-6-(2-hydroxyethylmethylamino)pyrazin-2,3-dikarbonitril (**6**) pro následnou cyklizaci. Při jeho syntéze vznikl také vedlejší produkt s novým morfolinovým kruhem 4-methyl-3,4-dihydro-2H-pyrazino[2,3-*b*][1,4]oxazin-6,7-dikarbonitril (**5**). K cyklizaci prekurzoru s bezvodým octanem zinečnatým v prostředí bezvodého dimethylformamidu nedošlo. Vzhledem k tomu, že u bezkovových derivátů podobných látek dochází k výrazným rozdílům v R_f hodnotách, byly k cyklizaci metodou statistické kondenzace použity dva vhodné prekurzory - 5,6-(*tert*-butylsulfanyl)-2,3-dikarbonitril (**7**) a (**1**) v molárním poměru 1:1. V prostředí butanolátu hořečnatého vznikla velmi složitá směs 15ti hořečnatých komplexů (**8-22**) včetně jejich izomerů. Po odstranění centrálního kovu pomocí kyseliny trifluoroctové dochází k snadnější izolaci jednotlivých látek. Pro rozlišení polohových izomerů bylo nutné provést separaci pomocí sloupcové chromatografie.

Klíčová slova: Azaftalocyanin, tetrapyrazinoporfyrazin, statistická kondenzace, singletový kyslík.

SYNTHESIS OF UNSYMMETRICAL DERIVATES OF
AZAPHTALOCYANINES VI.

Vachova Lenka

Aim of the work was to find optimal synthesis of azaphtalocyanines (AzaPcs) with different number of nitrogen-containing peripheral substituents. Zinc complexes (**2**) of AzaPc of tetrapyrazinoporphyrazine type were prepared by cyclization of precursor 5-(*tert*-butylsulfanyl)-6-(diethylamine)pyrazine-2,3-dicarbonitrile (**1**). Its R_f value corresponded exactly to the symmetrical 2,3,9,10,16,17,23,24 oktakis(*tert*-butylsulfanyl)-1,4,8,11,15,18,22,25-(octaaza)phtalocyaninato zinc(II) complex and they will not be isolatable from statistical mixture in future. Therefore, more polar precursor 5-(*tert*-butylsulfanyl)-6-(2-hydroxyethylmethylamine)pyrazine-2,3-dicarbonitrile (**6**) was synthesized for tetramerisation. Side product containing new morpholine ring was also isolated - 4-methyl-3,4-dihydro-2H-pyrazino[2,3-b][1,4]oxazine-6,7-dicarbonitrile (**5**) during preparation of (**6**). The cyclization of (**6**) in anhydrous zinc acetate and anhydrous dimethylformamide was unsuccessful. Serendipitously, we have uncovered that metal-free derivatives similar to my differ in R_f values. Therefore, mixture of 15 magnesium phtalocyanines complexes (**8-22**) including their isomers was obtained from the statistical synthesis of 5,6-(*tert*-butylsulfanyl)-2,3-dicarbonitrile (**7**) and dicarbonitrile (**1**) in magnesium butoxide at the 1:1 ratio. The central magnesium can be removed in acidic media (TFA) and several metal-free derivatives can be isolated by preparative TLC. The mixture of positional isomers is necessary to separate by column chromatography on silica.

Keywords: Azaphtalocyanine, tetrapyrazinoporphyrazine, statistical condensation, singlet oxygen.

8 Seznam použité literatury

- ¹ Foote, C. S. (1991). *Photochem. Photobiol.*, 54(5), 659.
- ² Ústav lékařské biofyziky, UP Olomouc, Kolářová H. – Klinická radiobiologie [online]. [2008-02-21]. Dostupné z: <http://www.radiolog.cz/dra/archiv/rab/09.kapitola.pdf>
- ³ Basic Photosensitization by Dennis P. Valenzeno [online]. [cit. 2008-02-21]. Dostupné z: <http://www.photobiology.info/develop/photosensitization.asp>
- ⁴ Molecular Imaging Chemistry Laboratory Department of Radiology University of Pennsylvania [online]. [cit. 2008-02-21]. Dostupné z: <http://www.uphs.upenn.edu/radiology/depa/MICL/MolecularImagingChemistry2.htm>
- ⁵ Cramers, P., Ruevekamp, M., Oppelaar, H., Dalesio, O., Baas, P., Stewart, F.A. (2003). *Br. J. Cancer*, 88, 283-90.
- ⁶ Centre for Photobiology and Photodynamic Therapy [online], [cit. 2008-03-07]. Dostupné z: http://www.bmb.leeds.ac.uk/pdt/photosensitisers_intro.htm
- ⁷ a) Wilson B. C. (2002). *Can. J. Gastroenterol.*, 16(6), 393–396.
b) Vrouenraets, M. B., Visser, G. W. M., Snow, G. B., van Dongen, G. A. M. S. (2003). *Anticancer Res.*, 23, 505–522.
c) Capella, M. A. M., Capella, L. S. (2003). *J. Biomed. Sci.*, 10, 361–366.
- ⁸ Padney, R. K., Herman, C. H. K. (1998). *Chem. Ind.*, 739.
- ⁹ Freitas, I., Lipid, B. (1990). *J. Photochem. Photobiol.*, 7, 359-361.
- ¹⁰ Zimčík, P., Miletín, M. (2004). *Ceska Slov. Farm.*, 53, 272.
- ¹¹ Hanack, M., Heckmann, H., Polley, R. (1997). *Methoden der Organischen Chemie (Houben–Weyl)*, vol. E9d; 4th Ed., Thieme Verlag :Stuttgart.
- ¹² a) Gouterman, M., Wagnière, G. H., Synder, L. C. (1963). *J. Mol. Spectrosc.*, 11, 108.
b) Weiss, C., Kobayashi, H., Gouterman, M. (1965). *J. Mol. Spectrosc.*, 16, 415.
c) A. J. McHugh, M. Gouterman, *Theor. Chim. Acta*, 1972, 24, 346.
- ¹³ Sternberg, E. D., Dolphin, D., Bruckner, C. (1998). *Tetrahedron*, 54, 4151-4202.
- ¹⁴ Calin, M. A., Parasca, S. V. (2006). *J. Optoelektron. Adv. Mater.*, 8, 3, 1173 – 1179.
- ¹⁵ Spikes, J. D., Bommer, J. C. (1996). *Chlorophylls*, CRC Press, Boston, 1181
- ¹⁶ Huang, Z. (2006). *Photodiagn. Photodyn. Ther.*, 3, 3-10.
- ¹⁷ Anti cancer drug: PDT therapy against cancer growth tumor [online]. [cit. 2008-02-18]. Dostupné z: www.photogem.ru.
- ¹⁸ Triesscheijn, M., Baas, P., Schellens, J. H. M., Stewart, F. A. (2006). *Oncologist*, 11, 1034-1044.
- ¹⁹ Schweitzer, V. G. (2001). *Lasers. Surg. Med.*, 29, 305-313.
- ²⁰ a) Muller, P. J., Wilson, B. C. (2006). *Lasers. Surg. Med.*, 38, 384-389.
b) Madsen, S. J., Hirschberg, H. (2006). *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.*, 25, 453-465.
- ²¹ a) Wolfsen, H. C. (2005). *J. Clin. Gastroenterol.*, 39, 653-664.
b) Wiedmann, M., Berr, F., Schiefke, I., Witzigmann, H., Kohlhaw, K., Mossner, J., Caca, K. (2004). *Gastrointest. Endosc.*, 60, 68-75.

- ²² Martin, D. (1983). *Harper's Review of Biochemistry*. Los Altos, CA: Lange Medical Publications; 317-333.
- ²³ a) Peng, Q., Warloe, T., Berg, K., Moan, J., Kongshaug, M., Giercksky, K. E., Nesland, J. M. (1997). *Cancer*, *79*, 2282-2308.
b) Peng, Q., Berg, K., Moan, J., Kongshaug, M., Nesland, J. M. (1997). *Photochem. Photobiol.*, *65*, 235-251.
- ²⁴ Redmond, R. W., Gamlin, J. N. (1999). *Photochem. Photobiol.*, *70*, 391-475.
- ²⁵ Webber, J., Kessel, D., Fromm, D. (1997). *J. Photochem. Photobiol., B*, *37*, 151-153.
- ²⁶ a) Schoenfeld, N., Epstein, O., Lahav, M., Mamet, R., Shaklai, M., Atsmon, A. (1988). *Cancer Lett.*, *43*, 43-48.
b) Kondo, M., Hirota, N., Takaoka, T., Kajiwara, M. (1993). *Cell Biol. Toxicol.*, *9*, 95-105.
- ²⁷ Leibovici, L., Schoenfeld, N., Yehoshua, H. A., Mamet, R., Rakowsky, E., Shindel, A., Atsmon, A. (1988). *Cancer*, *62*, 2297-2300.
- ²⁸ a) Dailey, H. A., Smith, A. (1984). *Biochem. J.*, *223*, 441-445.
b) Vanhillegersberg, R., Vandenberg, J. W. O., Kort, W. J., Terpstra, O. T., Wilson, J. H. P. (1992). *Gastroenterology*, *103*, 647-651.
- ²⁹ Fukuda, H., Casas, A., Battle, A. (2006). *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.*, *25*, 127-143.
- ³⁰ a) Tunstall, R. G., Barnett, A. A., Schofield, J., Griffiths, J., Vernon, D. I., Brown, S. B., Roberts, D. J. H. (2002). *Br. J. Cancer*, *87*, 246-250.
b) Lopez, R. F. V., Lange, N., Guy, R., Bentley, M. (2004). *Adv. Drug Delivery Rev.*, *56*, 77-94.
- ³¹ a) Lopez, R. F. V., Lange, N., Guy, R., Bentley, M. (2004). *Adv. Drug Delivery Rev.*, *56*, 77-94.
b) Zenzen, V., Zankl, H. (2003). *Cancer Lett.*, *202*, 35-42.
- ³² a) Kloek, J., vanHenegouwen, G. (1996). *Photochem. Photobiol*, *64*, 994-1000.
b) Whitaker, C. J., Battah, S. H., Forsyth, M. J., Edwards, C., Boyle, R. W., Matthews, E. K. (2000). *Anti-Cancer Drug Des.*, *15*, 161-170.
- ³³ Uehlinger, P., Zellweger, M., Wagnieres, G., Juillerat-Jeanneret, L., van den Bergh, H., Lange, N. (2000). *J. Photochem. Photobiol., B*, *54*, 72-80.
- ³⁴ Brunner, H., Hausmann, F., Knuechel, R. (2003). *Photochem. Photobiol.*, *78*, 481-486.
- ³⁵ a) Babilas, P., Landthaler, M., Szeimies, R. M. (2006). *Eur. J. Dermatol.*, *16*, 340- 348.
b) Ettl, K. (2004). *Čs. Dermatol.*, *70*, 200-204.
- ³⁶ a) Calzavara-Pinton, P. G., Venturini, M., Sala, R. (2005). *J. Photochem. Photobiol., B*, *78*, 1-6.
b) Ettl, K. (2006). *Čas.Lék.čes*, *145*, 184-187.
- ³⁷ a) Hwang, E. J., Chang, S. H., Kim, B. S., Cho, M. K. (2008). *J. Am. Acad. Dermatol.*, *58*, AB17-AB17.
b) Wiegell, S. R., Wulf, H. C. (2006). *J. Am. Acad. Dermatol.*, *54*, 647-651.
c) Niwa, A. B. M., Godoi, L., Torezan, L., Osorio, N. (2008). *J. Am. Acad. Dermatol.*, *58*, AB141-AB141.
- ³⁸ a) Stringer, M. R., Collins, P., Robinson, D. J., Stables, G. I., SheehanDare, R. A. (1996). *J. Invest. Dermatol.*, *107*, 76-81.

- b) Collins, P., Robinson, D. J., Stringer, M. R., Stables, G. I., SheehanDare, R. A. (1997). *Br. J. Dermatol.*, 137, 743-749.
- 39 a) Fabbrocini, G., Di Costanzo, M. P., Riccardo, A. M., Quarto, M., Colasanti, A., Roberti, G., Monfrecola, G. (2001). *J. Photochem. Photobiol.*, B, 61, 30-34.
- 40 a) Smetana, Z., Malik, Z., Orenstein, A., Mendelson, E., BenHur, E. (1997). *Lasers. Surg. Med.*, 21, 351-358.
- b) Wainwright, M. (2003). *Int. J. Antimicrob. Agents*, 21, 510-520.
- 41 Bonnett, R. (1995). *Chem. Soc. Rev.*, 24, 19-33.
- 42 Richter, A. M., Kelly, B., Chow, J. et al. (1987). *J. Natl. Cancer. Inst.*, 79, 1327-1332.
- 43 a) Klein, R., Klein, B. E. K, Linton, K. L. P. (1992). *Ophthalmology*, 99, 933-944.
- b) Vingerling, J. R., Dielemans, I., Hofman, A. et al. (1995). *Ophthalmology*, 102, 205-210.
- 44 a) Heiba, I. M., Elston, R. C., Klein, B. E., Klein, R. (1994). *Genet.Epidemiol.*, 11, 51-67.
- b) Hyman, J., Lilienfeld, A. M., Ferris, F. L., Fine, S. L. (1983). *Am.J.Ophthalmol.*, 118, 213-227.
- c) Holz, F. G., Pauleikhoff, D., Spaide, R. F., Bird, A. C. (2004). Berlin, Heidelberg, New York, Springer-Verlag.
- 45 Reprodukované z : Kolář, P. (2005). *Čas.Lék.čes.* 2005, 144, 516-520.
- 46 Schnidt-Erfurth, U., Mille, J. W., Sickenberg, M. et al.(1999). *Arch. Ophthalmol.*, 117, 1177-1187.
- 47 Soušek, P., Boguszaková, J., Gajdošíková, Z., Machýčková, J. (1997). *Čs. Oftal.*, 53, 94-100.
- 48 Marshall, J. (1987). *Eye*, 1, 287-295.
- 49 Moore, D. J., Hussain, A. A., Marshall, J. (1995). *Invest. Ophthalmol. Vis.Sci.*, , 36, 1290-1297
- 50 a) Costa, R. A., Jorge, R., Calucci, D., Melo, L. A. S., Cardillo, J. A., Scott, I. U. (2007). *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.*, 245, 1273-1280.
- b) Donati, G. (2007). *Ophthalmologica*, 221, 366-377.
- 51 Lui, H., Hobbs, L., Tope, W. D., Lee, P. K., Elmets, C., Provost, N., Chan, A., Neyndorff, H., Su, X. Y., Jain, H. et al. (2004). *Arch. Dermatol.*, 140, 26-32.
- 52 Mordon, S. (2007). *Ann. Dermatol. Venereol.*, 134, 281-286.
- 53 Berenbaum, M. C., Akande, S. L., Bonnett, R., Kaur, H., Ioannou, S., White, R. D., Winfield, U. J. (1986). *Br. J. Cancer*, 54, 717-725.
- 54 Berenbaum, M. C., Bonnett, R., Chevretton, E. B., Akandeadebakin, S. L., Ruston, M. (1993). *Laser Med. Sci*, 8, 235-243.
- 55 Ronn, A. M.; Nouri, M.; Lofgren, L. A. et al.: *Laser Med. Sci.*, 1996, 11, 267
- 56 Kiesslich, T., Berlanda, J., Plaetzer, K., Krammer, B., Berr, F. (2007). *Photochem. Photobiol. Sci.*, 6, 619-627.
- 57 Svensson, J., Johansson, A., Grafe, S., Gitter, B., Trebst, T., Bendsoe, N., Andersson-Engels, S., Svanberg, K. (2007). *Photochem. Photobiol.*, 83, 1211-1219.
- 58 Biel, M. A. (2007). *Photochem. Photobiol.*, 83, 1063-1068.
- 59 a) Baas, P., Saarnak, A. E., Oppelaar, H., Neering, H., Stewart, F. A. (2001). *Br. J. Dermatol.*, 145, 75-78.

- b) Triesscheijn, M., Ruevekamp, M., Antonini, N., Neering, H., Stewart, F. A., Baas, P. (2006). *Photochem. Photobiol.*, 82, 1686-1690.
- ⁶⁰ Zimmermann, A., Ritsch-Martel, M., Kostron, H. (2001). *Photochem. Photobiol.*, 74, 611-616.
- ⁶¹ a) Moore, C. M., Nathan, T. R., Lees, W. R., Mosse, C. A., Freeman, A., Emberton, M., Bown, S. G. (2006). *Lasers. Surg. Med.*, 38, 356-363.
- b) Nathan, T. R., Whitelaw, D. E., Chang, S. C., Lees, W. R., Ripley, P. M., Payne, H., Jones, L., Parkinson, M. C., Emberton, M., Gillams, A. R. et al. (2002). *J. Urol.*, 168, 1427-1432.
- ⁶² Bommer, J. C., Burnham, B. F. (1987). Tetrapyrrole therapeutic agents. US 4693885
- ⁶³ Gomi, S., Nishizuka, T., Ushiroda, O., Uchida, N., Takahashi, H., Sumi, S. (1998). *Heterocycles*, 48, 2231-2243.
- ⁶⁴ Hargus, J. A., Fronczek, F. R., Vicente, M. G. H., Smith, K. M. (2007). *Photochem. Photobiol.* 83, 1006-1015.
- ⁶⁵ Saito, K., Mikuniya, N., Aizawa, K. (2000). *Jpn. J. Cancer Res.*, 91, 560-565.
- ⁶⁶ a) Chan, A. L., Juarez, M., Allen, R., Volz, W., Albertson, T. (2005). *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.*, 21, 72-78.
- b) Kujund, M., Rustemovi, T. J. V. D. S. N., Kati, R. A. H. M. R. M., Wang, R. C. R. A. L. S. (2007). *J. Surg. Oncol.*, 96, 518-524.
- ⁶⁷ Kato, H., Furukawa, K., Sato, M., Okunaka, T., Kusunoki, Y., Kawahara, M., Fukuoka, M., Miyazawa, T., Yana, T., Matsui, K. et al. (2003). *Lung Cancer*, 42, 103-111.
- ⁶⁸ Light Science Oncology, Inc. [online]. 2008 [cit. 2008-02-13]. Dostupné z: www.lightsciences.com.
- ⁶⁹ Taber, S. W., Fingar, V. H., Coats, C. T., Wieman, T. J. (1998). *Clin. Cancer. Res.*, 4, 2741-2746.
- ⁷⁰ Yumita, N., Han, Q. S., Kitazumi, I., Umemura, S. (2008). *Cancer Sci.*, 99, 166-172.
- ⁷¹ Pandey, R. K., Bellnier, D. A., Smith, K. M., Dougherty, T. J. (1991). *Photochem. Photobiol.*, 53, 65-72.
- ⁷² Henderson, B. W., Bellnier, D. A., Greco, W. R., Sharma, A., Pandey, R. K., Vaughan, L. A., Weishaupt, K. R., Dougherty, T. J. (1997). *Cancer Res.*, 57, 4000-4007.
- ⁷³ Pandey, R. K., Shiau, F. Y., Sumlin, A. B., Dougherty, T. J., Smith, K. M. (1992). *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2, 491-496.
- ⁷⁴ Pallenberg, A. J., Dobhal, M. P., Pandey, R. K. (2004). *Org. Process Res. Dev.*, 8, 287-290.
- ⁷⁵ Baba, K., Pudavar, H. E., Roy, I., Ohulchanskyy, T. Y., Chen, Y. H., Pandey, R. K., Prasad, P. N. (2007). *Mol. Pharm.*, 4, 289-297.
- ⁷⁶ Bellnier, D. A., Greco, W. R., Loewen, G. M., Nava, H., Oseroff, A. R., Pandey, R. K., Tsuchida, T. and Dougherty, T. J. (2003). *Cancer Res.*, 63, 1806-1813.
- ⁷⁷ Bellnier, D. A., Greco, W. R., Nava, H., Loewen, G. M., Oseroff, A. R., Dougherty, T. J. (2006). *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 57, 40-45.
- ⁷⁸ Loewen, G. M., Pandey, R., Bellnier, D., Henderson, B., Dougherty, T. (2006). *Lasers. Surg. Med.*, 38, 364-370.
- ⁷⁹ ClinicalTrials.gov [online]. 2008 [cit. 2008-02-07]. Dostupné z: www.clinicaltrials.gov.

- 80 Scherz, A., Salomon, Y., Brandis, A., Scheer, H. (2003). Palladium-substituted bacteriochlorophyll derivatives and use thereof. US 6569846
- 81 Brun, P. H., DeGroot, J. L., Dickson, E. F. G., Farahani, M., Pottier, R. H. (2004). *Photochem. Photobiol. Sci.*, *3*, 1006-1010.
- 82 Weersink, R. A., Forbes, J., Bisland, S., Trachtenberg, J., Elhilali, M., Brun, P. H., Wilson, B. C. (2005). *Photochem. Photobiol.*, *81*, 106-113.
- 83 Trachtenberg, J., Bogaards, A., Weersink, R. A., Haider, M. A., Evans, A., McCluskey, S. A., Scherz, A., Gertner, M. R., Yue, C., Appu, S. et al. (2007). *J. Urol.*, *178*, 1974-1979.
- 84 a) Huang, Z., Chen, Q., Dole, K. C., Barqawi, A. B., Chen, Y. K., Blanc, D. Q., Wilson, B. C., Hetzel, F. W. (2007). *Photochem. Photobiol. Sci.*, *6*, 1318-1324.
b) Huang, Z., Chen, Q., Luck, D., Beckers, J., Wilson, B. C., Trncic, N., LaRue, S. M., Blanc, D., Hetzel, F. W. (2005). *Lasers. Surg. Med.*, *36*, 390-397.
- 85 Framme, C., Sachs, H. G., Flucke, B., Theisen-Kunde, D., Birngruber, R. (2006). *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, *47*, 5437-5446.
- 86 Sheehy, B., Di Mauro, L.F. (1996). *Ann. Rev. Phys. Chem.*, *47*, 463.
- 87 Braun, A., Tcherniac, J. (1907). *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, *40*, 2709.
- 88 de Diesbach, H., von der Weid, E. (1927) *Helv. Chim. Acta*, *10*, 886.
- 89 a) Linstead, R. P. (1934). *J. Chem. Soc.*, 1016.
b) Byrne, G. T., Linstead, R. P., Lowe, A. R. (1934) *J. Chem. Soc.*, 1017.
c) Linstead, R. P., Lowe, A. R. (1934). *J. Chem. Soc.*, 1022.
d) Dent, C. E., Linstead, R. P. (1934). *J. Chem. Soc.*, 1027.
e) Dent, C. E., Linstead, R. P., Lowe, R. (1934). *J. Chem. Soc.*, 1033.
f) Barret, P. A., Dent, C. E., Linstead, R. P. (1936). *J. Chem. Soc.*, 1719.
g) Barret, P. A., Frye, D. A., Linstead, R. P. (1938). *J. Chem. Soc.*, 1157.
h) Anderson, J. S., Bradbrook, E. F., Cook, A. H., Linstead, R. P. (1938). *J. Chem. Soc.*, 1151.
i) Linstead, R. P. (1939). *Ber. Dtsch. Chem. Ges. A*, *72*, 93.
- 90 Linstead, R. P. (1933). *Br. Ass. Adv. Sci. Rep.*, 465.
- 91 Sharman, W. M., Allen, C. M., Van Lier, J. E (2000) *Methods Enzymol.* *319*, 376-400.
- 92 Dolmans, D. E. J. G. J., Fukumura, D., Jain, R. K. (2003). *Nat. Rev. Cancer*, *3*, 380.
- 93 Reddan, J. C., Anderson, C. Y., Xiu, H. et al. (1999). *Photochem. Photobiol.*, *70*, 72.
- 94 Leznoff, C. C., Lever, A. B. P. (1989 – 1996). *Phthalocyanines, Properties and Applications*, 1–4.
- 95 a) Hanack, M., Lang, M. (1994). *Adv. Mater.*, *6*, 819.
b) Hanack, M., Lang, M. (1995). *Chemtracts*, *8*, 131.
c) Hanack, M., Datz, A., Fay, R., Fischer, K., Kepeler, U., Koch, J., Metz, J., Metzger, M., Schneider, O., Schulze, H.-J. (1986) in *Handbook of Conducting Polymers*, *1*, 133.
- 96 a) Schultz, H., Lehman, H., Rein, M., Hanack, M. (1991). *Structure and Bonding*, *74*, 41.
b) Drechsler, U., Hanack, M. (1996). *Comprehensive Supramolecular Chemistry*, *9*, 283.
- 97 a) van der Pol, J. F., Neelman, E., Zwikker, J. W., Nolte, R. J. M., Drenth, W., Aerts, J., Visser, R., Picken, S. J. (1989). *Liq. Cryst.*, *6*, 577.

- b) Simon, J., Sirlin, C. (1989). *Pure Appl. Chem.*, 61, 1625.
- c) Engel, M. K., Bassoul, P., Bossio, L., Lehmann, H., Hanack, M., Simon, J. (1993). *Liq. Cryst.*, 15, 709.
- ⁹⁸ a) Altindal, A., Öztürk, Z.Z., Dabak, S., Bekaroğlu, Ö. (2001). *Sens. Actuators B*, 77, 389.
- b) Rella, R., Spadavecchia, J., Ciccarella, G., Siciliano, P., Vasapollo, G., Valli, L. (2003). *Sens. Actuators B*, 89, 86.
- c) Lee, Y.L., Sheu, C.Y., Hsiao, R.H. (2004). *Sens. Actuators B*, 99, 281.
- ⁹⁹ Simon, J., André, J.-J. (1985). *Mol. Semicond.*, 73.
- ¹⁰⁰ a) Takano, S., Enokida, T., Kambata, A. (1984). *Chem. Lett.*, 2037.
- b) Loutfy, R. O., Hsiao, C. K., Hor, A. M., Di Paola-Baranyl, G. J. (1985). *Imaging Sci.*, 29, 148.
- c) Law, K.-Y. (1993). *Chem. Rev.*, 93, 449.
- ¹⁰¹ a) Kuder, J. E. (1988). *Imaging Sci.*, 32, 51.
- b) Kobayashi, S., Iwasaki, K., Sasaki, H., Oh-Hara, S., Nishizawa, M., Katayose, M. (1991). *Jpn. J. Appl. Phys.*, , 30, 114.
- c) Ao, R., Kümmert, L., Haarer, D. (1995). *Adv. Mater.*, 5, 495.
- ¹⁰² Wöhrle, D., Shopova, M., Müller, S., Milev, A. D., Mantareva, V. N., Krastev, K. K. (1993). *J. Photochem. Photobiol. B*, 21, 155.
- ¹⁰³ Schlettwein, D., Kaneko, M., Yamada, A. , Wöhrle, D., Jaeger, N. I. (1991). *J. Phys. Chem.*, 95, 1748.
- ¹⁰⁴ Wöhrle, D., Meissner, D. (1991). *Adv. Mater.*, 3, 129.
- ¹⁰⁵ a) Marks, T. J. (1985). *Science*, 227, 881.
- b) Marks, T. J (1990). *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 29, 857.
- ¹⁰⁶ a) Nalwa, H. S., Shirk, J. S. (1996). *Phthalocyanines, Properties and Applications*, 4, 79-182.
- b) Casstevens, M. K., Samoc, M., Pflieger, J., Prasad, P. N. (1990). *J. Chem. Phys.*, 92, 2019.
- c) Simon, J. , Bassoul, P., Norvez, S. (1989). *New J. Chem.*, 13, 13.
- ¹⁰⁷ Leznoff, C. C. (1989). *Phthalocyanines, Properties and Applications*, 1, 1.
- ¹⁰⁸ de la Torre, G., Claessens, C. G., Torres, T. (2000)., *J. Org. Chem.*, 2821-2830.
- ¹⁰⁹ Rager C., Schmid G., Hanack M. (1999). *Chem. Eur J.* 5, 280-288.
- ¹¹⁰ Drew, D. M., Leznoff, C. C. (1994). *Synlett*, 623-624.
- ¹¹¹ a) Piechocki, C., Simon, J. (1985). *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 259-260.
- b) Kudrevich, S.V., Ali, H., van Lier, J. E. (1994). *J. Chem. Soc., Perkin Trans*, 2767-2774.
- c) Vacus, J., Memetzidis, G., Doppelt, P., Simon, J. (1994). *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 697-698.
- d) Linssen, T. G., Dürr, K., Hanack, M., Hirsch, A. (1995). *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 103-104.
- e) Kliesch, H., Weitemeyer, A., Müller, S., Wöhrle, D. (1995). *Liebigs. Ann.*, 1269-1273.
- f) Aoudia, M., Cheng, G., Kennedy, V.O., Kenney, M.E., Rodgers, M. A. J. (1997). *J. Am. Chem. Soc.*, 6029-6039.
- ¹¹² a) de la Torre, G., Torres, T. (1997). *J. Porphyrins Phtalocyanines*, 221-226.

- b) Torres, T., de la Torre, G., García-Ruiz, J. (1999). *Eur. J. Org. Chem.*, 2323-2326.
- ¹¹³ a) Rojo, G., de la Torre, G., García-Ruiz, J., Ledoux, I., Torres, T., Zyss, J., Agullo-López, F. (1999). *Chem. Phys.*, 27-34.
- b) Maya, E.M., García, C., García-Frutos, E.M., Vázquez, P., Torres, T., *J. Org. Chem.*, v tisku.
- ¹¹⁴ Zimcik, P.; Miletin, M.; Musil, Z. et al. (2006). *J. Photochem. Photobiol., A: Chem.*, 183, 59-69.
- ¹¹⁵ a) Clarkson, G. J., McKeown, N. B., Treacher, K. E. (1995). *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 1817-1823.
- b) Treacher, K. E., Clarkson, G. J., McKeown, N. B. (1995). *Mol. Cryst., Liq. Cryst.*, 260, 255-260.
- c) Ali-Adib, Z., Clarkson, G. J., Cook, A., McKeown, N. B. (1996). *Macromolecules*, 29, 913-917.
- ¹¹⁶ Brewis, M., Clarkson, G. J., Holder, A. M., McKeown, N. B. (1998). *Chem. Commun.*, 1979-1980.
- ¹¹⁷ a) McKeown, N. B.; Chambrier, I.; Cook, M. J. (1990). *J. Chem. Soc Perkin Trans.*, 1169-1177.
- b) Chambrier, I.; Cook, M. J., Cracknell, S. J., MacMurdo, J. (1993). *J. Matter. Chem.*, 3, 841.
- ¹¹⁸ a) Linssen, T. G., Hanack, M. (1994). *Chem. Ber.*, 127, 2051-2057.
- b) Polley, R., Linssen, T. G., Stihler, P., Hanack, M. (1997). *J. Porphyrins Phtalocyanines, 1*, 169-179.
- c) Kobayashi, N., Ashida, T., Osa, T. (1992). *Chem. Lett.*, 2031.
- ¹¹⁹ a) Ando, M., Mori, M. (1988). 56th Annual Meeting, Chemical Society Of Japan, Tokyo, Abstr. 3VA01.
- b) Ando, M., Mori, M. (1990). *Chem. Abstr.*, 113, 25558c.
- c) Kobayashi, N., Rondo, T., Nakajima, S.-I., Osa, T. (1990). *J. Am. Chem. Soc.*, 112, 9640 – 9641.
- ¹²⁰ a) Sastre, A., del Rey, B., Torres, T. (1996). *J. Org. Chem.*, 61, 8591-8597.
- b) Kudrevich, S. V., Gilbert, S., van Lier, J. E. (1996). *J. Org. Chem.*, 61, 5706-5707.
- ¹²¹ a) Weitemeyer, A., Kliesch, H., Wöhrle, D. (1996). *J. Org. Chem.*, 60, 4900-4904.
- b) Sastre, A., del Rey, B., Torres, T. (1996). *J. Org. Chem.*, 61, 8591-8597.
- c) Kauga, K., Idehara, T., Handa, M., Isa, K. (1992). *Inorg. Chim. Acta*, 196, 127-128.
- ¹²² a) Leznoff, C. C., Hall, T. W. (1982). *Tetrahedron Lett.*, 23, 30232-3026.
- b) Hall, T. W., Greenberg, S., McArthur, C. R., Khouw, B., Leznoff, C. C. (1982). *Neuv. J. Chim.*, 6, 653-658.
- ¹²³ Hirth, A., Sobbi, A. K., Wöhrle, D. (1997). *J. Porphyrins Phtalocyanines, 1*, 275-279.
- ¹²⁴ Young, J., Onyebuagu, W. (1990). *J. Org. Chem.*, 55, 2155-2159.
- ¹²⁵ Dabak, S., Bekaroglu, O. (1997) *New J. Chem.*, 21, 267-271.
- ¹²⁶ Leznoff C. C., Greenberg S. et al. (1987). *Can. J. Chem.*, 65, 1705-1713.
- ¹²⁷ Nolan, K. J. M., Hu, M., Leznoff, C. C. (1997). *Synlett*, 593-594.
- ¹²⁸ Kobayashi, N. (1998). *Chem. Commun.*, 487-488.