UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

KATEDRA FARMACEUTICKÉ CHEMIE A KONTROLY LÉČIV

Diplomová práce

Příprava prekurzorů využitelných k syntéze tetra(2,3-chinoxalino)porfyrazinů

2011 Hradec Králové Dominika Severinová

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

Podpis:

Poděkování:

Velice ráda bych poděkovala svému školiteli doc. PharmDr. Petru Zimčíkovi, Ph.D., že mi umožnil pracovat na mé práci v příjemném a přátelském kolektivu. Dále bych mu také ráda poděkovala za odborné rady a za jeho trpělivost. Za odbornou pomoc bych také ráda poděkovala Mgr. Veronice Novákové. Vřele také děkuji celému kolektivu za ochotu a za příjemnou atmosféru.

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv

Diplomová práce: **Příprava prekurzorů využitelných k syntéze tetra(2,3-chinoxalino)porfyrazinů**

ABSTRAKT

Léčebný efekt fotodynamické terapie je výsledkem tří složek – fotosenzitizéru, kyslíku a světelného záření. Fotosenzitizér musí být aktivován světlem, různé fotosenzitizéry jsou aktivovány při různých vlnových délkách. Azaftalocyaniny absorbují při vyšších délkách, jejich příprava probíhá cyklizací různě substituovaných chinoxalin-2,3-dikarbonitrilů. Příprava 6,7-bis(*terc*-butylthio)chinoxalin-2,3-dikarbonitrilu sestává z pěti kroků. V prvním kroku dochází k inverzi polarity, tzv. „umpolung“, 2*H*-benzimidazolu (připraví se kondenzací *ortho*-fenylendiaminu s cyklohexanonem), díky kterému může dojít k adici nukleofilu na aromatické jádro. Ve druhém kroku dochází k adici 1,1-dimethylethanthiolátu sodného na 2*H*-benzimidazol-2-spirocyklohexan a vzniku směsi čtyř produktů. Pro syntézu 6,7-bis(*terc*-butylthio)chinoxalin-2,3-dikarbonitrilu je důležitý pouze produkt 5,6-bis(*terc*-butylthio)-2*H*-benzimidazol-2-spirocyklohexan. V práci jsem se věnovala optimalizaci této reakce ve prospěch vyššího výtěžku tohoto produktu v reakční směsi a následným pokusům o syntézu 6,7-bis(*terc*-butylthio)chinoxalin-2,3-dikarbonitrilu.

Dominika Severinová

Hradec Králové

2011

CHARLES UNIVERSITY IN PRAGUE

FACULTY OF PHARMACY IN HRADEC KRÁLOVÉ

Department of Pharmaceutical Chemistry and Drug Control

Diploma thesis: **Synthesis of precursors for tetra(2,3-quinoxalino)porphyrazines**

ABSTRACT

The curative effect of photodynamic therapy is a result of three elements – photosensitiser, oxygen and light. Photosensitiser must be activated by light, different photosensitisers are activated at various wavelengths. Azaphthalocyanines absorb at longer wavelengths. Some of them can be prepared by cyclotetramerization of substituted quinoxaline-2,3-dicarbonitrils. Preparation of 6,7-bis(*tert*-butylthio)quinoxaline-2,3-dicarbonitril consists of five steps. In the first step, polarity of 2*H*-bezimidazole is inverted (prepared by condensation of *ortho*-phenylenediamine with spirocyclohexanone), by process of "umpolung". As a consequence, it is possible to add nucleophile on aromatic ring. In the second step, sodium-1,1-dimethylethanthiolate reacts with 2*H*-benzimidazole-2-spirocyclohexane and the mixture of four products arises. Only 5,6-bis(*tert*-butylthio)-2*H*-benzimidazole-2-spirocyclohexane is important for synthesis 6,7-bis(*tert*-butylthio)quinoxaline-2,3-dicarbonitril. I focused in my work on optimisation of this reaction to obtain higher yields of this product. Attempts to synthesize of 6,7-bis(*tert*-butylthio)quinoxaline -2,3-dicarbonitril were also performed.

Dominika Severinová

Hradec Králové

2011

Obsah

1. SEZNAM ZKRATEK 8

2. CÍL PRÁCE 9

3. ÚVODNÍ ČÁST 10

3.1 Úvod do fotodynamické terapie 10

3.2 Historie fotodynamické terapie 10

3.3 Faktory důležité pro fotodynamickou terapii 11

3.3.1 Světelné zdroje 11

3.3.2 Reakce fotosenzitizéru se světlem 11

3.3.3 Fotochemie 13

3.3.4 Fotosenzitizéry 14

3.4 Účinky fotodynamické terapie na organismus 20

3.4.1 Subcelulární lokalizace 20

3.4.2 Protinádorový efekt 21

4. METODOLOGICKÁ ČÁST 23

4.1 Přeměna *ortho*-fenylendiaminu na 2*H*-benzimidazol-2-spirocyklohexan 23

4.2 2*H*-benzimidazol-2-spirocyclohexan 24

4.2.1 reakce s dusíkatými nukleofily 24

4.2.2 reakce s kyslíkatými nukeofily 25

4.2.3 reakce se sirnými nukleofily 26

4.2.4 reakce s uhlíkatými nukleofily 27

4.2.5 reakce s anorganickými solemi 29

4.3 Konverze substituovaných 2*H*-benzimidazol-2-spirocyklohexanů na substituované *ortho*-fenylendiaminy 29

5. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST 31

5.1 Schéma prováděných reakcí 32

5.2 Příprava 1,3-dihydro-2*H*-benzimidazol-2-spirocyklohexanu 33

5.3 Příprava 2*H*-benzimidazol-2-spirocyklohexanu.....33

5.4 Reakce 2*H*-benzimidazol-2-spirocyklohexanu s 1,1-dimethylethanthiolátem sodným.....34

5.5 Optimalizovaná příprava 5,6-bis(*terc*-butylthio)-2*H*-benzimidazol-2-spirocyklohexanu.....36

5.6 Příprava 4,5-bis(*terc*-butylthio)benzen-1,2-diaminu.....36

5.7 Příprava 6,7-bis(*terc*-butylthio)chinoxalin-2,3-dikarbonitrilu.....37

6. DISKUZE.....37

7. ZÁVĚR.....42

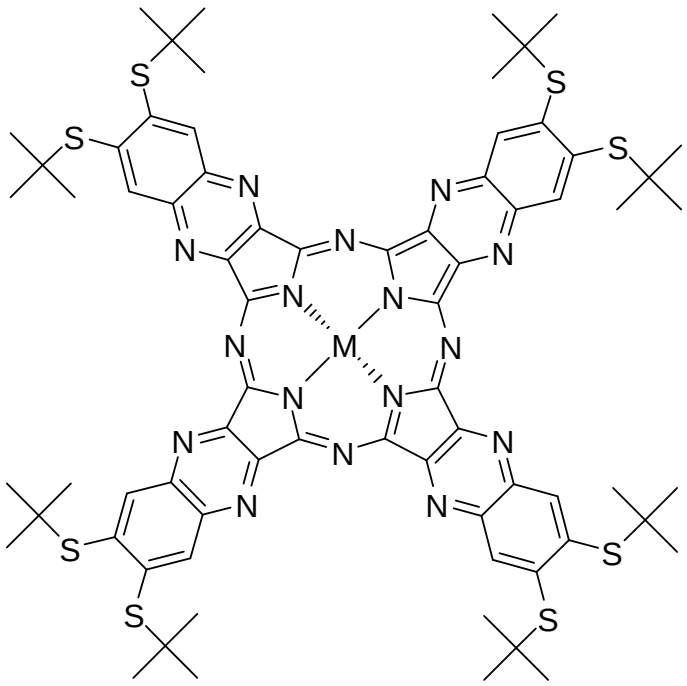
8. LITERATURA.....43

1. SEZNAM ZKRATEK

PDT	fotodynamická terapie
PS	fotosenzitizér
HPD	derivát hematoporfyrinu
ROS	reaktivní kyslíkaté částice
LDL	lipoprotein s nízkou hustotou
ALA	kyselina 5-aminolevulová
PpIX	protoporfyrin IX
o-FDA	*ortho*-fenylendiamin
TLC	tenkovrstvá chromatografie
NMR	nukleární magnetická rezonance
o-FDA	*ortho*-fenylendiamin
TFA	trifluoroctová kyselina

2. CÍL PRÁCE

Laboratoř, v které jsem pracovala na svojí diplomové práci, se již dlouho dobu specializuje na výzkum a přípravu látek vhodných k fotodynamické terapii. Momentálně se zde výzkum zaměřuje na přípravu azaftalocyaninů s rozšířeným systémem konjugovaných vazeb. Tyto azaftalocyaniny mají vyšší vlnovou délku absorpce, což je pro fotodynamickou terapii velice výhodné, látka tak může být použita pro léčbu poškozených tkání ležících poměrně hluboko. Takto rozšířené azaftalocyaniny mohou být připraveny například cyklizací prekurzorů obsahujících chinoxalinová jádra. Cyklizace vychází ze substituovaných chinoxalin-2,3-dikarbonitrilů. Mojí prací bylo připravit derivát tohoto typu, přesněji 6,7-bis(*terc*-butylthio)chinoxalin-2,3-dikarbonitril, který by poté mohl být použit k přípravě příslušného azaftalocyaninu (viz. Obr. 1).



Obr. 1: Azaftalocyanin

3. ÚVODNÍ ČÁST

3.1 Úvod do fotodynamické terapie

Fotodynamická terapie (PDT) je léčebná metoda využívaná pro léčbu nádorových i nenádorových onemocnění. V poslední době byla zjištěna také účinnost PDT proti různým mikrobiálním infekcím.

PDT spočívá v podání fotosenzitizující látky, která je vystavena světelnému záření. Energie záření je zachycena fotosenzitizérem (PS), přenesena na jiné molekuly, což má za následek vznik krátkodobě žijících energeticky bohatých látek, které interagují s biologickým systémem a způsobují tkáňové poškození[1].

3.2 Historie fotodynamické terapie

Od počátku našeho vesmíru slunce zásobovalo naší planetu energií, která umožnila život a jeho evoluci na Zemi.

Již od pradávna bylo využíváno světlo také pro své léčebné účinky. Staří Egypťané, Číňané a Indové využívali terapeutické účinky slunce k léčení různých chorob[2]. Staří Egypťané používali orální podání *Amni majus* (Morač větší) v kombinaci se slunečním zářením pro léčbu vitiliga, Řekové a Indové semena *Psoralea corylifolia*[3].

Od těchto starých dob už se v historii zmínky o použití světla v kombinaci s nějakou orálně podanou látkou neobjevují až do počátku 20. století, kdy Oscar Raab popsal letální působení světla na prvoky rodu *Infusoria*, kteří byli vystaveni působení akridinového barviva[4]. V následujících experimentech poukázal, že tento efekt byl větší než při použití samotného akridinu, samotného světla či akridinu vystaveného záření a až poté aplikovanému na prvoky. V roce 1904 von Tappeiner a Jodlbauer objevili, že nedílnou součástí fotosenzitizačních reakcí je kyslík, v roce 1907 zavedli do praxe pojem „fotodynamická akce“[2].

Prvním použitým PS byl derivát hematoporfyrinu (HPD), který byl poprvé vyroben Schrerem v roce 1841. Kolem roku 1910 Hausmann popsal fotodynamickou reakci s HPD[1].

První úspěšné použití PDT na nádorové buňky poprvé popsal Dougherty v roce 1975. Podařilo se mu eradikovat transplantované zvířecí nádory použitím HPD a červeného světla, aniž by došlo k rozsáhlému poškození obklopující kůže[4].

3.3 Faktory důležité pro fotodynamickou terapii

PDT se skládá ze tří základních komponent: PS, světlo a kyslík. Ani jedna z těchto látek není pro organismus samostatně škodlivá, ale dohromady zahajují fotodynamickou reakci, která vrcholí vznikem vysoce reaktivního a toxického produktu nazývaného singletový kyslík[5].

3.3.1 Světelné zdroje

Výběr světelného zdroje primárně závisí na typu tkáně a hloubky, kterou musí světlo dosáhnout[2]. Ideální rozmezí vlnové délky je ve vyšších oblastech viditelného spektra a v infračervené oblasti, tzn. 600 až 1200 nm. V infračervené oblasti už není ovšem energie světla natolik silná, aby mohla vygenerovat singletový kyslík $^1O_2$ a tím zahájit fotodynamickou reakci[5].

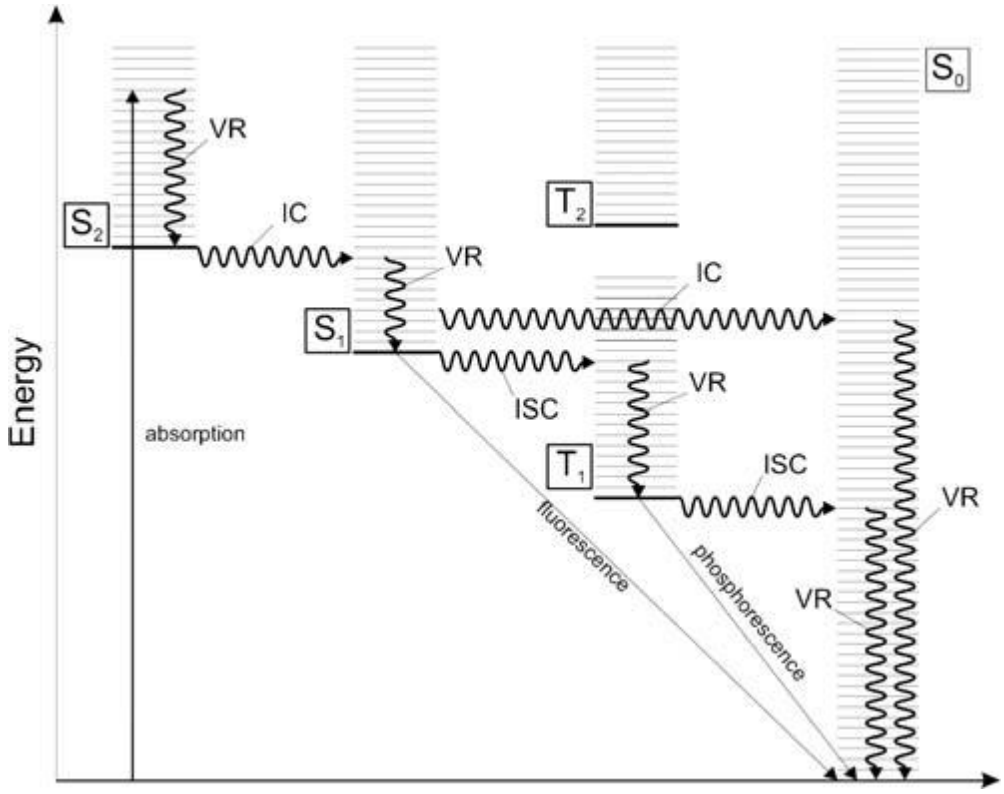
V PDT je možné používat jako zdroje světla lasery, které poskytují koherentní záření, i zdroje nelaserového typu čili zdroje nekoherentního záření. Dříve se používaly lasery typu - argonového laseru nebo laseru využívajícího páry zlata, jejichž nevýhodami byla cena, potřeba externího chlazení a drahá údržba. Dnes jsou tyto lasery nahrazeny polovodičovými diodovými lasery, které jsou levnější, menší, relativně mobilní, nepotřebují externí chlazení a jsou velice spolehlivé. Ze zdrojů nekoherentního záření se používají halogenové či xenonové lampy a LED diody. Zdroje nekoherentního záření nacházejí uplatnění hlavně v dermatologii, díky velkým plochám, které jsou ozářeny. Dalšími výhodami jsou nízká cena, snadná dostupnost a možnost použití různých PS s různými hodnotami absorpčního maxima[3].

3.3.2 Reakce fotosenzitizéru se světlem

Molekula PS ve svém základním (singletovém) stavu S_0 má 2 elektrony s opačným spinem, které leží v energeticky nejnižším molekulovém orbitalu. Absorpce světla vede

k přechodu jednoho z těchto elektronů (spin se nemění) do energeticky vyššího orbitalu (excitovaný singletový stav)[6]. Přechod do energeticky vyššího excitovaného singletového stavu S_x (x=1,2,3…) je závislý na přijaté energii[7]. Molekula PS v excitovaném stavu je energeticky nevýhodná a po krátké době (nanosekundy) dochází k návratu molekuly PS do základního stavu S_0. Při návratu do základního stavu se energie uvolňuje ve formě tepla nebo je emitována jako světlo fluorescencí[6].

Ze stavu S_1 může molekula přejít do tripletového stavu T_1, který je s S_1 energeticky stejně výhodný, ale elektrony zde zůstávají delší dobu (až sekundy) než se navracejí do základního stavu. Tomuto přechodu se říká mezisystémová výměna. Molekula PS má v tripletovém stavu dva nepárové elektrony, které mají ovšem stejný spin, čímž se vysvětluje i relativně dlouhá životnost molekuly PS v tripletovém stavu. Ke ztrátě energie dochází mj. emisí světla (fosforescencí), při které dochází k spinem zakázanému přechodu[6,7] (viz. Obr. 2).



Obr. 2: Jablonského diagram.

Převzato z: PLAETZER, K.; KRAMMER, B.; BERLANDA, J.; et al. Photophysics and photochemistry of photodynamic therapy: fundamental aspects. *Lasers Med. Sci.* 2009, 24, p. 259-268.

3.3.3 Fotochemie

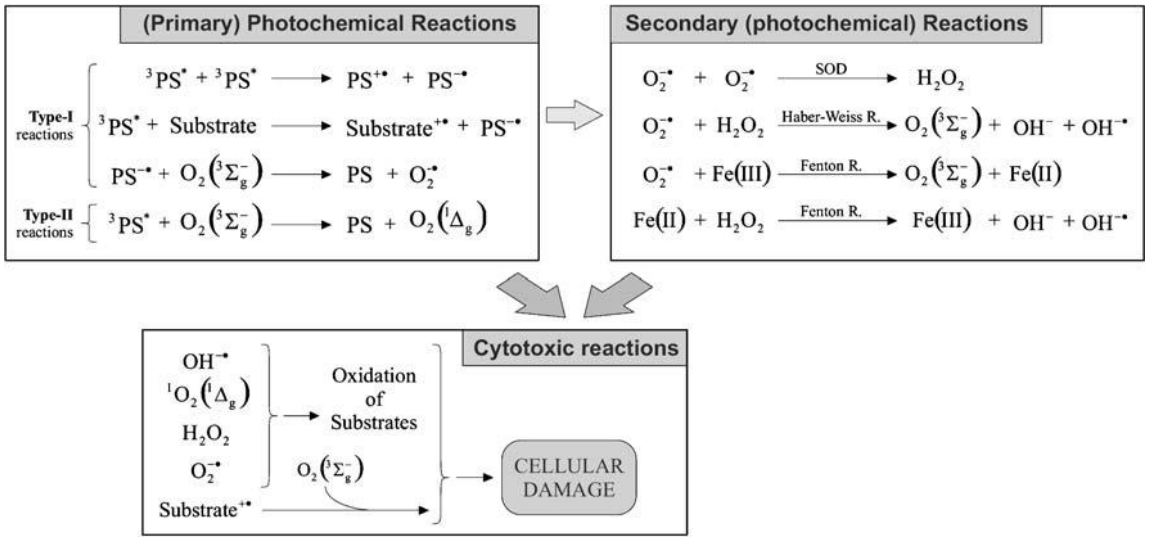
PS v tripletovém stavu zahajuje fotochemickou reakci přenosem energie na ostatní molekuly dvěmi různými reakcemi – fotochemická reakce typu I či typu II[8] (viz. Obr. 3).

Při reakci typu I reaguje molekula PS přímo se substrátem, s buněčnou membránou, kyslíkem nebo s přilehlými molekulami rozpouštědla, přičemž dochází k přenosu protonu či elektronu za vzniku radikálu. Tyto radikály reagují s molekulárním kyslíkem za vzniku reaktivních kyslíkatých částic ROS (reactive oxygen species)[7]. Následující autooxidace PS vede k vytvoření superoxidového aniontového radikálu $O^{2-\cdot}$. Superoxidový anion není moc reaktivní v biologických systémech a nezpůsobuje velké oxidativní poškození, ale může reagovat s další molekulou $O^{2-\cdot}$ za vzniku peroxidu vodíku. Tato reakce se nazývá dismutace a je katalyzována enzymem superoxid-dismutasou. Peroxid vodíku je pro organismus důležitý, snadno může přecházet přes buněčné membrány, tudíž poškození peroxidem vodíku není omezené pouze na jeden buněčný kompartment. H_2O_2 je tedy velice významný v produkci buněčného poškození. Dále je nezbytný pro funkci mnoha enzymů. Ve vyšších koncentracích může peroxid vodíku reagovat se superoxidovým aniontem. Reakce je známá také jako Haber-Weissova reakce a jejím produktem je vysoce reaktivní hydroxylový radikál. Další možností vzniku hydroxylového radikálu je Fentonova reakce, která probíhá v přítomnosti kovových iontů jako katalyzátoru, nejčastěji se jedná o železo či měď. Superoxidový anion může také reagovat s hydroxylovým radikálem za vzniku singletového kyslíku[6].

Hydroxylový radikál může zaútočit a oxidovat jakoukoli molekulu v buňce. Díky svému redoxnímu potenciálu (E_0=1,35 V) nepotřebuje příliš velkou energii k zahájení těchto reakcí. Může též snadno difundovat přes membrány, tudíž poškození není omezeno jen na jeden buněčný kompartment[7].

V reakci typu II reaguje PS v tripletovém stavu přímo s molekulou kyslíku, který je v základním tripletovém stavu. Přenosem energie na O_2 vzniká excitovaná forma kyslíku zvaná singletový kyslík $^1O_2$[9].

Hydroxylový radikál i singletový kyslík jsou velice reaktivní a krátce žijící molekuly, tudíž jimi způsobené poškození se týká pouze molekul či jiných struktur, v blízkosti nichž tyto látky vznikají[6].



Obr. 3: Přehled fotochemických reakcí probíhající během PDT.

Převzato z: PLAETZER, K.; KRAMMER, B.; BERLANDA, J.; et al. Photophysics and photochemistry of photodynamic therapy: fundamental aspects. *Lasers Med. Sci.* 2009, 24, p. 259-268.

Oba typy reakcí probíhají současně. Poměr mezi těmito reakcemi závisí na povaze použitého PS, substrátu a na koncentraci kyslíku. Za vlastní fotodynamický účinek je odpovědný převážně singletový kyslík, který vzniká při reakci typu II[10].

3.3.4 Fotosenzitizéry

Většina PS má základ v tetrapyrrolové struktuře. Tato struktura může být různě obměněna, ať již navázáním různých substituentů do bočních řetězců či vynecháním/přidáním dvojných vazeb.

3.3.4.1 Vlastnosti ideálního fotosenzitizéru[5,11]*:*

chemická čistota

nízká výrobní cena

dobrá stabilita během skladování

maximální absorpce mezi 600-800 nm

minimální toxicita a rychlá exkrece

rychlé ukládání do místa poškození pro krátký interval mezi podáním látky a ozářením

minimální toxicita ve tmě

zvýšená kumulace v nádorové tkáni oproti tkáni zdravé

kvalitní fotochemické vlastnosti

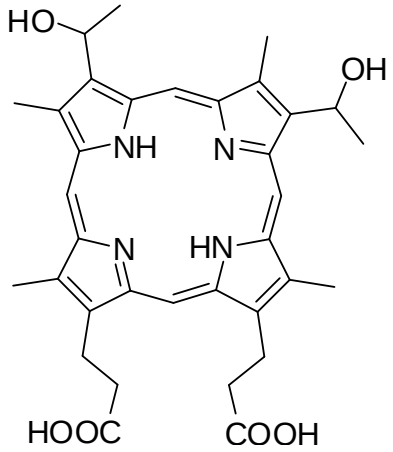
Při ozařování dochází často k chemické modifikaci či degradaci molekuly PS. Degradace molekuly PS světlem je známa jako „photobleaching“ neboli vyblednutí. Může se jednat o fotoadici, fotocyklizaci, ireverzibilní fotoredukci či nejčastěji oxidaci. Při fotomodifikaci dochází k modifikaci bočních řetězců a/nebo molekulární kostry PS a v důsledku ke ztrátě fluorescence či absorpce při určité vlnové délce. Při fotodegradaci dochází k chemické destrukci molekuly PS a jejímu rozpadnutí na malé fragmenty. Tyto malé fragmenty už nemají schopnost absorpce ve viditelné oblasti světla. PS tedy ztrácí svou schopnost pro PDT a nevykazuje již žádné cytotoxické účinky[7,11]. Dříve byl photobleaching považován za nežádoucí účinek, ale některé zdroje míní, že díky tomu, že se molekula PS rozkládá již během ozařování, je snadnější, aby u pacientů nedocházelo k předávkování[5]. Při ozařování může také docházet k fotorelokalizaci, při níž molekula PS mění svojí intracelulární polohu. Dochází k tomu hlavně při nízkých či při opakovaných ozařováních, kde může první ozáření způsobit změnu polohy PS v buňce[7].

Jednou z požadovaných vlastností PS je zvýšená kumulace v nádorové oproti zdravé tkáni, kterou většina PS má. Je známo několik mechanismů, proč nádory vychytávají PS s vyšší selektivitou než zdravé buňky, ale kompletní princip zůstává stále neznámý[4]. Jedním z mechanismů je schopnost PS vázat se na lipoproteiny, zvláště na lipoproteiny s nízkou hustotou (LDL). Nádorové buňky obsahují více LDL receptorů než buňky zdravé, tudíž může docházet k větší koncentraci PS uvnitř nádorových buněk. Další možností je nižší extracelulární pH nádorových buněk, které zvyšuje difúzní poměr ve prospěch PS. Hyperpermeabilní cévní systém a chudý lymfatický systém, které jsou typické pro nádorové buňky, jsou určitou měrou také odpovědné za zvýšenou kumulaci PS v nádorové tkáni[1].

3.3.4.2 Typy fotosenzitizérů

Doposud známé PS je možné rozdělit do tří generací. První generace je tvořena derivátem hematoporfyrinu. HPD je směs produktů z hematoporfyrinu (viz. Obr. 4), který je nejprve izolován z hemu. V roce 1984 vědci z Roswell Park Cancer Institute separovali účinnou část HPD, kterou nazvali Photofrin®. Poprvé byl Photofrin® schválen v roce 1993

v Kanadě, když byl použit k léčbě rakoviny močového měchýře jako úplně první látka v PDT. Později byl Photofrin® schválen ve většině rozvinutých zemí světa k léčbě prekancerózních stavů jako je např. Barrettův jícen a i k léčbě různých typů rakoviny např. karcinomu jícnu, žaludku či močového měchýře. Photofrin® je vůbec nejpoužívanějším PS i přes své četné nežádoucí vlastnosti. Photofrin® je směs různých látek a je velice těžké ho vyčistit a znát jeho přesné složení, tudíž je velice těžké odhadnout přesný léčebný efekt. Další nevýhodou je nízká vlnová délka 630 nm nutná pro aktivaci Photofrinu®, a tudíž světlo nemůže pronikat příliš hluboko. A v neposlední řadě dochází ke kumulaci Photofrinu® v kůži, což způsobuje dlouhodobou fototoxicitu. Může přetrvávat až 6 týdnů, což znamená pro pacienty často nepříjemně dlouhodobé vyvarování se přímému světlu[1,11].

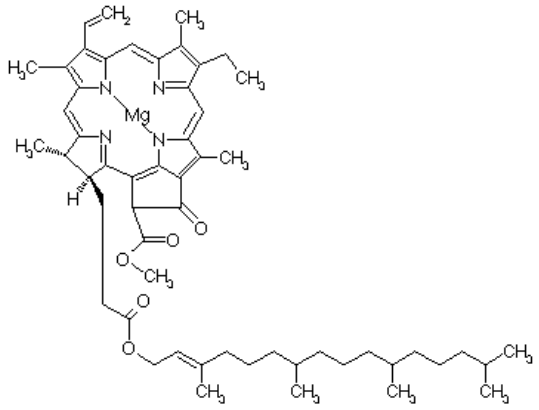


Obr. 4: Hematoporfyrin

Druhá generace PS je charakteristická jednotným složením PS, u většiny PS je také vyšší hodnota vlnové délky maxima absorpce než u Photofrinu®. Chemicky se jedná o makrocyklické sloučeniny ze skupin porfyrinů, ftalocyaninů a dalších. Výjimkou je kyselina 5-aminolevulová, která je alifatická a působí jako prekurzor protoporfyrinu IX[1,11].

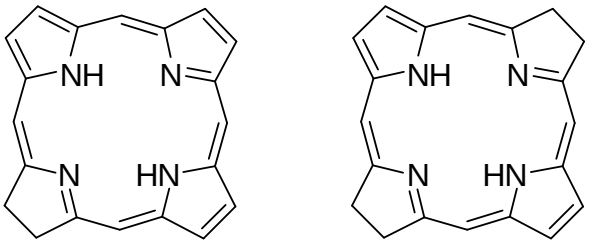
Porfyrinům jsou velice podobné deriváty chlorofylu – chloriny a bakteriochloriny. Chlorofyl (viz. Obr. 5) vykazuje vysokou absorpci v červené oblasti světelného spektra, čímž překonává jednu z negativních vlastností Photofrinu® a je tedy možné ho aktivovat světlem, které proniká hlouběji do tkání. Jelikož je ale nestálý a tedy snadno znehodnotitelný, používají se v PDT jeho deriváty – chloriny a bakteriochloriny (viz. Obr. 6). Jedním za zástupců je temoporfin (tetra(*meta*-hydroxyfenyl)chlorin) (viz. Obr. 7), *m*THPC, znám pod komerčním názvem Foscan®. Temoporfin je jedním z nejúčinnějších senzitizérů, u kterého je možné podávat menší dávky a dostačující je i kratší doba ozáření[1]. Od roku 2001 je Foscan® v EU, Norsku a na Islandu používán k léčbě rakoviny hlavy a

krku rezistentním k jiným terapiím. Jsou také připravovány klinické zkoušky Foscanu® u různých druhů rakoviny či jeho účinnosti proti bakteriím rezistentním na antibiotickou léčbu[11].

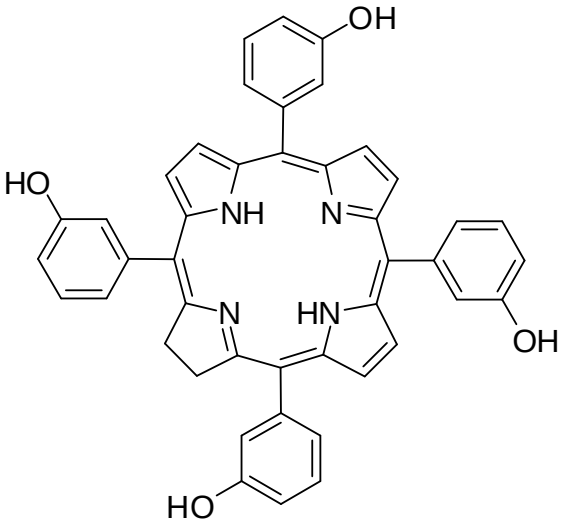


Obr. 5: Chlorofyl A

Převzato z: www.sinicearasy.cz /pokr/Chlorophyta

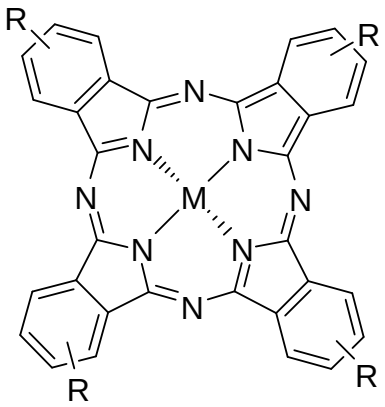


Obr. 6: Chlorin, bakteriochlorin

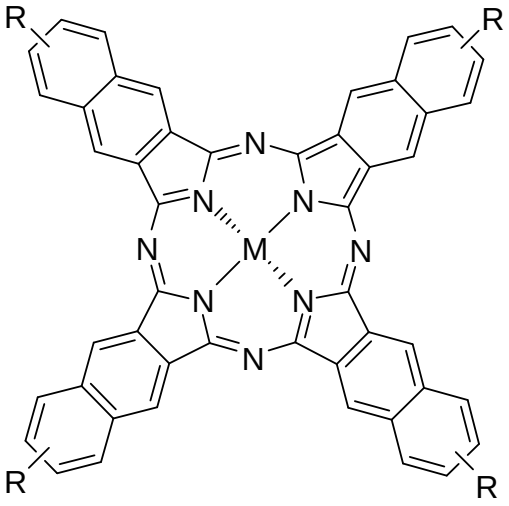


Obr. 7: Temoporfin

Další skupinou fotosenzitizérů jsou ftalocyaniny (viz. Obr. 8). Jejich struktura je podobná porfyrinům, namísto čtyř pyrrolových kruhů vázaných methinovými můstky jsou zde čtyři isoindoly vázané přes atom dusíku. Ftalocyaniny mají již zlepšené fotofyzikální a fotochemické vlastnosti a jsou to tedy sloučeniny velice nadějné pro využití v PDT. Jejich maximum absorpce se pohybuje mezi 650-700 nm, mohou tedy působit hlouběji než Photofrin®[1]. Pro vlastní PDT účinek je třeba přítomnosti chelatovaných kovů či polokovů v makrocyklu. Některé (např. Zn, Al, Si) dokonce prodlužují trvání tripletového stavu PS, čímž zvyšují jeho účinnost[11]. Další výhodou je snížená fototoxicita, která byla prokázána Bownem a spol. v roce 1986 u sulfonovaného hlinitého ftalocyaninu. Pro PDT jsou nejvýhodnější amfifilní ftalocyaniny, které obsahují hydrofilní i lipofilní skupiny. Amfifilní charakter zvyšuje jejich penetrační schopnost[1]. Připojením dalšího benzenového jádra na periferii ftalocyaninů vznikají naftalocyaniny (viz. Obr. 9), které absorbují při ještě vyšších vlnových délkách. Jejich maximum absorpce může být až při 770 nm[11].

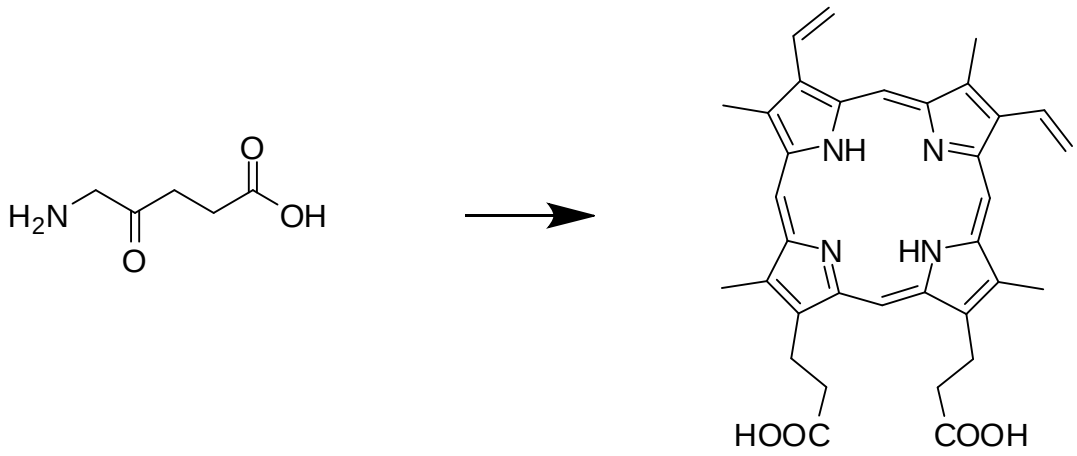


Obr. 8: Ftalocyanin



Obr. 9: Naftalocyanin

Kyselina 5-aminolevulová (ALA), s komerčním názvem Levulan®, je dalším PS druhé generace. ALA není schopna produkovat fotodynamický efekt, ale působí jako prekurzor protoporfyrinu IX (PpIX) (viz. Obr. 10), který je již vlastním PS. PpIX i ALA jsou lidskému organismu vlastní, oba jsou meziprodukty při tvorbě hemu. Při zvýšené koncentraci hemu dochází k negativní zpětné vazbě, která inhibuje konverzi glycinu a sukcinylkoenzymu A na ALA. Exogenním podáním ALA je možné tento kontrolní mechanismus obejít a z ALA se může tvořit PpIX, který je posledním meziproduktem před tvorbou hemu, který je na rozdíl od PpIX fotodynamicky neaktivní[1,11]. V nádorové tkáni je zvýšená koncentrace porfobilinogendeaminasy (enzym zodpovědný za syntézu PpIX) a snížená aktivita ferrochelatasy (enzym, který inkorporuje atom železa do PpIX), což způsobuje zvýšenou kumulaci PpIX v nádorové oproti zdravé tkáni. ALA způsobuje o hodně kratší fotosenzitivitu než Photofrin®, zvýšená kožní přecitlivělost mizí již po dvou dnech[1]. Nevýhodou ALA je její nízká lipofilita a tudíž snížená schopnost pronikat do buněk. Zvýšení lipofility je dosaženo vytvořením jejích esterů, které lépe pronikají do tkání a po hydrolýze uvolňují ALA. V praxi je zavedeno již několik přípravků obsahujících estery ALA. Metvix® je methyl ester kyseliny 5-aminolevulové a od roku 2001 je používán k léčbě aktinické keratózy. Hexvix® je hexyl ester kyseliny 5-aminolevulové, který se používá pro fotodetekci rakoviny močového měchýře. Připravují se klinické zkoušky pro fotodetekci a léčbu rakoviny jícnu preparátem Benzvix®, což je benzyl ester kyseliny 5-aminolevulové[11].



Obr. 10: Konverze ALA na PpIX

Do třetí generace řadíme PS druhé generace, které jsou spjaté s biomolekulami a je jim tak umožněna cílenější distribuce v těle[11]. Bylo prokázáno, že přidání biomolekuly k PS zvyšuje jeho účinnost a snižuje jeho toxicitu. Použitím např. monoklonální protilátky a PS je dosaženo vyšší selektivity vůči nádoru[1].

3.4 Účinky fotodynamické terapie na organismus

Stupeň poškození způsobený PDT závisí na koncentraci PS, ozařovacích podmínkách a dostupnosti kyslíku. Bylo zjištěno, že světelná energie předaná do hlouběji uložených orgánů je mnohem nižší, než kdyby byla absorbována svrchnějšími vrstvami, což je způsobeno limitovanou propustností tkáně pro záření ve viditelné oblasti. Tato snížená propustnost hlubších tkání může být jedním z faktorů, které způsobují recidivu nádoru. Léčba a oxidativní stres způsobený PDT mohou být též ovlivněny distribucí kyslíku v tkáni. Při podání subletálních dávek je spuštěna stresová odpověď organizmu, která zahrnuje indukci mnoha enzymů (např. enzymů ničících ROS, enzymy, které opravují škody) a anti-apoptotických faktorů, které v důsledku vedou k buněčnému přežití a rostoucí rezistenci na PDT. Oproti tomu PDT ve vysokých dávkách spouští oxidativní stres, který narušuje makromolekuly, intra- i intercelulární signální kaskády a buněčné organely vedoucí k buněčné smrti[12].

3.4.1 Subcelulární lokalizace

Subcelulární uložení PS v buňce je velice důležité, protože nám udává lokalizaci primárního poškození[13]. V kultivačních podmínkách bylo zjištěno, že různé typy PS se mohou nacházet v mnoha buněčných organelách, např. mitochondrie, Golgiho aparát, endoplasmatické retikulum, lyzozómy, plasmatické membrány. Umístění PS v buňce ovlivňují jeho fyzikálně-chemické vlastnosti – náboj, hydrofobní vlastnosti, stupeň asymetrie v molekule. Náboj PS se může pohybovat od -4 (anionický PS) do +4 (kationický PS), stupeň hydrofobicity je vyjádřen logaritmem rozdělovacího koeficientu oktanol/voda. Hydrofobní PS, které mají dva či méně záporných nábojů mohou difundovat přes plasmatickou membránu a poté se přemístit do ostatních nitrobuněčných membrán. Tyto PS mívají nejlepší uptake v buňkách in vitro. Méně hydrofobní PS, které mají více

jak dva negativní náboje nemohou procházet přes plasmatickou membránu difúzí, neboť jsou příliš polární. Tyto PS se do buněk dostávají endocytózou[6,9].

Vychytávání PS nádorovými buňkami je rozhodující pro efektivitu PDT, protože ROS a singletový kyslík mají velmi krátkou životnost a reagují pouze se strukturami v blízkosti jejich vzniku[9].

3.4.2 Protinádorový efekt

Protinádorový efekt PDT je výsledkem tří vzájemně propojených mechanismů: přímý cytotoxický efekt na nádorové buňky, cévní poškození nádoru a indukce zánětlivé reakce, která může vést až k vyvinutí systémové imunity[5].

3.4.2.1 Cytotoxický efekt fotodynamické terapie

Na molekulární úrovni je destrukce nádorových buněk pomocí PDT způsobena ireverzibilním poškozením subcelulárních struktur zahrnujících plasmatickou membránu a řadu intracelulárních membrán mitochondrií, lyzozómů, Golgiho aparátu a endoplasmatického retikula. Molekulární povaha fotooxidovaných cílů v buňce velmi ovlivňuje signální kaskády a způsob buněčné smrti, která následuje po PDT. Všeobecně PS, které jsou lokalizovány v mitochondriích či v endoplasmatickém retikulu, podněcují apoptózu, PS umístěné v plasmatické membráně či v lyzozómech zpožďují či blokují apoptózu a předurčují buňky k nekróze. Některé studie ukazují, že PDT může způsobovat i autofagický způsob smrti jako pokus napravit a přežít fotozranění klíčových organel, který může být odvrácen na signál buněčné smrti, když tyto počáteční odpovědi selžou[14].

Buněčná smrt následující po PDT je způsobena třemi hlavními morfologiemi programované buněčné smrti, což je geneticky zakódovaná forma sebevraždy, která nastane v předurčený čas a místě. Prvním typem programované buněčné smrti je apoptóza, která je nejlépe prostudovanou formou programované buněčné smrti. Apoptóza má nejrozsáhlejší fyziologickou, patologickou a terapeutickou roli. Chyby v regulaci či ukončení apoptózy způsobují nerovnováhu mezi buněčnou proliferací a buněčnou smrtí, což má za následek spouštění různých nemocí včetně rakoviny. Druhým typem je autofagie, neboli doslovně sebepozření, která je katabolickým procesem zahajovaným k vytvoření intracelulárních stavebních bloků skrze recyklaci cytoplasmatických komponent. V savčích buňkách může autofagie způsobovat buněčné přežití díky přemístění poničených organel, toxických metabolitů či intracelulárních patogenů. Autofagie může ovšem také způsobovat buněčnou smrt skrze nadměrné sebepozření a

degradaci buněčných komponent potřebných pro život buňky. Třetím typem je nekróza, která je charakterizovaná vakuolizací cytoplasmy, bobtnáním a zhroucením plasmatické membrány vyúsťující v zánětlivou reakci. Nekróza je považována za konečný výsledek bioenergetické katastrofy plynoucí z nedostatku ATP na úroveň neslučitelnou s buněčným přežitím. Nekróza byla dlouho považována za pasivní neprogramovanou cestu buněčné smrti, ale jsou známy signální cesty, u kterých dochází k transdukci signálu na úrovni receptorů, které signalizují, že nekróza také může být aktivní programovaná forma buněčné smrti[14].

3.4.2.2 Cévní poškození

Růst nádoru závisí na dostatečném zásobování kyslíkem a živinami, které jsou do tumoru přiváděny funkčním cévním systémem. Zničení existujícího cévního systému a zabránění vzniku nového krevního řečiště tudíž velice zvyšuje efektivitu PDT. Je již známo, že PDT způsobuje kolaps cévního systému, který vede k tkáňové hypoxii. Výsledek cévního poškození závisí na typu PS a intervalu mezi podáním PS a ozářením[15].

3.4.2.3 Indukce zánětlivé odpovědi

PDT vyvolává v organizmu akutní zánětlivou odpověď, ať už se jedná o zdravou či nádorovou tkáň. Indukce zánětlivé odpovědi je velice důležitá pro spuštění imunitní odpovědi[16].

Silná akutní zánětlivá odpověď se projevuje edémem v cíleném místě, který je důsledkem oxidativního stresu způsobeným PDT. Akutní zánětlivá odpověď je hlavně protektivním procesem, jejíž hlavní úlohou je zabránění narušení homeostázy organismu a odstranění poškozených buněk. Tyto mechanismy podporují místní uzdravení s obnovením normálních tkáňových funkcí[5].

4. METODOLOGICKÁ ČÁST

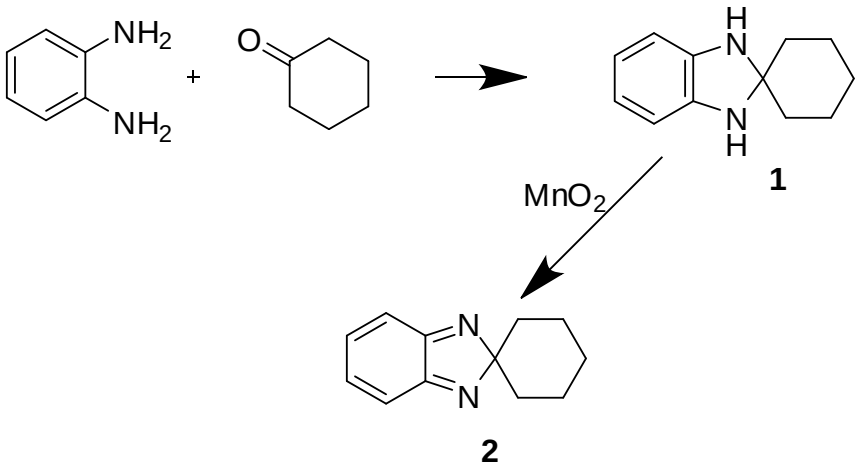
4.1 Přeměna *ortho*-fenylendiaminu na 2*H*-benzimidazol-2-spirocyklohexan

Důležitou částí mojí syntézy byla příprava nukleofilně substituovaného *ortho*-fenylendiaminu (*o*-FDA). *o*-FDA je látka aromatického charakteru, pro kterou je typickou reakcí elektrofilní substituce, tudíž nukleofilní substitucí na *o*-FDA není možné požadovaný produkt získat.

Pro získání nukleofilně substituovaného *o*-FDA, je nutné ho převést na látku, která bude schopna na sebe navázat nukleofil, např. na 2*H*-benzimidazol-2-spirocyklohexan **2**.

Přeměna *o*-FDA na 2*H*-benzimidazol-2-spirocyklohexan **2** má za následek inverzi polarity molekuly, tzv. „umpolung“, a tento heterocykl, reagující jako ekvivalent *o*-FDA, je schopný na sebe vázat nukleofily[17].

Přeměna *o*-FDA na 2*H*-benzimidazol-2-spirocyklohexan **2** zahrnuje dvoukrokovou syntézu (viz. Obr. 11). V prvním kroku dochází ke kondenzaci cyklohexanonu s *o*-FDA, kde vzniká meziprodukt 1,3-dihydro-2*H*-benzimidazol-2-spirocycklohexan **1**. Vytvoření tohoto produktu má za následek změnu hybridizace vazby[17] cyklického ketonu z sp^2 na sp^3. Ve druhém kroku, působením na látku **1** oxidem manganičitým vzniká 2*H*-benzimidazol-2-spirocyklohexan **2**[18].



Obr. 11: Přeměna *o*-FDA na 2*H*-benzimidazol-2-spirocyklohexan

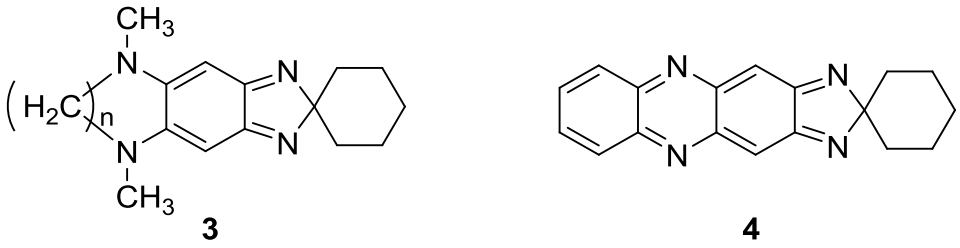
4.2 2*H*-benzimidazol-2-spirocyclohexan

2*H*-benzimidazol-2-spirocyklohexan **2** může být na jednu stranu považován za stabilní derivát vysoce nestabilního *o*-benzochinondiiminu, který ještě dosud nebyl izolován v čisté formě, na stranu druhou je to chráněný *o*-FDA. Tímto chráněním je navíc dosaženo „přepólování“ šestičlenného kruhu[18].

Inverze polarity umožňuje, že 2*H*-benzimidazol-2-spirocyklohexan **2** je přístupný 1,4-adici Michaelova typu nukleofilními činidly za vzniku 5-substituovaných produktů. Je možná reakce i do dalších poloh, např. 1,6-adice, přičemž záleží na elektronové povaze iniciálního substituentu[18].

4.2.1 reakce s dusíkatými nukleofily

Sekundární aminy reagují s 2*H*-benzimidazol-2-spirocyklohexanem **2** snadno v různých rozpouštědlech v rozumných výtěžcích za vzniku 5-mono a 5,6-disubstituovaných derivátů 2*H*-benzimidazol-2-spirocyklohexanu. Primární aminy reagují s nižšími výtěžky. Při reakci 2*H*-benzimidazol-2-spirocyklohexanu **2** s α,ω-diaminy vznikají produkty se třemi cykly **3**, při reakci s *o*-FDA jako nukleofilem je výsledným produktem fenazin **4** (viz. Obr. 12)[17,18].

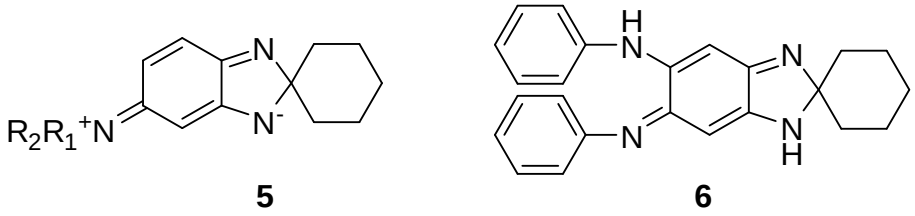


Obr. 12: Struktury látek 3,4

Do reakcí je třeba přidávat oxid manganičitý, aby byla zajištěna finální oxidace produktu[18].

5-monosubstituované deriváty (**5**) jsou červené či temně oranžové ($\lambda_{max.}$ = 480 nm), kdežto 5,6-disubstituované deriváty jsou žluté ($\lambda_{max.}$ = 380nm)[17]. Tyto barevné rozdíly mezi mono- a disubstituovanými deriváty jsou velmi užitečné při jejich identifikaci během chromatografického čištění. U 5-monosubstituovaných derivátů je jejich zabarvení

vysvětlováno jejich *p*-chinonovou rezonanční strukturou (viz. Obr. 13), u 5,6-disubstituovaných derivátů většinou není možná rezonanční struktura, která by byla koplanární s 6-členým kruhem díky sterickému bránění substituentů. Přesto lze uvést i 5,6-disubstituovaný derivát, který se vyskytuje v tautomerní *p*-chinonové formě, který je díky této formě temně červený. Ve sloučenině, 5,6-dianilino-2*H*-benzimidazol-2-spirocyklohexanu **6**, rotace okolo vazby C-N druhého anilinového substituentu umožňuje osvobození od sterického bránění (viz. Obr. 13)[18].

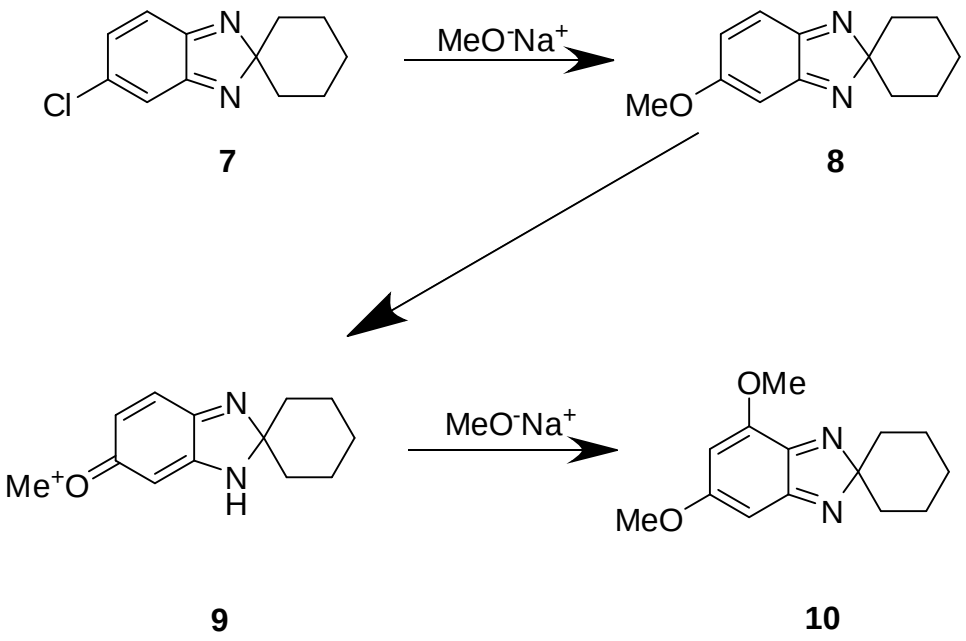


5 **6**

Obr. 13: Struktury látek 5,6

4.2.2 reakce s kyslíkatými nukeofily

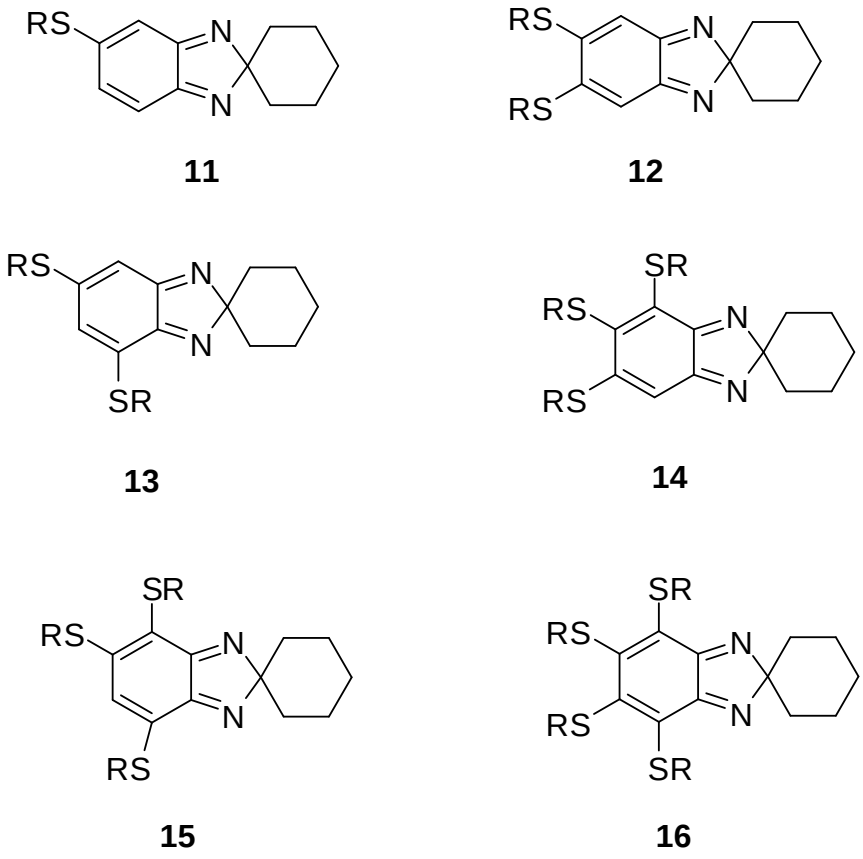
Alkyloxidové či aryloxidové ionty reagují s 2*H*-benzimidazol-2-spirocyklohexanem **2** velice pomalu, dokonce i v polárních rozpouštědlech[18]. Velice ochotně s alkyloxidovými či aryloxidovými ionty ovšem reaguje 5-chlor-2*H*-benzimidazol-2-spirocyklohexan **7**. Zahříváním této látky s methoxidem sodným vzniká 5-methoxy- a neočekávaně také 4,6-dimethoxy- derivát (látky **8** a **10**). Vznik 4,6-dimethoxy-2*H*-benzimidazol-2-spirocyklohexanu **10** je pravděpodobně vysvětlitelný tím, že nejdříve vzniká meziprodukt **9**, kde oxoniový ion ovlivňuje umístění nukleofilu do polohy 4 (viz. Obr. 14)[17].



Obr. 14: Reakce 5-chlor-2*H*-benzimidazol-2-spirocyklohexanu s methoxidem sodným

4.2.3 reakce se sirnými nukleofily

Ze sirných nukleofilů se jedná hlavně o thioláty. Oproti kyslíkatým nukleofilům reaguje 2*H*-benzimidazol-2-spirocyklohexan **2** velmi rychle s většinou thiolů, respektive thiolátů[18]. Reakce jsou mírně exotermické[17]. Vznikající produkty záleží na reakčních podmínkách. Jedná se o směs více produktů, 5-mono-, 5,6-di- a 4,6-di-, 4,5,6-tri- a 4,5,7-tri-, 4,5,6,7-tetrasubstituovaných derivátů (látky **11-16**, viz. Obr. 15)[18]. Všechny tyto produkty vznikají po předchozí oxidaci různě substituovaného meziproduktu adice 1,3-dihydro-2*H*-benzimidazol-2-spirocyklohexanu oxidem manganičitým. V reakci dále vzniká malé množství disulfidu RS-SR, odpovídající danému nukleofilu, díky probíhající oxido-redukční reakci mezi thiolem a isobenzimidazolem[17].

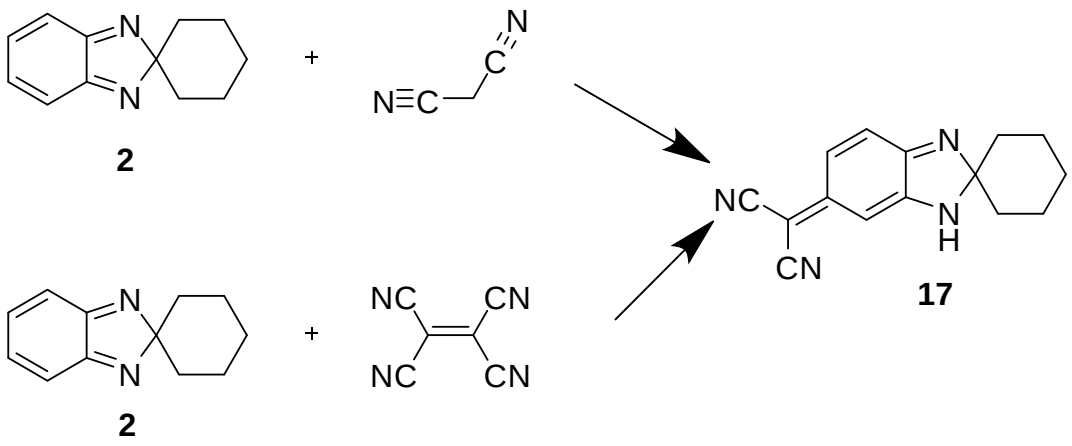


Obr. 15: Struktury látek 11-16

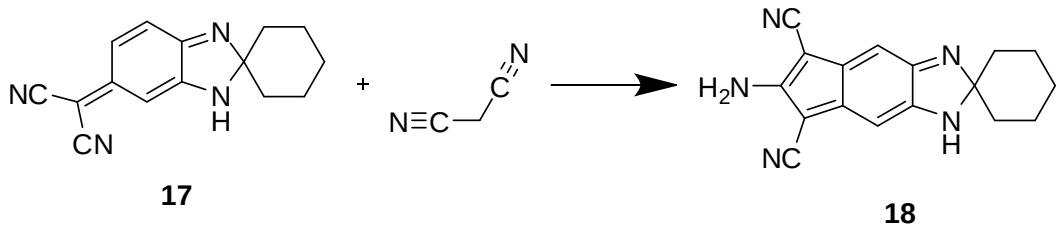
Při použití jednoho či dvou ekvivalentů propanthiolátu sodného, propanolu jako rozpouštědla, míchání za laboratorní teploty po několik hodin, je výsledkem reakce směs 5-mono- (**11**, R= -C_3H_7), 4,6-di- (**13**, R= -C_3H_7) a 5,6-di- (**12**, R= -C_3H_7) a 4,5,7-trisubstituovaných (**15**, R= -C_3H_7) derivátů 2*H*-benzimidazol-2-spirocyklohexanu. Rozdělení těchto produktů je velmi obtížné. Poly-propylthiol- deriváty 2*H*-benzimidazol-2-spirocyklohexanu jsou jasně zbarvené od sytě žluté přes oranžovou až po temně červenou a jsou silně fluorescenční pod UV. Dále jsou tyto produkty nestálé za přítomnosti vzduchu a světla a jsou termolabilní[18].

4.2.4 reakce s uhlíkatými nukleofily

2*H*-benzimidazol-2-spirocyklohexan **2** reaguje s malononitrilem za vzniku fialově zbarveného produktu **17**, který při zreagování s další molekulou malononitrilu dává vzniknout zelenému chinonovému heterocyklu **18** (viz. Obr. 16,17). Je zajímavé, že produkt **17** vzniká i při reakci 2*H*-benzimidazol-2-spirocyklohexanu **2** s tetrakyanoethenem (viz. Obr. 17)[17,18].

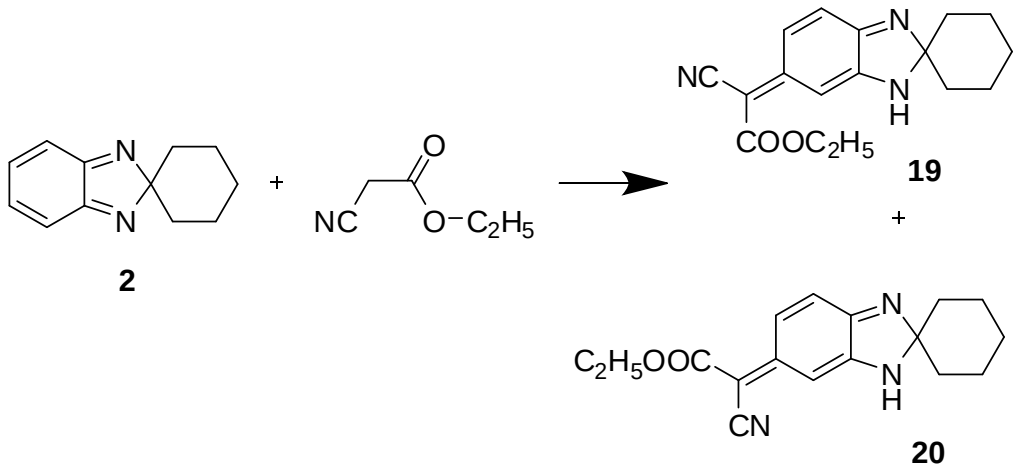


Obr. 16: Reakční schéma



Obr. 17: Reakční schéma

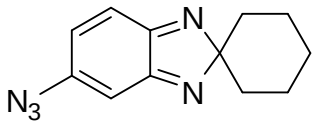
Jako další uhlíkatý nukleofil může být použit ethyl-kyanoacetát, kdy při reakci s 2*H*-benzimidazol-2-spirocyklohexanem **2** vzniká směs geometrických izomerů **19** a **20** zelené barvy (viz. Obr. 18)[17,18].



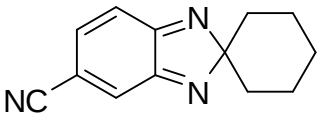
Obr. 18: Reakční schéma

4.2.5 reakce s anorganickými solemi

Řada anorganických solí (např. $NaNO_2$, $NaHSO_3$, KSCN) není schopna reagovat s 2*H*-benzimidazol-2-spirocyklohexanem **2** dokonce ani při zahřívání v dimethylsulfoxidu. Přesto, 5-chlor-2*H*-benzimidazol-2-spirocyklohexan **2**, reaguje s azidem sodným a kyanidem draselným za vzniku 5-azido- **21** a 5-kyano-2*H*-benzimidazol-2-spirocyklohexanu **22** (viz. Obr. 19) ve velmi dobrém výtěžku[17].



21



22

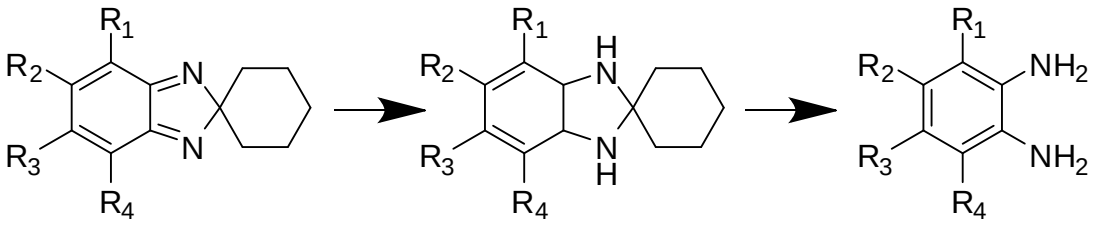
Obr. 19: Struktury látek 21, 22

4.3 Konverze substituovaných 2*H*-benzimidazol-2-spirocyklohexanů na substituované *ortho*-fenylendiaminy

Různě substituované 2*H*-benzimidazol-2-spirocyklohexany **23** mohou být převedeny na odpovídající *o*-FDA **25** katalytickou redukcí nebo reakcí s dithioničitanem sodným (viz. Obr. 20)[17].

Substituované 2*H*-benzimidazol-2-spirocyklohexany **23** jsou redukovány na jejich 1,3-dihydro- deriváty **24** pomocí vodíku za přítomnosti katalyzátoru Pd/C. 1,3-dihydro-deriváty **24** jsou poté hydrolyzovány v přítomnosti kyseliny octové, lépe trifluoroctové, jako rozpouštědla na odpovídající *o*-FDA **25**[18,19].

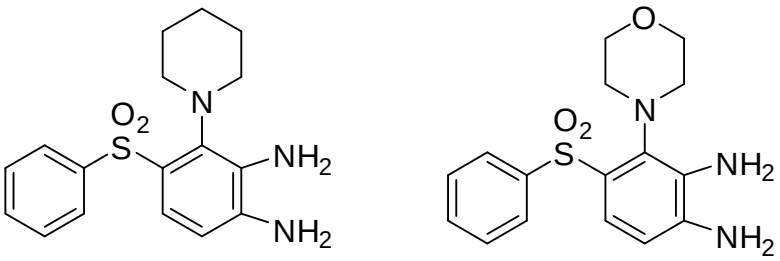
Nicméně, jako nejlepší cesta k získání nukleofilně substituovaných derivátů *o*-FDA **25** se jeví redukce substituovaných 2*H*-benzimidazol-2-spirocyklohexanů **23** přebytkem dithioničitanu sodného. Nejvhodnějším rozpouštědlem je horký vodný roztok ethanolu či acetonu. Za těchto podmínek je možno získat substituované *o*-FDA, ale produkt může být znečištěn meziproduktem odpovídajícího 1,3-dihydro-derivátu **24** 2*H*-benzimidazol-2-spirocyklohexanu. Chromatografické čištění v tomto případě probíhá bez problémů[18].



23 **24** **25**

Obr. 20: Reakční schéma

Většina substituovaných *o*-FDA jsou sloučeniny nestálé na vzduchu a nestabilní vůči působení světla a tepla. Ovšem substituenty, které jsou povahou elektron-akceptorové zvyšují stabilitu odpovídajících *o*-FDA. Příkladem je 4-fenylsulfonyl-3-piperidino-*ortho*-fenylendiamin **26** či 4-fenylsulfonyl-3-morfolino-*ortho*-fenylendiamin **27** (viz. Obr. 21), které jsou světle růžové pevné látky, které se při uchovávání za denního světla neodbarvují[19].



26 **27**

Obr. 21: Struktury látek 26, 27

5. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Methoxid sodný byl zakoupen u firmy Acros, 1,1-dimethylethanthiol a dithioničitan sodný u firmy Sigma-Aldrich, oxid manganičitý u firmy Merck. Použitá rozpouštědla byla zakoupena u firem Penta a Lach-Ner. Methanol byl sušen pomocí hořčíku s přídavkem jódu a byl oddestilován v čase potřeby. Diiminosukcinonitril byl připraven v čas potřeby podle publikovaných postupů[20].

Průběh reakcí a čistota produktů byly průběžně kontrolovány pomocí tenkovrstvé chromatografie (TLC) na deskách Merck Silikagel 60 F254. Detekce byla prováděna UV lampou při vlnové délce 254 nm a 366 nm.

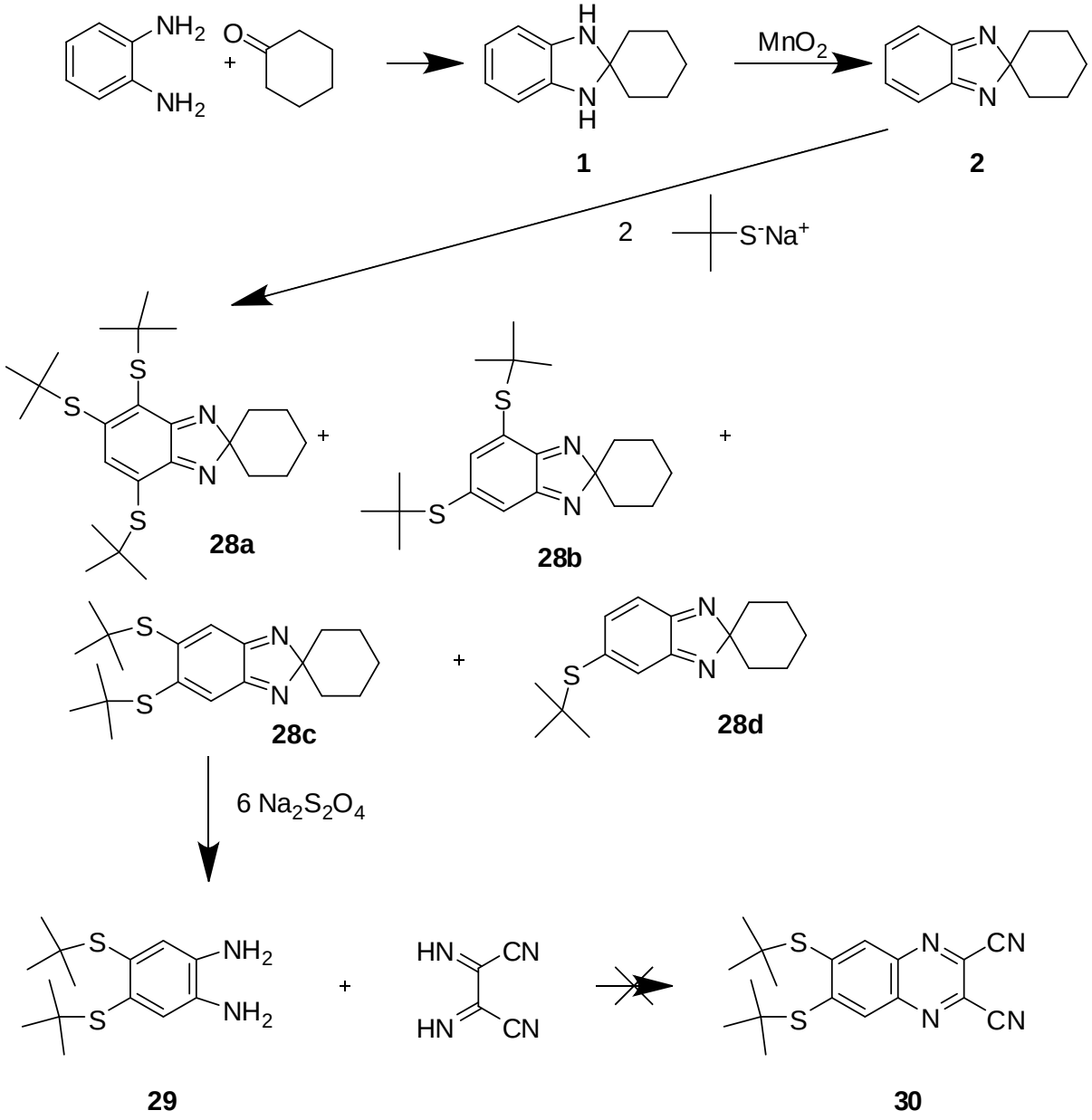
Čištění produktů bylo prováděno sloupcovou chromatografií na stacionární fázi Merck Kieselgel 60 (0,040-0,063 mm). Mobilní fáze jsou uvedeny u jednotlivých postupů příprav.

Teploty tání byly stanovovány na digitálním přístroji ELECTROTHERMAL IA9200.

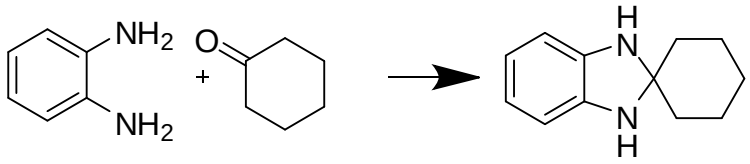
Data elementární analýzy byla získána pomocí přístroje Automatic Microanalyser EA1110CE.

Analýza ^{1}H a ^{13}C NMR byla provedena na přístroji Varian Mercury Vx BB 300.

5.1 Schéma prováděných reakcí



5.2 Příprava 1,3-dihydro-2*H*-benzimidazol-2-spirocyklohexanu

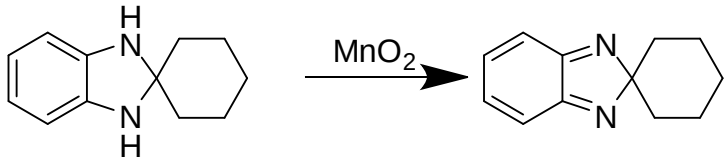


1

o-FDA (1,08 g, 10 mmol) byl suspendován ve vodě (10 ml). Směs byla zahřívána k teplotě varu v lázni pod zpětným chladičem. V teplé vodě došlo k rozpuštění *o*-FDA. Poté byl do reakce pipetou přidán cyklohexanon (1,05 ml, 10 mmol) a směs byla zahřívána při teplotě varu 90 minut. Po ukončení zahřívání byla reakční směs ochlazena ve směsi soli a ledu. Za chladu došlo k vyloučení krystalů ve formě bílých jehlic. Produkt **1** byl odsát na fritě a poté byl rekrystalizován z benzinu. Po odsátí a vysušení bylo naváženo 1,84 g produktu **1**, což odpovídá výtěžku 98 %, ale po rekrystalizaci bylo naváženo pouze 0,954, což odpovídá pouze 51% výtěžku.

Elementární analýza. (%) vypočítáno pro $C_{12}N_2H_{16}$: C 76,56; H 8,57; N 14,88; nalezeno: C 76,67; H 8,76; N 15,18. ^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ (ppm) 6,66-6,54 (m, 4H, ArH), 3,83 (bs, 2H, NH), 1,79-1,69 (m, 4H, CH2), 1,66-1,55(m, 4H, CH2), 1,50-1,39 (m, 2H, CH2). ^{13}C NMR ($CDCl_3$) δ (ppm) 139,7; 119,9; 109,6; 79,8; 39,1; 24,9; 23,2. T.t.: 139,4 – 140,4 °C (lit. 138-140°C[21]).

5.3 Příprava 2*H*-benzimidazol-2-spirocyklohexanu



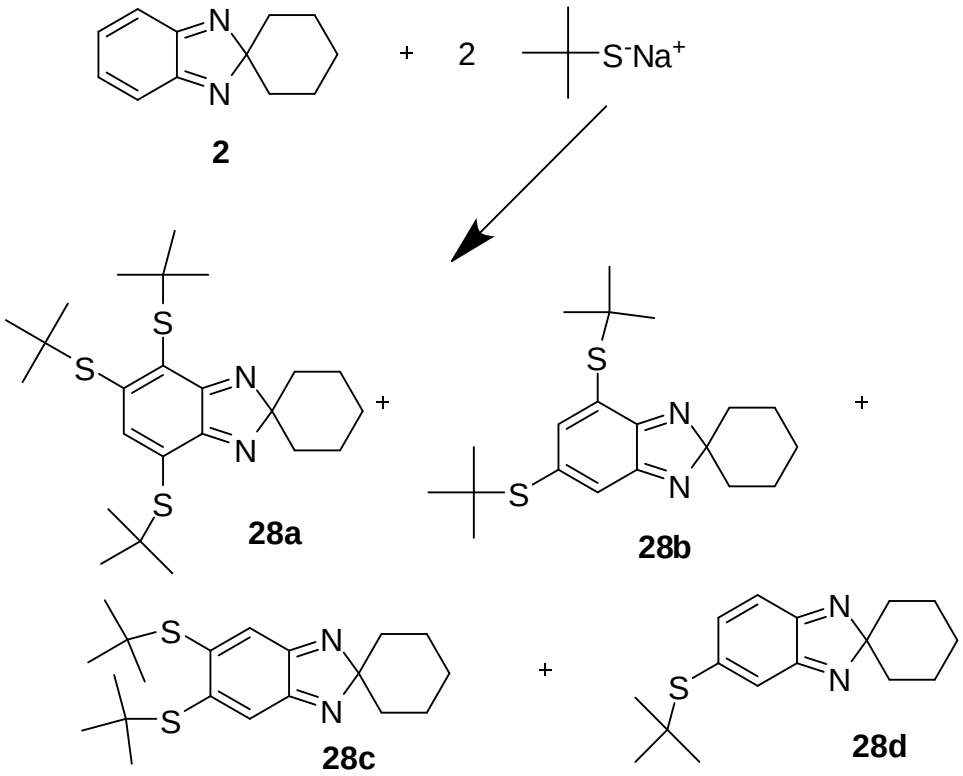
1 **2**

1,3-Dihydro-2*H*-benzimidazol-2-spirocyklohexan **1** (0,502 g, 2,66 mmol) byl smísen s toluenem (50 ml). Po jeho rozpuštění bylo přidáno oxidační činidlo MnO_2 (2,515 g, 28,9 mmol). Reakce byla míchána po dobu 72 hodin při laboratorní teplotě. Poté byl odfiltrován oxid manganičitý a na vakuové odparce byl odpařen toluen. Následně byl produkt **2** za horka rozpuštěn v benzínu, byl krátce povařen s aktivním uhlím, které bylo

ještě za horka odfiltrováno. Filtrát byl odpařen. Produktem **2** byla olejovitá látka. Po ochlazení látky přibližně na -25°C došlo k vyloučení bíložlutých krystalů. Bylo získáno 0,391 g produktu **2**, což odpovídá přibližně 80% výtěžku.

T.t.: 52,5 – 53,4 °C (lit. 63-65°C[21]).

5.4 Reakce 2*H*-benzimidazol-2-spirocyklohexanu s 1,1-dimethylethanthiolátem sodným



Methoxid sodný (0,227 g, 4 mmol) byl rozpuštěn v bezvodém methanolu (15 ml). Pomocí injekce byl do reakce přidán 1,1-dimethylethanthiol (0,472 ml, 4 mmol). Reakce byla míchána přibližně 5 minut za vzniku 1,1-dimethylethanthiolátu sodného. Poté byl do reakce přidán 2*H*-benzimidazol-2-spirocyklohexan **2** (0,372 g, 2 mmol). Reakce byla míchána 6 hodin při laboratorní teplotě. Následně byl do reakce přidán MnO_2 (0,216 g, 4 mmol) a reakce byla dalších 30 minut míchána. Po ukončení míchání byl odpařen methanol, produktem byla olejovitá látka. K produktu byla přidána voda a produkt byl vytřepán do chloroformu. Organická fáze byla vysušena bezvodým síranem sodným, který byl následně odfiltrován, a poté odpařena. Reakce byla prováděna dle již publikovaného postupu[21].

Produktem je směs čtyř látek: **28a**: 4,5,7-tris(*terc*-butylthio)-2*H*-benzimidazol-2-spirocyklohexan, **28b**: 4,6-bis(*terc*-butylthio)-2*H*-benzimidazol-2-spirocyklohexan, **28c**: 5,6-bis(*terc*-butylthio)-2*H*-benzimidazol-2-spirocyklohexan, **28d**: 5-*terc*-butylhio-2*H*-benzimidazol-2-spirocyklohexan, jejichž oddělení bylo velmi komplikované. Pro jejich rozdělení byla použita sloupcová chromatografie s mobilní fází toluen:aceton 25:1. Byly odebrány 4 frakce. Jako první frakce byla odebrána směs látek **28a** a **28b**, ve druhé frakci byla směs látek **28b** a **28c**, ve třetí frakci byla směs látek **28c** a **28d**. Ve čtvrté frakci byla pouze látka **28d**, která byla dále dočištěna pomocí sloupcové chromatografie s mobilní fází benzin:ethyl-acetát 3:1. První frakce – směs **28a** a **28b** byla oddělena za opětovného použití sloupcové chromatografie, ale s odlišnou mobilní fází - benzin:ethyl-acetát 9:1. Byla oddělena čistá látka **28a** a čistá látka **28b**.

Třetí frakcí byla směs látek **28c** a **28d**, které se pomocí sloupcové chromatografie nepodařilo rozdělit. Směs byla proto smísena s ekvivalentním množstvím 1,1-dimethylethanthiolátu sodného a byla zahřívána 6 hodin při teplotě 85 °C pod zpětným chladičem. Poté byl přidán oxid manganičitý (2 ekvivalenty), směs byla míchána 5 minut. Směs byla následně zpracována (viz. reakce výše). Pro odseparování látek byla použita sloupcová chromatografie s mobilní fází toluen:aceton 20:1. Odseparování látky **28c** bylo úspěšné.

28a: 4,5,7-tris(*terc*-butylthio)-2*H*-benzimidazol-2-spirocyklohexan: ^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ (ppm) 7,57 (s, 1H, ArH), 2,02-1,62 (m, 10H, CH2), 1,50 (s, 9H, CH3), 1,44 (s, 9H, CH3), 1,37 (s, 10H, CH3). ^{13}C NMR ($CDCl_3$) δ (ppm) 169,9; 159,4; 151,2; 142,7; 132,8; 131,3; 106,9; 51,1; 49,5; 47,8; 38,3; 32,9; 32,1; 31,3; 25,7; 24,5.

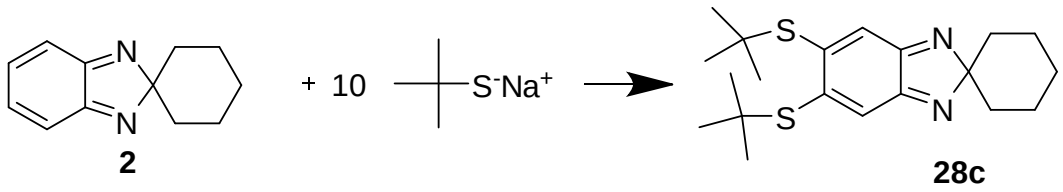
28b: 4,6-bis(*terc*-butylthio)-2*H*-benzimidazol-2-spirocyklohexan: ^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ (ppm) 7,26 (d, 1H, J=1,4 Hz, ArH), 7,07 (d, 1H, J=1,4 Hz, ArH), 2,08-1,71 (m, 10H, CH2), 1,47 (s, 9H, CH3), 1,40 (s, 9H, CH3). ^{13}C NMR ($CDCl_3$) δ (ppm) 159,1; 143,7; 131,7; 125,8; 107,3; 47,9; 47,6; 32,8; 31,1; 30,9; 25,5; 24,5

28c: 5,6-bis(*terc*-butylthio)-2*H*-benzimidazol-2-spirocyklohexan: ^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ (ppm) 7,34 (s, 2H, ArH), 2,02-1,88 (m, 4H, CH2), 1,81-1,60 (m, 6H, CH2), 1,51 (s, 18H, CH3). ^{13}C NMR ($CDCl_3$) δ (ppm) 157,5; 134,3; 126,0; 107,1; 48,6; 33,2; 30,6; 25,5; 24,7.

28d: 5-*terc*-butylhio-2*H*-benzimidazol-2-spirocyklohexan: ^{1}HNMR ($CDCl_3$) δ (ppm) 7,28 (s, 1H, ArH), 7,12 (d, 1H, J=9,8 Hz, ArH), 6,87 (d, 1H, J=9,7Hz, ArH), 1,98-

1,87 (m, 4H, CH2), 1,78-1,68 (m, 2H, CH2), 1,67-1,56 (m,4H, CH2), 1,48 (s, 9H, CH3). ^{13}C NMR ($CDCl_3$) δ (ppm) 158,8; 158,1; 143,8; 139,7; 125,9; 124,6; 107,6; 47,8; 32,9; 30,9; 25,5; 24,6.

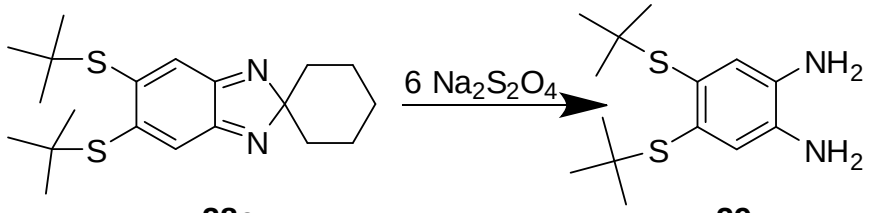
5.5 Optimalizovaná příprava 5,6-bis(*terc*-butylthio)-2*H*-benzimidazol-2-spirocyklohexanu



2 **28c**

Methoxid sodný (10,5 g, 194 mmol) byl rozpuštěn v bezvodém methanolu. Po jeho rozpuštění byl do reakce přidán 1,1-dimethylethanthiol (21,8 ml, 194 mmol). Do reakční směsi byl přidán 2*H*-benzimidazol-2-spirocyklohexan **2** (3,638 g, 19,5 mmol). Dále byl přidán oxid manganičitý (10,5 g, 194 mmol). Reakce byla míchána po dobu 7 dní za laboratorní teploty. Po ukončení míchání byl MnO_2 odfiltrován, následně byl odpařen toluen. K produktu byla přidána voda a produkt byl vytřepán do chloroformu. Organická fáze byla vysušena pomocí bezvodého síranu sodného, který byl následně odsán na fritě, a odpařena. Dle TLC byla směs tvořena třemi sloučeninami **28a-c**. Tyto sloučeniny byly od sebe odděleny sloupcovou chromatografií s mobilní fází toluen:aceton 30:1. 5,6-bis(*terc*-butylthio)-2*H*-benzimidazol-2-spirocyklohexan **28c** byl získán jako poslední frakce. Bylo získáno 2,42 g produktu, což odpovídá 34% výtěžku.

5.6 Příprava 4,5-bis(*terc*-butylthio)benzen-1,2-diaminu



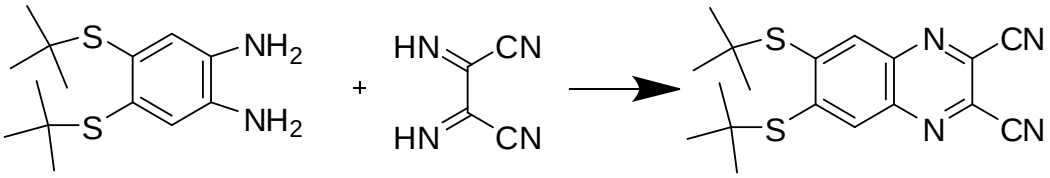
28c **29**

V jedné kádince byl rozpuštěn dithioničitan sodný (0,356 g, 20,5 mmol) ve vodě (5 ml), ve druhé byl rozpuštěn 5,6-bis(*terc*-butylthio)-2*H*-benzimidazol-2-spirocyklohexan **28c** (0,124 g, 341 μmol) v ethanolu (5 ml). Poté byly obě látky smíchány. Reakční směs

byla zahřívána pod zpětným chladičem v lázni o teplotě 80 °C po dobu 2 hodin. Po ukončení zahřívání byl odpařen ethanol. Do reakce byl přidán ethyl-acetát, do kterého byl produkt vytřepán. Organická fáze byla vysušena bezvodým síranem sodným, který byl následně odfiltrován, a odpařena. Produkt **29** byl vyčištěn za použití sloupcové chromatografie s mobilní fází benzin:ethyl-acetát 1:2. Produkt **29** je narůžovělá pevná látka. Bylo naváženo 0,0641 g produktu **29**, což odpovídá 66% výtěžku. Látka byla již dříve připravena a publikována[19].

^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ (ppm) 7,06 (s, 2H, ArH), 3,50 (bs, 4H, NH2), 1,24 (s, 18H, CH3). ^{13}C NMR ($CDCl_3$) δ (ppm) 134,8; 130,5; 126,8; 47,1; 31,0.

5.7 Příprava 6,7-bis(*terc*-butylthio)chinoxalin-2,3-dikarbonitrilu



29 **30**

4,5-bis(*terc*-butylthio)benzen-1,2-diamin **29** (60 mg, 161 μmol) a diiminosukcinonitril (30 mg, 283 μmol) byly zhomogenizovány v třence. Směs byla poté opatrně přisypávána do trifluoroctové kyseliny (TFA). Reakce byla míchána v inertní atmosféře (pod argonem) po dobu 18 hodin při laboratorní teplotě. Po ukončení míchání byla odpařena TFA, byla přidána voda a došlo k vysrážení produktu. Poté byl produkt odsát na fritě. Směs byla analyzována pomocí TLC v různých mobilních fázích (toluen, chloroform), ale produkt se neobjevil v očekávaných R_f hodnotách. Reakce byla provedena obdobně publikovaným postupům pro podobné látky[20].

6. DISKUZE

Kondenzací cyklohexanonu s *ortho*-fenylendiaminem a následnou oxidací dochází ke vzniku spirocyklické sloučeniny **2**. Toto uspořádání má dvě funkce. První funkcí je inverze polarity této látky, v cizí literatuře označována jako „umpolung“[18], která mění reaktivitu aromátu, pro který je typickou reakcí elektrofilní substituce, a umožňuje této sloučenině reagovat s nukleofilním činidlem, kde se jedná o reakci typu adice na dvojnou vazbu. Druhou funkcí je chránění aminoskupin, které by snáze podléhaly jiným reakcím, zejména oxidacím.

Příprava látky **1** proběhla bez komplikací. Při rekrystalizaci produktu dochází ovšem k téměř 50% ztrátám. Produkt je velmi nestálý, časem dochází k jeho černání. Pro jeho uchovávání je lepší jej ihned zoxidovat na látku **2** a uchovávat ho až po oxidaci v chladu, v temnu a v inertní atmosféře.

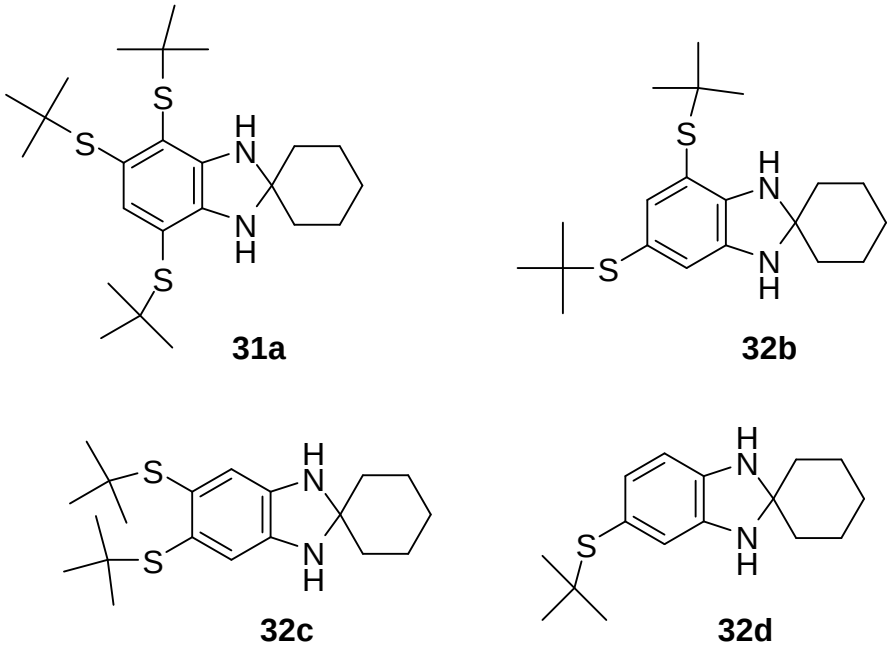
Pro výrobu látky **2** byla nejprve použita jiná reakce. Jako oxidační činidlo zde byl použit manganistan draselný namísto oxidu manganičitého. Tato reakce byla již dříve provedena a publikována[21]. Při použití $KMnO_4$ ovšem nedošlo k tvorbě produktu, proto bylo zvoleno jiné oxidační činidlo. Při použití MnO_2 reakce probíhala dobře. Produkt je ovšem také nestálý, časem dochází k jeho černání. Je nutné proto jej uchovávat v inertní atmosféře (v našem případě byl použit argon), v chladu (-25°C) a temnu. Za těchto podmínek vydrží produkt minimálně 6 měsíců.

Při přípravě látky **28c** vznikají během reakce čtyři různé produkty, z nichž pouze jeden je pro mou syntézu potřebný.

Poprvé jsem připravovala látku **28c** za třech různých podmínek – v ekvivalentním poměru 1,1-dimethylethanthiolátu sodného a výchozí látky za pokojové teploty; v ekvivalentním poměru 1,1-dimethylethanthiolátu sodného a výchozí látky za zvýšené teploty (85°C) a v nadbytku 1,1-dimethylethanthiolátu sodného za zvýšené teploty (85°C).

Na TLC nebyly skvrny jasné, spíše se táhly, což už vykazovala již dříve také látka **1** čili nezoxidovaná látka **2.** Reakce nejspíš tedy neproběhla do konce, ale vytvořily se zde meziprodukty **31a-d** (viz. Obr. 22), což je logické vzhledem k typu reakce - adice. Reakce byla provedena dle publikovaného zdroje[21], ve kterém se autor zmiňuje, že při použití

nukleofilů, které jsou elektron akceptorovými sloučeninami, je třeba do reakce přidat oxidační činidlo, ale při použití nukleofilů, které jsou donory elektronů, což je i 1,1-dimethylethanthiolát sodný, autoři tvrdí, že produkty reakce jsou oxidovány *in situ*.



Obr. 22: Struktury látek 31a-d

Do všech třech reakcí jsem přidala MnO_2 a nechala jsem je 30 minut míchat. Po další analýze TLC byly skvrny jasné a netáhly se. Můj předpoklad, že v reakci nedošlo k závěrečné oxidaci produktů a že je potřeba užít oxidační činidlo i při reakci s 1,1-dimethylethanthiolátem sodným, byl správný. Následně byl tento předpoklad potvrzen i v literatuře[17], která byla dohledána až později (viz. 4.2.3), po přípravě látky **28c.**

V přípravě za pokojové teploty či za zvýšené teploty nebyly pozorovány větší rozdíly, tudíž jsem všechny tři reakční směsi spojila v jednu. Dále jsem tedy pokračovala jen s jednou reakční směsí. K izolaci jednotlivých produktů jsem použila sloupcovou chromatografii (postup viz. experimentální část). Látky byly izolovány kvůli identifikaci pomocí NMR, aby bylo zřejmé, která z nich je požadovaný produkt. Z publikovaného zdroje[21] to totiž nebylo zřejmé, autor neuváděl R_f hodnoty ani pořadí eluovaných produktů.

Při prvním pokusu o připravení látky **28c** se mi podařilo izolovat jen malé množství této látky čisté. Toto množství bylo použito pro identifikaci látky pomocí NMR. Mou hlavní částí práce bylo optimalizovat reakci ve prospěch tohoto produktu vzhledem k tomu, že v publikovaném postupu byl výtěžek pouze 19 %[21].

Při dalším pokusu jsem do reakce přidala trojnásobné množství 1,1-dimethylethanthiolátu sodného. Do reakční směsi jsem dále přidala i oxid manganičitý, také v třínásobném množství vzhledem k výchozí látce. Směs byla zahřívána 6 hodin pod zpětným chladičem při teplotě 85°C. Po ukončení byla reakce zpracována podobně jako u předchozích reakcí (viz. experimentální část). Během reakce došlo opět ke vzniku čtyř produktů **28a-d**, které jsem se opět pokusila rozdělit sloupcovou chromatografií s mobilní fází toluen:aceton 20:1. Látku **28c** se mi podařilo izolovat v čisté formě jen ve velmi malém množství.

Při dalším pokusu bylo v reakci použito pětinásobné množství 1,1-dimethylethanthiolátu sodného. Reakční směs byla zahřívána po dobu 5 hodin v lázni pod zpětným chladičem při teplotě 85°C. Dále byla směs pouze míchána při laboratorní teplotě po dobu 20 hodin, poté byl přidán MnO_2 (1 ekvivalent) a reakce byla znovu zahřívána po dobu 2 hodin. Dle TLC bylo zjištěno, že reakce po 27 hodinách proběhla spíše ve prospěch látek **28a** a **28b**, kdežto ve vzorku směsi, který byl uchován z reakce po prvních pěti hodinách a který od té doby byl uchováván při pokojové teplotě, se zvýšil obsah látky **28c** a téměř už zde nebyla látka **28d.**

Po tomto pokusu jsem učinila závěr, že pro větší podíl látky **28c** ve směsi produktů je lepší reakční směs nezahřívat, ale pouze míchat při pokojové teplotě.

Při dalším pokusu byl 2*H*-benzimidazol-2-spirocyklohexan smísen s pětinásobným množstvím 1,1-dimethylethanthiolátu sodného a dvěma ekvivalenty oxidu manganičitého. Reakce byla míchána po dobu sedmi dní při laboratorní teplotě. Během této doby bylo zjištěno, že nedochází k dostatečné oxidaci a proto bylo množství MnO_2 postupně zvýšeno až na desetinásobek. Potvrdila se tak původní domněnka, že pro správný průběh reakce je zapotřebí výrazného nadbytku oxidačního činidla i přes výrazně elektrondonorový charakter nukleofilu.

Nejlepší reakční podmínky pro přípravu látky **28c** jsou uvedeny v experimentální části 5.5. Ve finále se nejvíce osvědčil pětinásobný přebytek ekvivalentu nukleofilního činidla, desetinásobný přebytek oxidačního činidla a laboratorní teplota reakce. Snaha o optimalizování reakce ve prospěch této látky byla úspěšná, bylo dosaženo 34% výtěžku této látky oproti publikovaným 19 %[21].

Při přípravě 4,5-bis(*terc*-butylthio)benzen-1,2-diaminu **29** jsem oproti publikaci změnila mírně reakční postup. Oproti publikaci byl produkt vytřepán do ethyl-acetátu místo do dichlormethanu, k sušení byl použit síran sodný místo síranu hořečnatého, při závěrečném čištění produktu na sloupcové chromatografii byla použita mobilní fáze benzin:ethyl-acetát 1:2 místo benzín:ethyl-acetát 9:1.

Po izolování produktu **29** jsem provedla TLC. Na desce jsem poté provedla postřik Ehrlichovým činidlem, které se používá na důkaz aromatických aminů. Skvrna se zbarvila oranžově, což znamená pozitivní reakci.

Produkt **29** je narůžovělá pevná látka, která se na vzduchu rychle rozkládá. Je třeba produkt uchovávat v inertní atmosféře nebo ho ihned zpracovat v dalších reakcích.

Příprava látky **30** se bohužel nezdařila. Analogicky této a předchozí reakci jsem zkoušela jako výchozí látku použít látku **28a.** Tato reakce se také nezdařila. Pro přípravu 6,7-bis(*terc*-butylthio)chinoxalin-2,3-dikarbonitrilu se do budoucna bude muset zvolit jiný postup přípravy.

7. ZÁVĚR

Cílem mé diplomové práce byla příprava 6,7-bis(*terc*-butylthio)chinoxalin-2,3-dikarbonitrilu. Syntéza tohoto produktu zahrnuje pět kroků. Důležitým krokem je příprava 5,6-bis(*terc*-butylthio)2*H*-benzimidazol-2-spirocyklohexanu, který vzniká spolu s dalšími produkty a je velice obtížné je od sebe separovat. Většinu práce jsem tedy věnovala této reakci. Za prvé jsem se snažila hledat vhodnou mobilní fázi pro separaci těchto složek sloupcovou chromatografií. Jako nejvhodnější mobilní fáze bylo použití směsi toluen:aceton 30:1. Za druhé jsem se snažila o optimalizaci podmínek této reakce, abych zvýšila množství 5,6-bis(*terc*-butylthio)2*H*-benzimidazol-2-spirocyklohexanu ve směsi produktu. Použitím deseti ekvivalentů 1,1-dimethylethanthiolátu sodného vůči výchozí látce se mi podařilo zvýšit obsah 5,6-bis(*terc*-butylthio)2*H*-benzimidazol-2-spirocyklohexanu na 34 % oproti publikovaným 19 %. Konečná fáze syntézy, příprava 6,7-bis(*terc*-butylthio)chinoxalin-2,3-dikarbonitrilu, se bohužel nezdařila.

8. LITERATURA

[1] TIAN, Y.Y.; WANG, L., L.; WANG, W. Progress in Photodynamic Therapy on Tumours. *Laser Physics*. 2008, 18 (10), pp. 1119-1123.

[2] MITTON, D.; ACKROYD, R. A brief overview of photodynamic therapy in Europe. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* 2008, 5, p. 103-111.

[3] CHOUDHARY, S.; NOURI, K.; ELSAIE, M., L. Photodynamic therapy in dermatology: a review. *Lasers Med. Sci.* 2009, 24, p. 971-980.

[4] HSI, R., A.; ROSENTHAL, D., I.; GLATSTEIN, E. Photodynamic Therapy in the Treatment of Cancer. *Drugs*. 1999, 57 (5), p. 725-734.

[5] AGOSTINIS, P.; BERG, K.; CENGEL, K., A.; et al. Photodynamic Therapy of Cancer: An Update. *CA Cancer J. Clin*. 2011, 61, p. 250-281.

[6] CASTANO, A., P.; DEMIDOVA, T., N., HAMBLIN, M., R. Mechanisms in photodynamic therapy: part one – photosensitizers, photochemistry and cellular localization. *Photodiagnosis Photodyn. Ther*. 2004, 1, p. 279-293.

[7] PLAETZER, K.; KRAMMER, B.; BERLANDA, J.; et al. Photophysics and photochemistry of photodynamic therapy: fundamental aspects. *Lasers Med. Sci.* 2009, 24, p. 259-268.

[8] EL-SHISHTAWY, R., M. Functional Dyes, and Some Hi-Tech Applications. *Int. J. Photoenergy*. 2009, article ID 434897, p. 1-21.

[9] ROBERTSON, C., A.; HAWKINS EVANS, D.; ABRAHAMSE, H. Photodysnamic therapy (PDT): A short review on cellular mechanisms and cancer research applications for PDT. *J. Photochem. Photobiol., B*. 2009, 96, p. 1-8.

[10] ZIMČÍK, P.; MILETÍN, M. Fotodynamická terapie jako nová perspektivní metoda léčby nádorových onemocnění. I. Historie, základní princip. *Ceska Slov. Farm.* 2004, 53 (5), s. 219-224.

[11] ZIMČÍK, P.; MILETÍN, M. Fotodynamická terapie jako nová perspektivní metoda léčby nádorových onemocnění. I. Přehled fotosenzitizérů. *Ceska Slov. Farm.* 2004, 53 (6), s. 271-279.

[12] FIRCZUK, M.; NOWIS, D.; GOŁĄB, J. PDT-induced inflammatory and host responses. *Photochem. Photobiol. Sci.* 2011, 10, p. 653-663.

[13] MOOR, A., C., E. Signaling pathways in cell death and survival after photodynamic therapy. *J. Photochem. Photobiol., B*. 2000, 57, p. 1-13.

[14] BUYTAERT, E.; DEWAELE, M.; AGOSTINIS, P. Molecular effectors of multiple cell death pathways initiated by photodynamic therapy. *Biochim. Biophys. Acta*. 2007, 1776, p. 86-107.

[15] BHUVANESWARI, R.; GAN, Y., Y.; SOO, K., C.; et al. The effect of photodynamic therapy on tumor angiogenesis. *Cell. Mol. Life Sci.* 2009, 66, p. 2275-2283.

[16] CASTANO, A., P.; MROZ, P.; HAMBLIN, M., R. Photodynamic therapy and anti-tumour immunity. *Nat. Rev. Cancer*. 2006, 6, p. 535-545.

[17] DAVIES, K., E.; DOMANY, G., E.; FARHAT, M.; et al. Umpolung of *o*-Phenylenediamines by Conversion into Isobenzimidazole. An Expedient Approach to Heterocycles with Nucleophilic Substituents. *J. Chem. Soc. Perkin Trans 1*. 1984, p. 2465-2475.

[18] IDDON, B. Synthesis and reactions of 2*H*-benzimidazole-2-spirocyclohexanes: an application of „umpolung“. *Bulletin des Sociétés Chimiques Belges* 1990, 99 (9), p. 673-701

[19] HAZELTON, J., C.; IDDON, B.; SUSCHITZKY, H.; et al. 2*H*-Benzimidazoles (Isobenzimidazoles). Part 10. Synthesis of Polysubstituted *o*-Phenylenediamines and their Conversion into Heterocycles, Particularly 2-Substituted Benzimidazoles with Known or Potential Anthelminthic Activity.*Tetrahedron*. 1995, 51, 39, p. 10771-10794.

[20] ROTHKOPF, H., W.; WŐHRLE, D.; MŰLLER, R.; et al. Di- und Tetracyanpyrazine. *Chem. Ber.* 1975, 108, p. 875-886.

[21] HAZELTON, J., C.; IDDON, B.; SUSCHITZKY, H.; et al. 2*H*-Benzimidazoles (Isobenzimidazoles). Part 6. Sulfur Derivatives. *J. Chem. Soc. Perkin Trans 1*. 1992, p. 685-691.