

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



DIPLOMOVÁ PRÁCA

Studium syntézy tetrapyrazinotriazaporfyrinů



HRADEC KRÁLOVÉ 2016

Adam Králik

„Prehlasujem, že táto práca je mojim pôvodným autorským dielom. Všetká literatúra a ďalšie zdroje, z ktorých som pri práci čerpal, sú uvedené v zozname použitej literatúry a v práci sú riadne citované. Práca nebola použitá na získanie iného alebo rovnakého titulu.“

V Hradci Králové 9. 5. 2016

Podpis:

Pod'akovanie

Na tomto mieste by som rád pod'akoval predovšetkým svojmu školiteľovi Doc. PharmDr. Petrovi Zimčikovi, Ph.D. za množstvo času, ktoré mi venoval pri zodpovedaní odborných aj praktických otázok spojených s diplomovou prácou, za jeho odborné vedenie, pripomienky, návrhy a trpezlivosť. Ďalej by som chcel taktiež pod'akovať Doc. PharmDr. Veronike Novákovej, Ph.D. za pomoc so syntézou, odborné rady a priateľské jednanie.

Za namerané dáta by som rád pod'akoval nasledujúcim pracovníkom: Doc. PharmDr. Lucie Nováková, Ph.D. (HR MS), Doc. PharmDr. Jiří Kuneš, CSc. (NMR) a PharmDr. Juraj Lenčo Ph.D. (MALDI-TOF MS).

Za finančnú podporu ďakujem projektu SVV 260 062.

ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv

Kandidát **Adam Králík**

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

Názov diplomovej práce Studium syntézy tetrapyrazinotriazaporfyrinů

Ftalocyaníny sú skupina planárnych syntetických makrocyclických molekúl, štruktúrne podobných, v prírode sa vyskytujúcim, porfyrinoidom, ktoré vykazujú zaujímavé fotofyzikálne vlastnosti. Našli mnoho uplatnení, z ktorých najslubnejšie je použitie k produkcií singletového kyslíku. Majú schopnosť absorbovať svetelnú energiu a predať ju okolitým molekulám, pričom vznikajú vysoko reaktívne molekuly, z ktorých najdôležitejšou je singletový kyslík. Toto môže byť využité vo fotodynamickej terapii, ktorá má schopnosť ničiť nádorové bunky, zabíjať mikroby a podobne. Fotodynamická terapia využíva 3 komponenty: svetlo, fotosenzitizér a kyslík k vytvoreniu vysoko reaktívnych foriem kyslíku.

Pôvodný zámer tejto práce bol nasyntetizovať aza-analóg ftalocyanínu s objemnými periférnymi substituentmi odvodenými od bornanu, ktoré by mohli brániť agregácií molekúl. Pyrazinový prekursor pre cyklotetramerizáciu bol pripravený kondenzačnou reakciou medzi diaminomaleonitrilom a bornan-2,3-diónom. Pri následnej cyklotetramerizácii za použitia lítia v butanole vznikol bočný produkt inej farby, ktorý bol charakterizovaný ako derivát tetrapyrazinotriazaporfyrinu s propylovým reťazcom v *meso*-polohe. Cyklotetramerizácia v oktanoale s použitím lítia viedla k podobnému bočnému produktu s heptylovým reťazcom v *meso*-polohe. Alifatický reťazec preto pravdepodobne pochádzal z rozpúšťadla, v ktorom reakcia prebiehala. Následné štúdium podmienok reakcií ukázalo výrazný vplyv množstva použitého lítia. Pri použití horčíka ako iniciátora cyklotetramerizácie k tejto reakcii nedochádzalo.

ABSTRACT

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department Department of Pharmaceutical Chemistry and Drug Control

Candidate **Adam Králík**

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

Title of Thesis Synthesis of tetrapyrazinotriazaporphyrins

Phthalocyanines are a group of planar synthetic macrocyclic molecules structurally similar to the naturally occurring porphyrinoids, which show some attractive photophysical properties. They have found many applications from which the most promising is singlet oxygen production. They are able to absorb the energy of light and transfer it to the surrounding molecules creating a highly reactive species, the most important being singlet oxygen. This can be used in photodynamic therapy which is used to destroy tumor cells, to kill microbes etc. Photodynamic therapy uses three non-toxic components: light, photosensitizer and oxygen to produce reactive oxygen species. The original aim of this work was to synthesize an aza-analogue of phthalocyanine with bulky peripheral substituents derived from camphor that could prevent the aggregation of the compound. The pyrazine precursor for cyclotetramerization was prepared by condensation reaction between diaminomaleonitrile and camphorquinone. However, an interesting side product of different color and with a slightly higher R_f than the targeted compound occurred upon cyclotetramerization of the precursor in butanol with lithium. It was characterized as tetrapyrazinotriazaporphyrine with propyl chain in the *meso*-position. Cyclotetramerization in octanol with lithium led to the similar by-product with heptyl chain in *meso*-position. The aliphatic side chain most likely originated from the solvent the reaction was carried in. The following study revealed important influence of the amount of lithium on the yield of this side product. Magnesium as the initiator did not produce this side product.

OBSAH

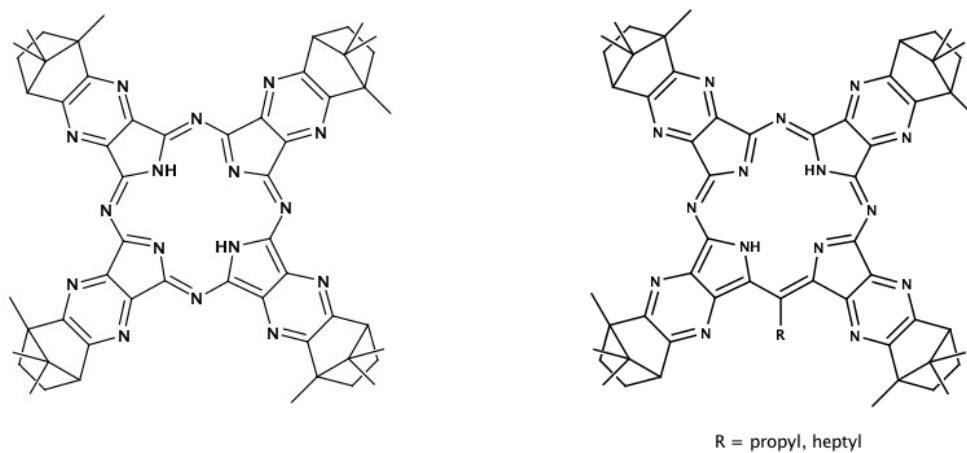
2. ZOZNAM SKRATIEK	12
3. CIEĽ PRÁCE	13
4. TEORETICKÁ ČASŤ	14
4.1. Fotodynamická terapia	14
4.2. Fotosenzitizéry v súčasnosti	16
5. METODOLOGICKÁ ČASŤ	20
5.1. Syntéza TBTAP	20
5.2. Syntéza funkčných derivátov TBTAP	21
6. EXPERIMENTÁLNA ČASŤ	23
6.1. Syntéza bornan[5,6-b]pyrazin-2,3-dikarbonitrilu (1)	23
6.2. Cyklotetramerizácia bornan[5,6-b]pyrazin-2,3-dikarbonitrilu	25
6.3. Syntéza tetraborantetrapyrazinoporfyrazináto zinočnatého komplexu (3).....	26
6.4. Syntéza tetraborantetrapyrazinoporfyrazináto horečnatého komplexu (4)	27
6.5 Cyklizácia bornan[5,6-b]pyrazin-2,3-dikarbonitrilu v butanole pomocou Li v rôznom nadbytku	28
6.4. Cyklizácia bornan[5,6-b]pyrazin-2,3-dikarbonitrilu pomocou Li v oktanole	29
6.4. Cyklizácia bornan[5,6-b]pyrazin-2,3-dikarbonitrilu pomocou Mg v butanole	30
7. DISKUSIA	31
7.1 Syntéza	33
7.2 Charakterizácia	35
8. ZÁVER.....	39
9. POUŽITÁ LITERATÚRA	40

2. ZOZNAM SKRATIEK

5-ALA	Kyselina 5-aminolevulová
AK	Aktinická keratóza
AzaPc	Azaftalocyanín
BuOH	Butanol
DAMN	Diaminomaleonitril
HpD	Derivát hematoporfyrínu
IČ	Infračervená oblasť žiarenia
M-ALA	Methyl-aminolevulinát
MALDI-TOF MS	Hmotnostná spektrometria MALDI-TOF
MS	Hmotnostná spektrometria
NMR	Nukleárna magnetická rezonancia
PDT	Fotodynamická terapia
PS	Fotosenzitizér
TBTAP	Tetrabenzotriazaporfyrín
TLC	Tenkovrstvová chromatografia
TPTAP	Tetrapyrazinotriazaporfyrín

3. CIEĽ PRÁCE

Cieľom práce bola príprava azaftalocyanínu, ktorý bude niesť na periférii objemné substituenty odvodené od bornanu čím bude zabránané agregácii viacerých molekúl. V priebehu syntézy však došlo k formácií neobvyklých bočných produktov (Obr. 1), preto bola pozornosť zameraná najmä na ich charakterizáciu a podmienky ich vzniku.



Obr. 1 Cieľová molekula a bočné produkty

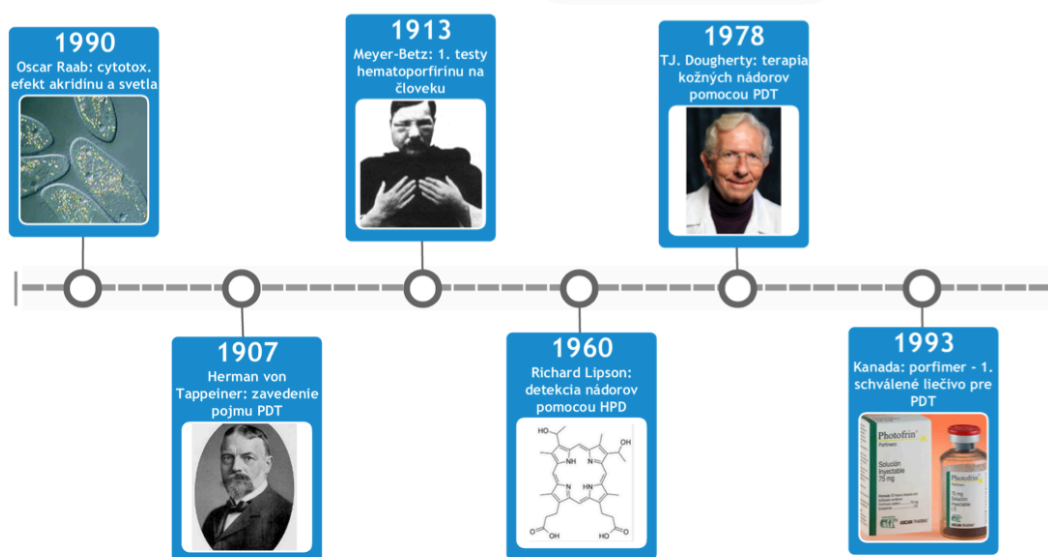
4. TEORETICKÁ ČASŤ

4.1. Fotodynamická terapia

Fotodynamická terapia (PDT) je moderná, minimálne invazívna metóda, využívajúca svetlo, fotosenzitizér (PS) a kyslík, pomocou ktorých je možné vyvolať relatívne selektívnu cytotoxickú aktivitu, čo je využívané pri liečbe nádorových ochorení, prekancerózných stavov alebo eradikácií mikroorganizmov. PS má schopnosť absorbovať určitú časť svetelného žiarenia, čím sa dostane do energeticky bohatšieho, excitovaného stavu, pričom túto energiu ďalej predáva okolitým molekulám kyslíka, z ktorých sú následne vytvárané vysoko reaktívne formy kyslíka, ktoré vedú k smrti zasiahnutých buniek.¹ Klinické štúdie ukazujú, že PDT môže byť s výhodou použitá najmä k liečbe nádorov v počiatočnej fáze a je schopná zlepšiť kvalitu života pri neoperovateľných tumoroch. Minimálna toxicita na zdravé tkanivá, zanedbateľné systémové účinky, podstatne znížená dlhodobá morbidita, neprítomnosť rezistenčných mechanizmov ako aj výborné kozmetické vlastnosti, robia z PDT cennú metódu, vyžívanú predovšetkým v kombinovanej terapii. S narastajúcim technologickým pokrokom a objavom netoxických a vysoko efektívnych PS má PDT potenciál byť integrovaná na úroveň základnej línie v boji s nádorovými ochoreniami.²

Počiatok terapie svetlom môžeme datovať už do antiky a starovekého Egypta, avšak až začiatkom 19. storočia (Obr. 2) boli nemeckým študentom medicíny Oscarom Raabom prvý krát popísané cytotoxické účinky svetla a rôznych akridínových farieb na prvoky rodu *Paramecium caudatum*. Pod vedením prof. Hermanna von Tappienera boli vykonané prvé experimenty a zavedený pojem "fotodynamický efekt".³ Prvé experimenty na človeku boli vykonané Dr. Friedrichom Meyer-Betzom, ktorý si injekčne aplikoval 200 mg hematoporfyrínu a na sebe pozoroval fototoxický účinok tejto látky, pričom na niekoľko dní opuchol a jeho telo bolo na svetlo citlivé ešte po dobu niekoľkých mesiacov.⁴ Moderná éra PDT začala až v počiatkoch 70. rokov 20. storočia, kedy Dr. Lipson a Dr. Schwartz pozorovali, že injekčná aplikácia hematoporfyrínu viedla k fluorescencii neoplastických lézií, ktoré mohli byť vizualizované behom operácie. Fotodynamický efekt bol v r. 1978 prvý krát klinicky testovaný prof. Thomasom Doughertym a jeho spolupracovníkmi v Roswell Park Cancer Institute, ktorým sa úspešne podarilo zmierniť, alebo vyliečiť celkovo 111 zo

113 kožných a podkožných maligných tumorov pomocou derivátu hematoporfyrínu (HpD). V roku 1993 bol HpD v Kanade schválený ako vôbec prvé liečivo pre PDT pod medzinárodným nechráneným názvom porfimer (komerčná nazov Photofrin).^{5, 6}



Obr. 2 Časová os najdôležitejších udalostí v PDT

Aj napriek tomu, že Photofrin je v súčasnosti stále najviac využívaným PS, vykazuje táto látka rôzne nevýhody, zahŕňajúce dlhotrvajúcu fotosenzitivitu a relatívne slabú absorbanciu pri 630 nm. Od počiatkov PDT existuje veľké úsilie syntetických chemikov objaviť a zaviesť do praxe druhú generáciu PS, pričom boli nasyntetizované a predložené stovky štruktúr, ako potencionálne PS pre PDT.⁷ Objav, že kyselina 5-aminolevulanová (5-ALA) je biosyntetickým prekurzorom PS protoporfyrínu IX, viedlo k mnohým aplikáciám, pri ktorých ALA alebo jej estery sú podávané topicky alebo p.o.⁸

Moderný PS by mal spĺňať niekoľko kritérií, z ktorých najdôležitejšie sú:

1. PS by mal byť chemicky čistý o známej molekulárnej štruktúre.
2. PS by mal byť čo najviac vychytávaný v postihnutom tkanive.
3. PS by mal výborne absorbovať svetelné žiarenie pri špecifickej vlnovej dĺžke a mal by mať vysoký extinkčný koeficient.
4. PS by mal efektívne produkovať reaktívne formy kyslíku.⁹

V nasledujúcej stati sú zhrnuté dnes používané PS.

4.2. Fotosenzitizéry v súčasnosti

1. generácia

Porfimer sodný (porfimer sodium)

Obchodný názov: Photofrin®

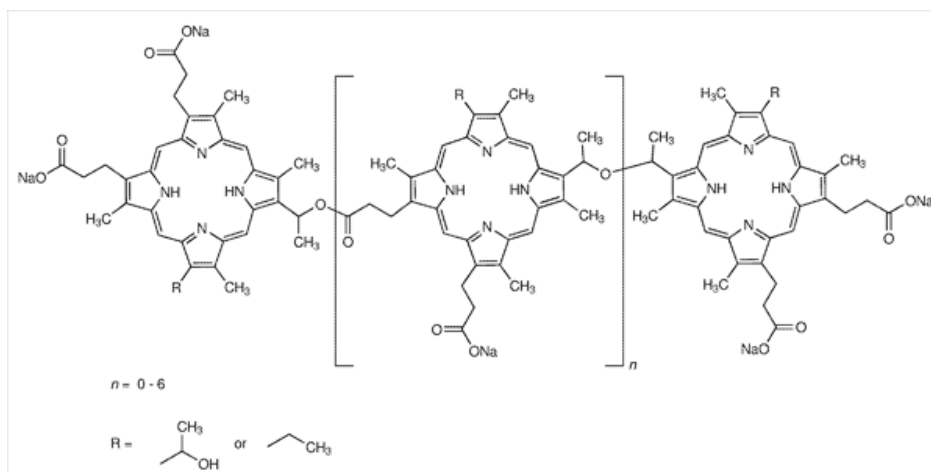
Výrobca: Axcan Pharma, Inc.

Základ štruktúry: porfyrín

Maximum absorpcie: 630 nm

Povolené použitie: celosvetovo

Charakteristika: Porfimer (Obr. 3) bol vôbec prvý PS schválený pre klinické použitie, pričom jeho indikácie dnes zahŕňajú rakovinu pažeráku, Barrettov pažerák, endobronchiálne nádory, karcinóm bazálnych buniek, skvamózny karcinóm kože a rakovinu krčku maternice.¹⁰ Terapia zahŕňa intravenózne podanie porfimeru sodného, ktorý je následne absorbovaný ako zdravými tak aj nádorovými bunkami, pričom behom pár dní dochádza k efluxu PS zo zdravých buniek a PS ostáva nahromadený v postihnutých bunkách a bunkách kože. Po 2 - 3 dňoch dôjde k osvetleniu nádoru svetlom požadovanej vlnovej dĺžky po dobu 5 - 40 minút, v závislosti na veľkosti nádoru. Ak sa jedná o endobronchiálny nádor, je použité veľmi tenké optické vlákno, ktorým sa svetlo dostane k nádoru, a po prebehnutí terapie, sa po 4 - 5 dňoch odumreté tkanivo bronchoskopicky odstráni. Tento proces môže byť podľa potreby viackrát opakovaný. Nežiadúce účinky porfimeru zahŕňajú dlhotrvajúcu fototoxicitu, kedy sa pacient musí vyvarovať priamemu slnečnému žiareniu minimálne po dobu 30 dní. Kožné reakcie zahŕňajú opuch, spálenie podobné úpalu od slnka alebo vytvorenie pľuzgierov. Citlivosť na svetlo môže pretrvávajúť až po dobu 3 mesiacov.¹¹



Obr. 3 Chemická štruktúra porfimeru sodného

2. generácia

Kyselina 5-aminolevulová (aminolevulinic acid, 5-ALA)

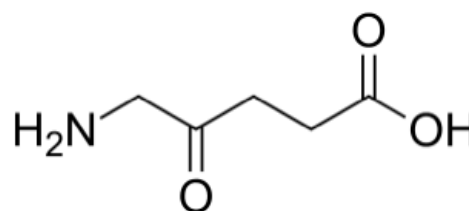
Obchodný názov: Levulan®, Levulan Kerastick®, Aladerm®, Gliolan®

Výrobca: DUSA Pharmaceuticals, Inc.

Základ štruktúry: prekursor porfyrínu

Maximum absorpcie: 635 nm (po konverzii na porfyrín)

Povolené použitie: celosvetovo



Obr. 4 Chemická štruktúra 5-ALA

Charakteristika: 5-ALA (Obr. 4) patrí do druhej generácie PS a jedná sa o prirodzene sa vyskytujúci biochemický prekursor hému, ktorý sa sériou enzymatických reakcií metabolizuje na fluorescentné a fotodynamicky aktívne porfyríny, predovšetkým protoporfyrín IX. Používa sa na terapiu aktinickej keratózy - prekancerózných kožných výrastkov s tendenciou maligne sa zvrhnúť. Ďalšie použitie zahŕňa vizualizáciu malígneho tkaniva pri chirurgickom výkone.¹² Výhodou oproti porfimeru je jeho rýchla eliminácia pri fotovizualizácii a minimálne systémové vstrebávanie pri lokálnom podaní. Zvyčajne na druhý deň po aplikácii dôjde k ožiareniu postihnutej oblasti po dobu približne 15 minút. Z nežiadúcich účinkov najviac prevažujú miestne začervenanie, pocit štipania a opuch na ožiarenom mieste.¹³

Metyl-5-aminolevulinát (methyl aminolevulinate, M-ALA)

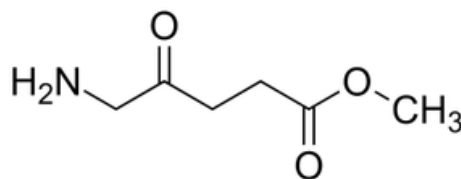
Obchodný názov: Metvix®

Výrobca: PhotoCure ASA

Základ štruktúry: prekursor porfyrínu

Maximum absorpcie: 635 nm (po konverzii na porfyrín)

Povolené použitie: USA, EU



Obr. 5 Chemická štruktúra M-ALA

Charakteristika: Výhoda M-ALA (Obr. 5) spočíva v jeho zvýšenej lipofilite oproti 5-ALA, vďaka čomu sa ochotnejšie vstrebáva do postihnutých tkanív pri lokálnej aplikácii. Medzi jeho indikácie patrí terapia aktinickej keratózy (AK), bazocelulárneho karcinómu (typ rakoviny kože, ktorý spôsobuje šupinaté fľaky alebo hrčky na koži) a liečba Bowenovej choroby (prekancerózne lézie pripomínajúce rozširujúce sa červeno-ružové fľaky).¹⁴ Aplikuje sa vo forme krému, ktorý sa po 3 hodinách odstráni a nasleduje expozícia žiareniu po dobu 5 - 20 minút. Pri AK je v niektorých prípadoch možné ožiarenie slnečným svetlom, bez použitia svetelného zdroju. Na vyliečenie indikovaného ochorenia väčšinou stačia dve PDT sedenia v intervale 7 dní. Nežiaduce účinky sú podobné ako pri 5-ALA a na ošetrovanom mieste sa môžu objaviť pľuzgiere, šupiny alebo chrasta do 10 dní od terapie.¹⁵

Temoporfín (mTHPC)

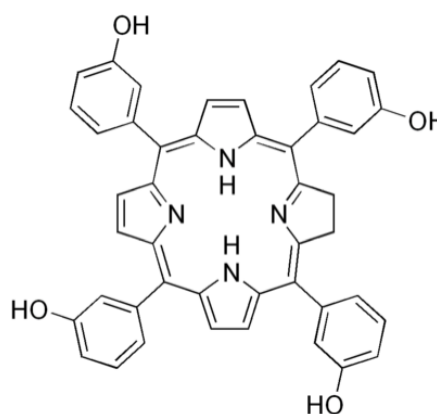
Obchodný názov: Foscan®

Výrobca: Biolitec Pharma Ltd.

Základ štruktúry: chlorín

Maximum absorpcie: 652 nm

Povolené použitie: EU



Obr. 6 Chemická štruktúra temoporfínu

Charakteristika: Temoporfín (Obr. 6) bol schválený na paliatívnu terapiu skvamózneho karcinómu hlavy a krku.¹⁶ Podáva sa intravenóznou injekciou a po 90-tich hodinách nastáva ožiarenie červeným svetlom po dobu 200 sekúnd. Vylučuje sa žlčou a má vysokú väzbovosť na plazmatické bielkoviny. Jedná sa o liečivo s nízkym klírensom a

jeho biologický polčas je až 65 hodín, kvôli čomu sú pacienti vystavený riziku fototoxicity až po dobu 15 dní.¹⁷ Väčšina pacientov je schopná voľne sa pohybovať na slnku až na 22. deň po podaní.¹⁸

Verteporfín

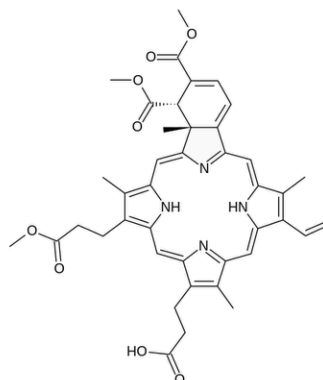
Obchodný názov: Visudyne®

Výrobca: Novartis Pharmaceuticals

Základ štruktúry: chlorín

Maximum absorpcie: 689 nm

Povolené použitie: celosvetovo



Obr. 7 Chemická štruktúra verteporfínu

Charakteristika: Verteporfín (Obr. 7) našiel svoje uplatnenie v oftamológii, pričom bol schválený na terapiu vekom podmienenej degenerácie makuly a na liečbu neovaskularizácie chorioidey v dôsledku patologickej myopie.¹⁹ Jedná sa o syntetický benzoporfyrínový derivát podávaný intravenózne. Takisto ako ostatné PS spôsobuje verteporfín fototoxicitu, kedy by sa pacient počas 48 hodín po terapii nemal vystavovať priamemu slnečnému žiareniu. V prípade relapsu ochorenia je možné podať liečbu verteporfínom až 4-krát za rok.^{20, 21}

Talaporfín (aspartyl chlorin)

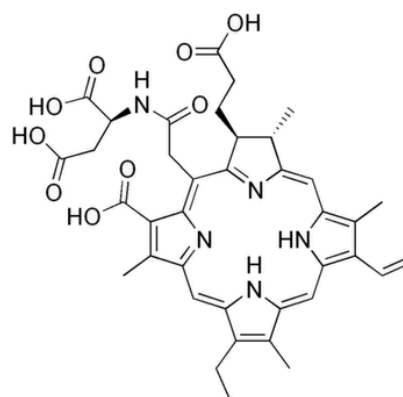
Obchodný názov: Laserphyrin®

Výrobca: Meiji Seika Pharma Co., Ltd

Základ štruktúry: chlorín

Maximum absorpcie: 664 - 667 nm

Povolené použitie: Japonsko



Obr. 8 Chemická štruktúra talaporfínu

Charakteristika: Talaporfín (Obr. 8) bol v Japonsku schválený na terapiu endobronchiálnej rakoviny v začiatočnom štádiu.²² Momentálne prebieha III štádium pilotných klinických štúdií pre použitie talaporfínu na terapiu hepatocelulárneho karcinómu v monoterapii a na terapiu metastázujúceho kolorektálneho karcinómu v kombináčnej terapii.²³

5. METODOLOGICKÁ ČASŤ

Pri syntéze cieľového bornanového AzaPc, sme sa stretli s formáciou neočakávaných bočných produktov, akýchsi hybridných štruktúr medzi azaftalocyanínmi a tetrapyrázínoporfyrínmi, nesúcimi alkylový reťazec namiesto jedného *meso* dusíka základného azaftalocyanínového skeletu. Príslušné molekuly potom nesú označenie tetrapyrázínotriazaporfyríny (TPTAP). V literatúre sa stretávame s prípravou štrukturálne podobných benzo analógou – tetrabenzotriazaporfyrínmi (TBTAP).^{24, 25, 26} V nasledujúcej stati som sa rozhodol spraviť stručnú rešerš na túto tému a s využitím dostupnej literatúry zistiť možné metódy prípravy takýchto molekúl.

5.1. Syntéza TBTAP

Najstaršou zmienkou o príprave podobných zlúčenín je práca P. A. Barretta et al. z 30-tych rokov 19. storočia, kedy boli pôsobením organokovových činidiel, ako napríklad metylmagnéziumbromidu, na ftalonitril v prostredí rozpúšťadiel s vysokou teplotou varu, ako napríklad chinolínu alebo cyklohexanolu, pripravené ftalocyaníny, majúce v základnom cykle začlenený jeden atóm uhlíka namiesto dusíka. Jedná sa o tetrabenzotriazaporfyríny (TBTAP) a výťažnosť reakcie, vedúcej k danému produktu je udávaná okolo 40 % (Schéma 1).²⁴

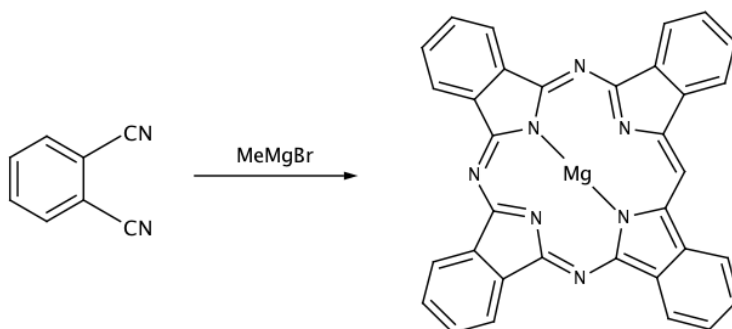


Schéma 1 Barretova syntéza základného TBTAP

Neskoršie práce ukázali, že Grignardové činidlá a iné uhlíkové nukleofily môžu byť pri vysokých teplotách použité na tvorbu uhlíka v základnom skelete, avšak tieto reakcie obvykle viedli k veľmi nízkym výťažkom (obvykle < 10 %). Zvlášť problematický bol fakt, že takéto syntézy obvykle viedli k formácií viacerých možných hybridných

analogov s rôznym počtom dusíkov v základnom cykle.²⁷

Ďalšou zmienkou o vzniku TBTAP v literatúre bola práca Cammidge et al., kedy pri cyklotetramerizácii 3,6-dihexylftalonitrilu za použitia lítia v bezvodom pentanole vznikal neočakávane daný bočný produkt vo výťažku 23 % (Schéma 2).²⁵

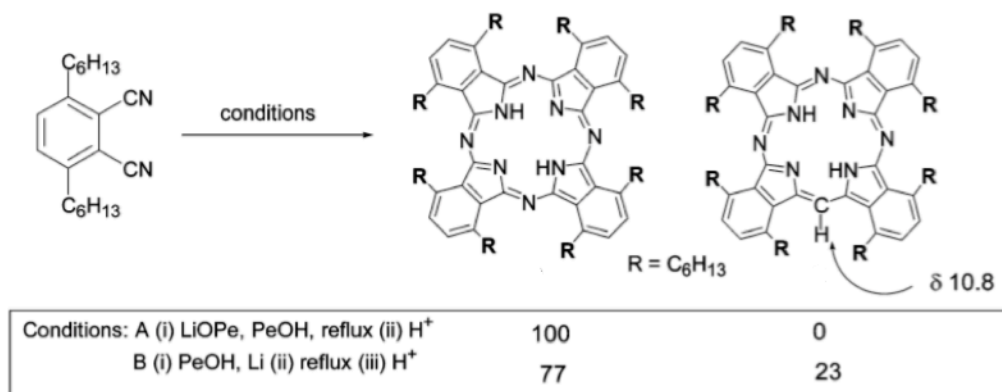


Schéma 2 Neočakávaná formácia TBTAP

Za účelom zistenia pôvodu inkorporovaného uhlíkového atómu vykonal Cammidge et al. experiment s použitím rádioznačeného oktanolu ako rozpúšťadla pri reakcii. Pri analýze bolo zistené, že pomer ¹³C/¹²C uhlíka v základom skelete je 87 : 13, z čoho sa dá usúdiť, že väčšina spojujúceho uhlíka pochádza z pozície 1 v oktanele (Schéma 3).²⁵

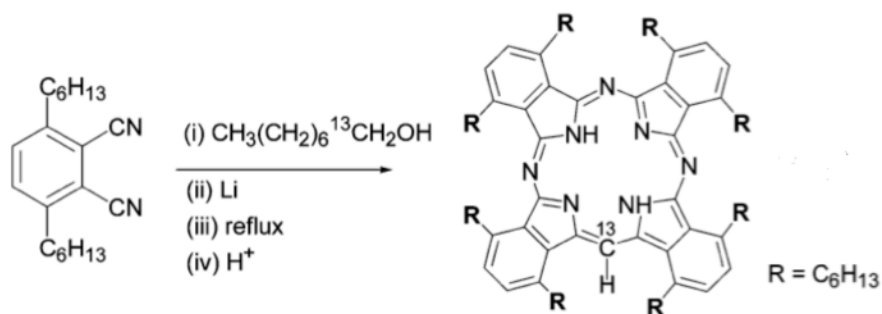


Schéma 3 Experiment s rádioznačeným oktanolom

5.2. Syntéza funkčných derivátov TBTAP

Iný prístup k syntéze TBTAP zvolil Díaz-Moscoso et al., kedy sa podarilo pripraviť funkčné deriváty TBTAP, nesúce 4-metoxyfenylovú skupinu napojenú na vytvorený

uhlík v základnom cykle. Jedná sa o kontrolovanú adíciu substituovaného aminoizoindolínu k ftalonitrilu v rozpúšťadle s vysokou teplotou varu diglykol metylétery (diglyme), pri ktorej je pripravený daný TBTAP v relatívne vysokom výťažku 40 % (Schéma 4).

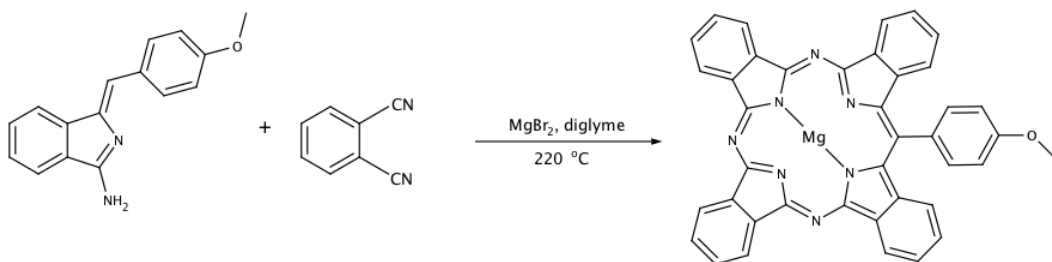


Schéma 4 Syntéza TBTAP pomocou substituovaného aminoizoindolínu

Autori ďalej demonštrovali jednoduchosť demetylácie postrannej funkčnej skupiny a následnú re-alkyláciu/re-acyláciu s takmer kvantitatívnymi výťažkami, čím pripravili pomerne jednoduchú cestu k syntéze funkčných derivátov TBTAP.²⁶

6. EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

Použité látky a rozpúšťadlá pre syntézy boli zakúpené od firiem Lach-Ner, Penta, Sigma-Aldrich a Acros. Teplota topenia zlúčenín bola meraná pomocou digitálneho prístroja ELECTROTHERMAL IA9200. Priebeh reakcií a čistota výsledných produktov boli sledované pomocou tenkovrstvovej chromatografie (TLC) na doskách Merck Kieselgel 60 F254, detekcie UV lampou prebiehali pri vlnovej dĺžke 254 nm a 366 nm. Čistenie produktov bolo zabezpečené stĺpcovou chromatografiou na stacionárnej fáze Merck Kieselgel 60 (0,040 - 0,063 nm). Mobilné fázy, použité pri jednotlivých reakciách, sú vypísané pre konkrétne reakcie nižšie. ^1H NMR a ^{13}C NMR spektrá boli merané na prístroji Varian Mercury Vx BB 300 a VNMR S500 na Katedre anorganickej a organickej chémie. Elementárna analýza bola zabezpečená pomocou prístroja Automatic Microanalyser EA1110CE. Spektrá UV/Vis boli merané pomocou prístroja Shimadzu UV-2600 spectrophotometer na Katedre farmaceutickej chémie a kontroly liečiv. Hmotnostná spektrometria (MALDI-TOF) bola prevedená na prístroji AB Sciex 4800 MALDI TOF/TOF spectrometer. Prístroj bol kalibrovaný externe päťbodovou kalibračnou metódou, pomocou Peptide Calibration Mix1 (LaserBioLabs, Sophia-Antipolis, France). Roztok analyzovanej vzorky v dichlormetáne (približne 10 μM , 1,5 μl) bol zmiešaný s matricou (*trans*-2-[3-(4-*tert*-butylfenyl)-2-metyl-2-propenyliden]-malonitril) v dichlormetáne, nanesený na doštičku a dôkladne vysušený.

6.1. Syntéza bornan[5,6-*b*]pyrazin-2,3-dikarbonitrilu (1)

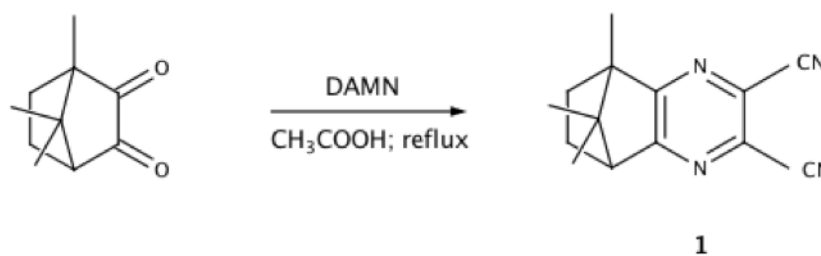


Schéma 5 Príprava prekursoru 1.

Do destilačnej banky bol navážený bornan-2,3-dion (5 g, 30 mmol) a diaminomaleonitril (6,5 g; 60 mmol); a bola pridaná kyselina octová (75 ml). Zmes bola zahrievaná na olejovej lázni pri teplote varu rozpúšťadla pod spätným chladičom po

dobu 1 h. Po ukončení reakcie, bola prebytočná kyselina octová odparená za zníženého tlaku, zmes bola premytá vodou a po vysušení bol produkt z pevnej látky extrahovaný acetónom. Produkt bol ďalej vyčistený pomocou stĺpcovej chromatografie v sústave toluén/chloroform 1:1. Bolo získaných 6,1 g bielej kryštalickej látky, čo odpovedá výt'azku 85 % (Schéma 5).

T.t. 200 - 201 °C. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 3,14 (d, $J = 4.5$ Hz, 1H), 2,45 – 2,26 (m, 1H), 2,22 – 2,02 (m, 1H), 1,35 (s, 3H), 1,41 – 1,19 (m, 2H), 1,10 (s, 3H), 0,59 (s, 3H). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 168,77; 166,79; 130,75; 130,49; 113,83; 113,81; 56,59; 55,03; 53,23; 30,82; 23,84; 19,97; 18,34; 9,33. IČ (ATR) 2960, 2937, 2875, 2235, 1480, 1444, 1396, 1376, 1341, 1273, 1136. CHN analýza, vypočítané pre $\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{N}$: C, 70,57; H, 5,92; N, 23,51, nájdené: C, 70,75; H, 6,16; N, 23,57.

6.2. Cyklotetramerizácia bornan[5,6-*b*]pyrazin-2,3-dikarbonitrilu

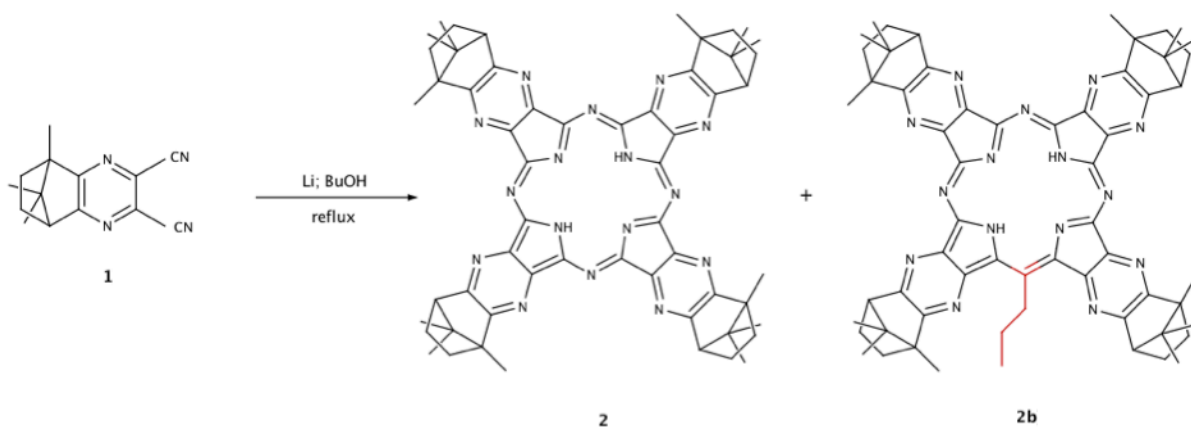


Schéma 6 Cyklotetramerizácia prekursoru **1**

Látka **1** (119 mg; 0,5 mmol) bola navážená do destilačnej banky a rozpustená v bezvodom butanole (3 ml). Zmes bola zahrievaná na olejovej lázni pod spätným chladičom pri teplote 137 °C a následne bolo do zmesi zhora, cez chladič, vhozené lítium (24 mg; 3,5 mmol). Zmes okamžite zozelenala. Nasledovalo zahrievanie pri bode varu rozpúšťadla pod spätným chladičom po dobu 3 h. Po vychladnutí bola reakčná zmes vyliata do zmesi metanol/voda/kyselina octová 10:10:1. Vyzrážaný produkt bol odfiltrovaný, premytý vodou a vysušený. Produkt bol ďalej vyčistený pomocou stĺpcovej chromatografie v sústave chloroform/ethyl-acetát 10:1. Pri postupe bol v čele separovanej zmesi oddelený zelený vedľajší produkt od hlavného modrého produktu. Bolo získaných 89 mg modrého prášku (**2**), čo zodpovedá výt'azku 75 % a 4,2 mg zeleného prášku (**2b**), čo zodpovedá výt'azku 3,5 % (Schéma 6).

Dáta pre látku **2**: ^1H NMR (300 MHz, pyridín- d_5) δ 3,98 (s, 4H), 3,07 – 2,72 (m, 4H), 2,73 – 2,45 (m, 4H), 2,39 – 1,87 (m, 20H), 1,75 – 0,83 (m, 24H). ^{13}C NMR (75 MHz, pyridín- d_5) δ 168,81; 166,97; 147,78; 147,07; 57,07; 55,39; 54,57; 32,47; 25,29; 20,87; 19,12; 11,14; IČ (ATR) 3296, 2961, 2932, 2878, 1637, 1506, 1476, 1456, 1392, 1372, 1280. CHN analýza, vypočítané pre $\text{C}_{56}\text{H}_{58}\text{N}_{16} + 2 \text{H}_2\text{O}$: C, 67,86; H, 6,30; N, 22,61, nájdené: C, 67,33; H, 6,72; N, 22,34. MS (MALDI-TOF) m/z 954,3 $[\text{M}]^+$, 977,3 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 993,3 $[\text{M}+\text{K}]^+$.

Dáta pre látku **2b**: NMR – veľmi komplexný charakter (viz Obr. X nižšie), MS (MALDI-TOF) m/z 953,5 $[M-C_3H_6]^+$, 967,5 $[M-C_2H_4]^+$, 981,5 $[M-CH_2]^+$, 995,5 $[M]^+$, 1018,5 $[M+Na]^+$, 1034,5 $[M+K]^+$.

6.3. Syntéza tetrabornantetrapyrazinoporfyrazinátového zinočnatého komplexu (**3**)

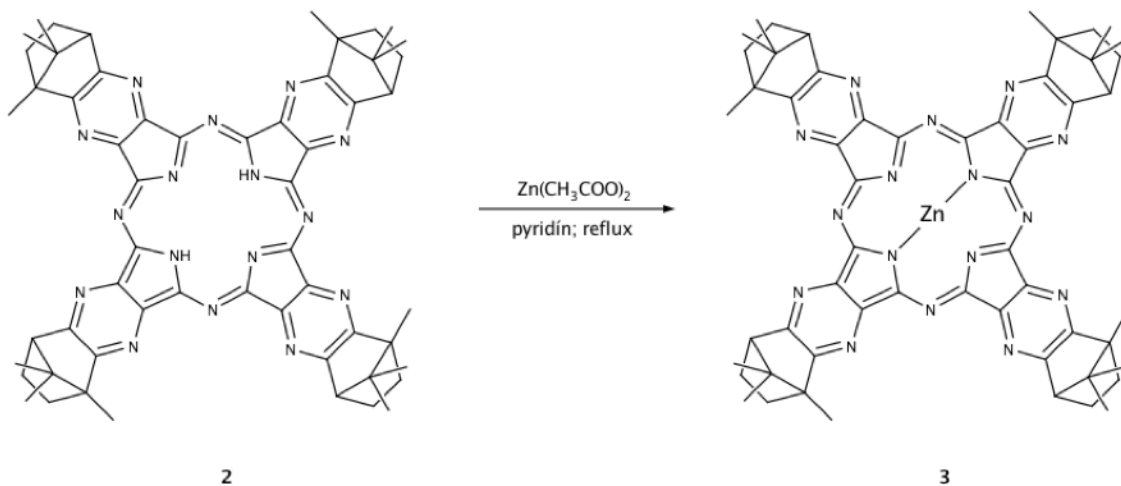


Schéma 7 Príprava zinočnatého komplexu **3**.

Bezkovový derivát **2** (100 mg; 0,1 mmol) bol rozpustený v pyridíne (10 ml) a bol pridaný octan zinočnatý (190 mg; 1 mmol). Zmes bola pod spätným chladičom zahrievaná na bod varu po dobu 30 min. Pyridín bol po vychladnutí odparený, bola pridaná voda a zelená zrazenina bola odfiltrovaná. Zelená zrazenina na filtri bola dôkladne premývaná vodou a po vysušení a rozpustení v chloroforme analyzovaná pomocou tenkovrstvovej chromatografie. Produkt bol ďalej vyčistený pomocou stĺpcovej chromatografie v sústave chloroform/etyl-acetát 5:1. Bolo získaných 71 mg zeleného prášku, čo zodpovedá výťažku 70 % (Schéma 7).

1H NMR (300 MHz, pyridín- d_5) δ 3,40 – 3,30 (m, 4H), 2,27 – 2,16 (m, 4H), 2,06 – 1,95 (m, 4H), 1,57 (s, 12H), 1,43 – 1,32 (m, 8H), 0,96 (s, 12H), 0,61 – 0,46 (m, 12H). ^{13}C NMR (75 MHz, pyridín- d_5) δ 167,18; 165,47; 165,42; 165,33; 151,27; 151,05; 150,83; 147,60; 147,50; 147,35; 56,07; 54,24; 53,22; 53,17; 31,23; 24,06; 19,68; 18,30; 9,98; 9,86. IČ (ATR) 2962, 2873, 1653, 1477, 1392, 1371, 1259. CHN analýza, vypočítané

pre $C_{56}H_{56}N_{16}Zn + 3 H_2O$: C, 62,71; H, 5,83; N, 20,89, nájdené: C, 62,76; H, 6,28; N, 20,50. MS (MALDI-TOF) m/z 1016,4 $[M]^+$

6.4. Syntéza tetrabornantetrapyrazinoporfyrazináto horečnatého komplexu (4)

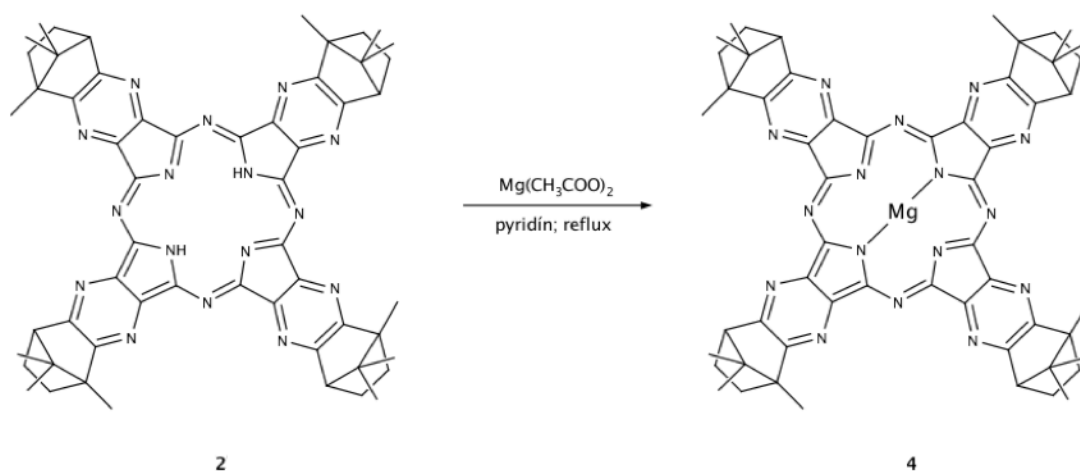


Schéma 8 Príprava horečnatého komplexu **4**

Bezkovový derivát **2** (150 mg; 0,16 mmol) bol rozpustený v pyridíne (10 ml) a bol pridaný octan horečnatý (223 mg; 1,57 mmol). Zmes bola pod spätným chladičom zahrievaná na bod varu po dobu 2 h. Produkt bol ďalej zahustený na rotačnej vákuovej odparke a bola pridaná voda. Vyžrážaný komplex bol na filtri premývaný vodou a potom vysušený. Produkt bol ďalej vyčistený pomocou stĺpcovej chromatografie v sústave chloroform/etyl-acetát/pyridín 5:1:0,1, a potom urýchlený sústavou chloroform/tetrahydrofurán/pyridín 5:1:0,1. Bolo získaných 40 mg pevnej modrej látky **4**, čo zodpovedá výťažku 25 % (Schéma 8).

6.5 Cyklizácia bornan[5,6-*b*]pyrazin-2,3-dikarbonitrilu v butanole pomocou Li v rôznom nadbytku

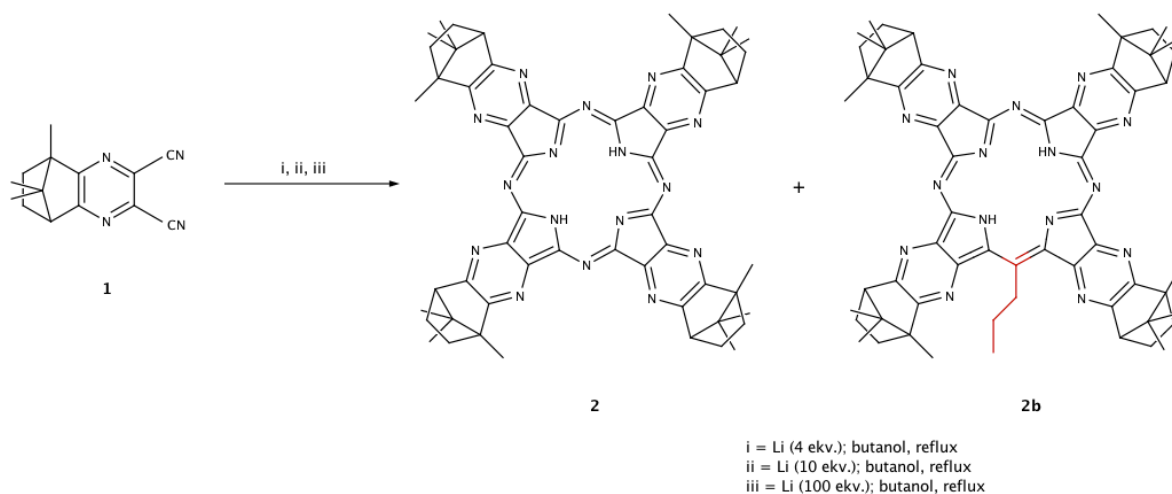


Schéma 9 Cyklotetramerizácia látky **1** s rôznym nadbytkom lítia

Do troch destilačných baniek bolo navážené rovnaké množstvo dikarbonitrilu **1** (47,6 mg; 0,2 mmol) a do každej z nich, bolo pridaných asi 2 ml bezvodého butanolu. Každá reakčná zmes bola privedená na bod varu rozpúšťadla, a cez chladič bolo prihodené rôzne množstvo lítia. V prvom prípade 4-násobný stechiometrický prebytok (6 mg; 0,86 mmol), v druhom prípade 10-násobný (14 mg; 2 mmol) a v treťom 100-násobný prebytok lítia (140 mg; 20 mmol). Všetky zmesi boli zahrievané na bod varu rozpúšťadla po dobu 3,5 h. Po vychladnutí bola každá reakcia spracovaná rovnako, vyliatím do zmesi voda/metanol/kyselina octová 5:5:1. Produkty boli premyté na filtri a vysušené (Schéma 9). Následne bola prevedená analýza pomocou tenkovrstvovej chromatografie. Výsledky reakcie sú diskutované v časti Diskusia.

6.4. Cyklizácia bornan[5,6-b]pyrazin-2,3-dikarbonitrilu pomocou Li v oktanole

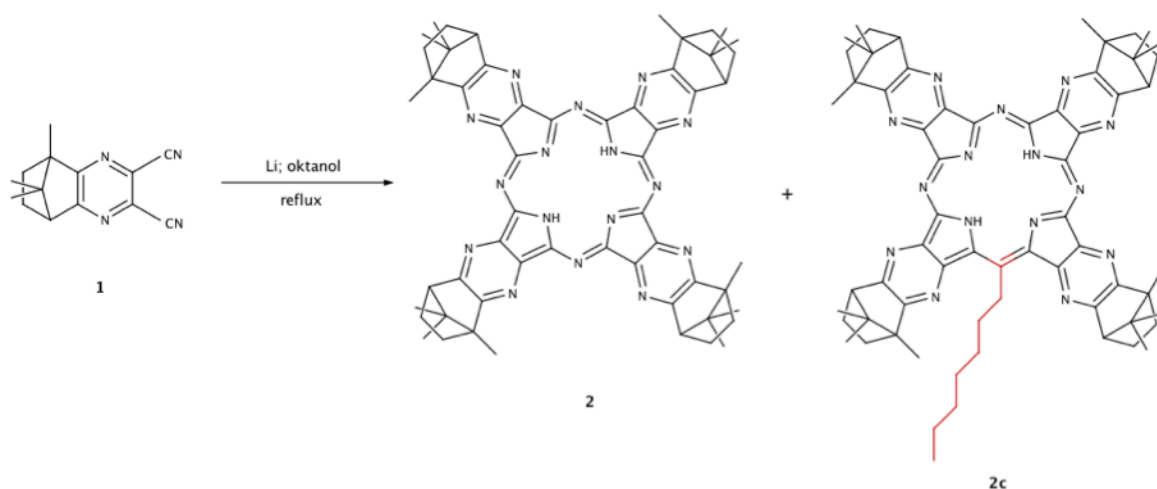


Schéma 10 Cyklotetramerizácia látky **1** v prostredí oktanolu

Látka **1** (1428 mg; 6 mmol) bola navážená do destilačnej banky a rozpustená v čerstvo predestilovanom bezvodom oktanole (30 ml). Reakčná zmes bola privedená k varu, a cez chladič bolo vhodené lítium (420 mg; 61 mmol). Reakcia prebiehala pod spätným chladičom pri teplote varu rozpúšťadla po dobu 4 h. Po skončení reakcie bol oktanol čiastočne odparený na rotačnej vákuovej odparke, a produkt vyliaty do zmesi metanol/voda/kyselina octová 10:5:1. Produkt bol odfiltrovaný a vysušený. Ďalej bol produkt čistený pomocou stĺpcovej chromatografie v sústave chloroform/etyl-acetát 10:1. Zo zmesi bol izolovaný zelený produkt a podrobený ďalšej analýze (Schéma 10).

NMR – veľmi komplexný charakter (viz Obr. 17 nižšie), MS (MALDI-TOF) m/z 995,6 $[M-C_4H_8]^+$, 1009,6 $[M-C_3H_6]^+$, 1023,6 $[M-C_2H_4]^+$, 1037,6 $[M-CH_2]^+$, 1051,6 $[M]^+$.

6.4. Cyklizácia bornan[5,6-b]pyrazin-2,3-dikarbonitrilu pomocou Mg v butanole

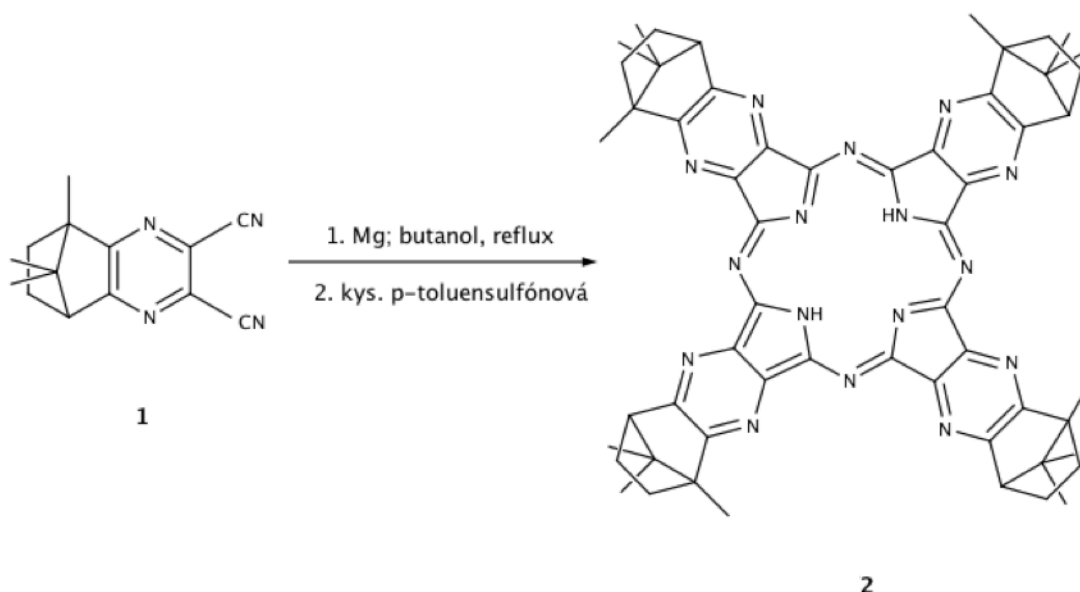
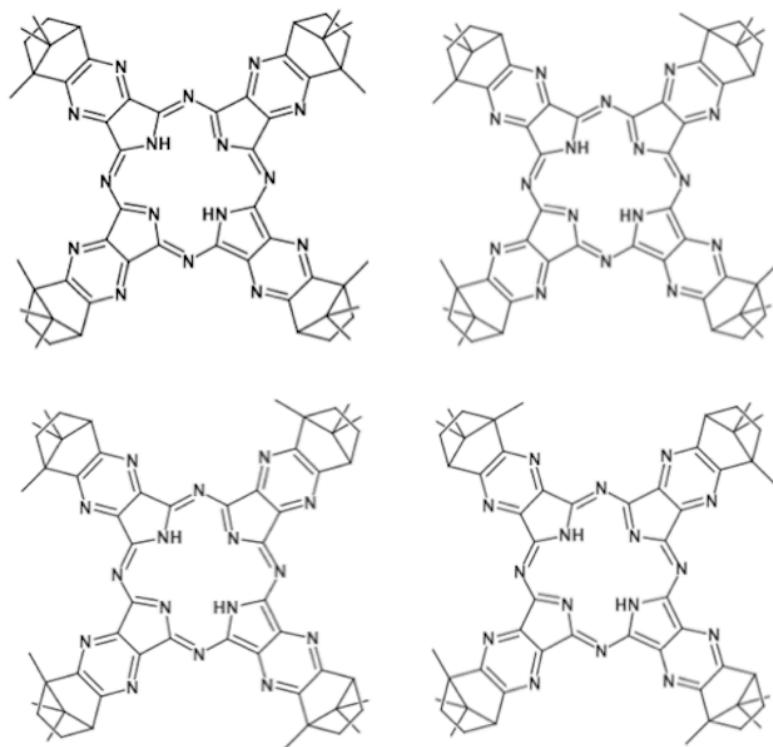


Schéma 11 Cyklotetramerizácia látky **1** s použitím Mg ako iniciátora reakcie

Do destilačnej banky bol k čerstvo predestilovanému butanolu (10 ml) pridaný horčík (170 mg; 7 mmol) a malé zrnko jódu. Banka bola opatrená chladičom a zmes bola zahriata na bod varu. Reakcia prebiehala pri teplote varu rozpúšťadla pod spätným chladičom opatreným sušiacou rúrkou po dobu asi 3 h, pokiaľ nezreagoval všetok horčík na butanolát horečnatý. Do zmesi bol ďalej pridaný dikarbonitril **1** (238 mg; 1 mmol) a reakcia bola ponechaná na refluxe po dobu 24 h. Po ukončení bol produkt preliaty do zmesi metanol/voda/kyselina octová 10:10:1 (150 ml). Vyzrážaná látka bola odfiltrovaná, rozpustená v tetrahydrofuráne a podrobená reakcii s kyselinou *p*-toluensulfónovou (437 mg; 2,54 mmol) kvôli prevedeniu horečnatého komplexu na bezkovový derivát. Reakcia prebiehala pri laboratórnej teplote za stáleho miešania v destilačnej banke po dobu cca 1 h. Po ukončení reakcie bolo rozpúšťadlo odparené, bola pridaná voda a vyzrážaný produkt bol na filtri premytý vodou, a po vysušení, vyčistený pomocou stĺpcovej chromatografie v sústave chloroform/tetrahydrofurán/pyridín 5:1:0,1. Bolo získaných 189 mg modrej pevnej látky **2**, čo zodpovedá výt'azku 79 % (Schéma 11).

7. DISKUSIA

Cieľom tejto práce bolo vytvoriť sériu látok, zo skupiny azaftalocyanínov, ktoré by svojimi objemnými substituentami zabraňovali agregácii dvoch, alebo viacerých molekúl. Pri agregácii strácajú azfatlocyaníny ich aplikačný potenciál s ohľadom na ich fotofyzikálne vlastnosti.^{28, 29} Ako objemný lipofilný substituent bol zvolený bornan, ktorý by svojou priestorovo objemnou uhlíkatou kostrou dokázal vzdialiť stredové centrá a predísť agregácii molekúl. Bezkovový derivát bol získaný dvojstupňovou syntézou s relatívne vysokými výťažkami. Ďalej boli pripravené zinočnatý a horečnatý komplex bornanového AzaPc. Vzhľadom nato, že každý nasyntetizovaný bornanový derivát mohol vzniknúť v 4 rôznych polohových izoméroch, za čistú látku sme považovali zmes všetkých izomérov, ktorá bola veľmi ťažko separovateľná (Obr. 9).



Obr. 9 Polohové izoméry bornanového AzaPc

Tieto izoméry boli modrej farby a mali podobné retenčné faktory. Pri scale-up cyklizácii bornanového prekursoru sa v čele separovaného produktu objavovala oddeliteľná, sýto zelená škrvna, na rozdiel od modrého bornanového AzaPc. Takýto

posun v absorpčnom spektre, spojený so zmenou farby syntetizovanej látky, bol nečakaný, vzhľadom na farbu bornanových stereoizomérov, a mohol by súvisieť s narušením 4-dusíkatého porfyrázínového skeletu. Po rozhodnutí sa daný bočný produkt charakterizovať sme v literatúre našli prípady, kedy pri cyklizácii analogických ftalonitrilou v butanole, daný centrálny skelet obsahoval, namiesto typického 4-dusíkatého porfyrázínu, 3-dusíkatý skelet, tzv. triazaporfyrin.^{23 - 27} Po vyhodnotení analýz bolo usúdené, že daný vedľajší produkt obsahuje namiesto jedného dusíka 3-uhlíkatý reťazec, ktorý s najväčšou pravdepodobnosťou pochádza z butanolu použitého pri reakcii (jeden uhlík z butanolu je súčasťou triazaporfyrinového jadra). Na potvrdenie tejto hypotézy bola cyklizácia prevedená v oktanole, kedy bol nasyntetizovaný podobný zelený bočný produkt, neskôr charakterizovaný ako triazaporfyrin s heptylovým reťazcom. Aby sme aspoň čiastočne objasnili vplyv reakčných podmienok, bola cyklizácia prevedená v rôznych nadbytkoch lítia a s iným iniciátorom reakcie (horčík), výsledkom čoho bol potvrdený vzťah medzi vstupnou koncentráciou lítia a množstvom vzniknutého bočného produktu, kedy pri najnižšej koncentrácii lítia (4 ekvivalenty) zelený produkt nevznikal vôbec. Detaily k jednotlivým krokom syntézy a charakterizácii sú diskutované v nasledujúcich kapitolách.

7.1 Syntéza

Bornanový derivát AzaPc **2** bol nasynťetizovaný dvojstupňovou reakciou. Na začiatku bol kondenzačnou reakciou medzi bornan-2,3-dionom a diaminomaleonitrilom (DAMN) pripravený pyrazin **1**, ktorý bol následne podrobený cyklizácii, s výsledkom cieľového bornanového derivátu **2**. Výťažky oboch reakcií boli pomerne dobré, ako aj pri príprave prekursoru (85 %), tak aj pri cyklizácii (75 %). Ako vedľajší produkt z cyklizácie bola izolovaná zelená látka **2b** vo výťažku 3,5 % (Schéma 12).

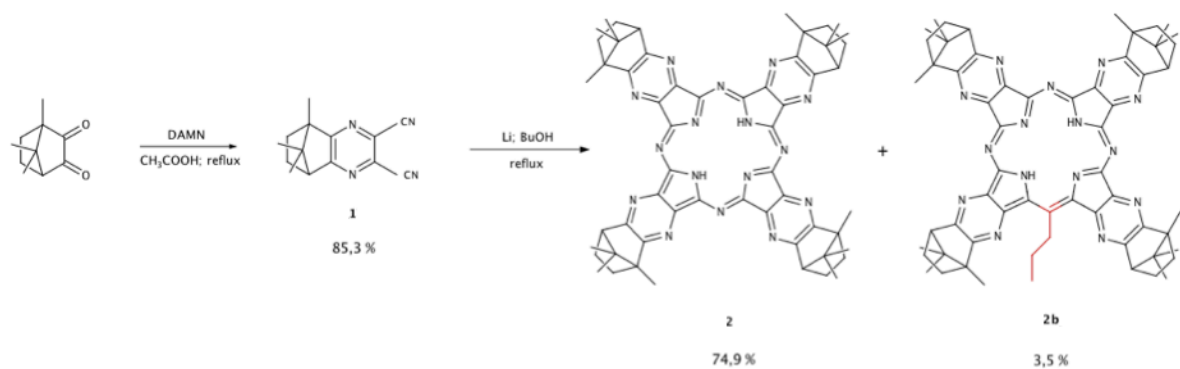
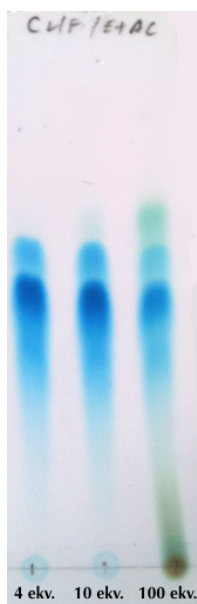


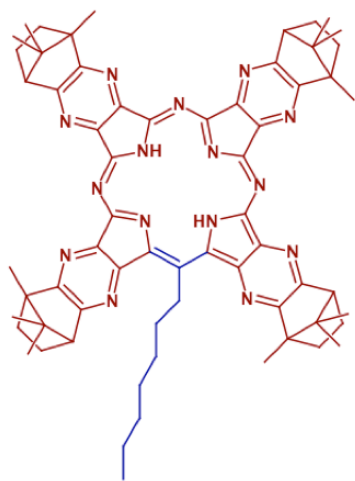
Schéma 12 Príprava bornanového AzaPc

Pri snahe zistiť podmienky vzniku bočného produktu sme previedli zmeny reakčných podmienok. Už pri prvej scale-up cyklizácii, kedy bolo pripravené väčšie množstvo bornanového AzaPc (cca 3 g) sme si všimli neobvyklú zelenú škvrnu na TLC, ktorá nekorešpondovala so syntetizovaným AzaPc. Pri reakcii bolo použitých cca 600 mg kovového lítia, preto sme sa rozhodli zistiť, či má množstvo lítia, použitého pri reakcii, vplyv na tvorbu bočného produktu. Boli prevedené 3 reakcie s rôznym nadbytkom lítia. V prvej reakcii bol použitý 4-násobný stechiometrický nadbytok lítia, v druhom 10-násobný a v treťom prípade 100-násobný nadbytok. Týmto jednoduchým experimentom sme jasne demonštrovali úlohu množstva použitého lítia pri vzniku bočného produktu, kedy na TLC jasne vidieť, že v prvom prípade zelená škvrna nevznikala, v druhom prípade vznikala v minimálnom množstve a v treťom prípade už je jasne vidieť vznik zeleného bočného produktu (Obr. 10).



Obr. 10 TLC analýza cyklizácie v rôznom nadbytku lítia

Pre overenie, či alkylový reťazec, pripojený v bočnom produkte, pochádza z rozpúšťadla, bola prevedená reakcia s použitím oktanolu. V reakcii bol použitý 10-



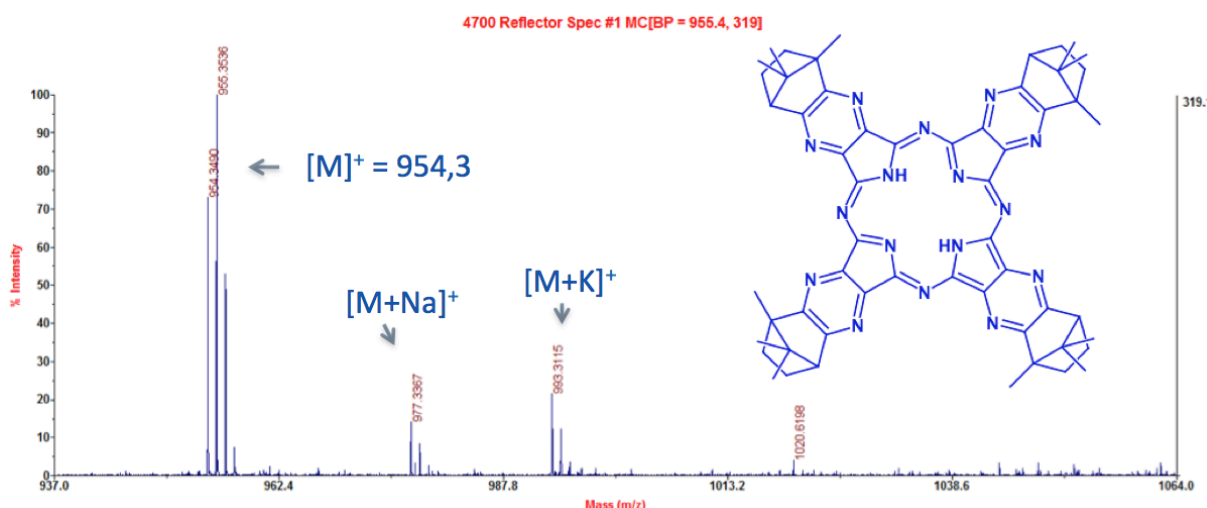
násobný stechiometrický nadbytok lítia, a ako rozpúšťadlo bol použitý oktanol. Pri tejto reakcii taktiež vznikal zelený bočný produkt, ktorý sme následne izolovali a analyzovali. Molekulárna hmotnosť bočného produktu korešpondovala s predpokladanou štruktúrou, kedy bol pri reakcii do molekuly pripojený heptylový reťazec, čím sme potvrdili teóriu, že daný reťazec vzniká z rozpúšťadla, použitého pri reakcii (Obr. 11).

Obr. 11 Predpokladaná štruktúra heptylového tetrapyrazinotriazaporfyrinu.

Pri snahe zistiť, či bočný produkt môže vznikáť aj s použitím iného kovu, ako iniciátora cyklizácie bol pri ďalšej reakcii použitý namiesto lítia horčík v 7-násobnom prebytku v prostredí butanolu. Vzhľadom k tomu, že v tomto prípade vzniká horečnatý komplex, bol tento komplex ihneď prevedený na bezkovový derivát reakciou s *p*-toluensulfonovou kyselinou. Pri analýze TLC produktu sme pri tejto reakcii vznik bočného produktu nepozorovali, čo ďalej potvrdilo kľúčovú úlohu lítia pri formácii triazaporfyrinového cyklu.

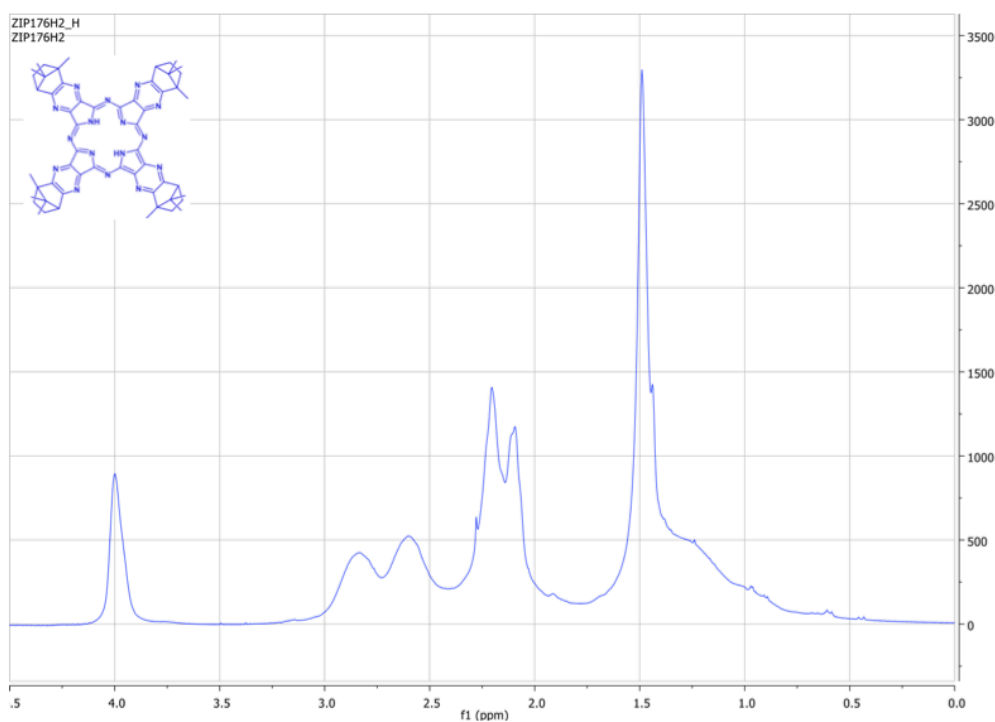
7.2 Charakterizácia

Prevedením MS sme potvrdili predpokladanú molekulovú hmotnosť syntetizovaného AzaPc (Obr. 12).



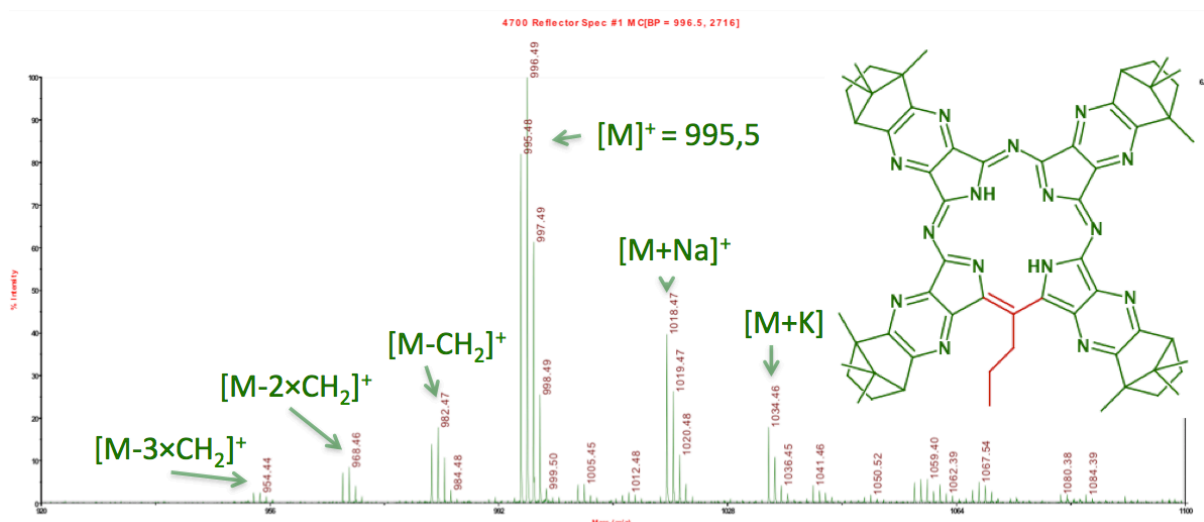
Obr. 12 MS spektrum bezkovového derivátu

Aj napriek tomu, že kvalita NMR spektra nie je najlepšia (z dovodu agregácie a prítomnosti zmesi izomerou), dokážeme rozoznať jednotlivé vodíky (Obr. 13).



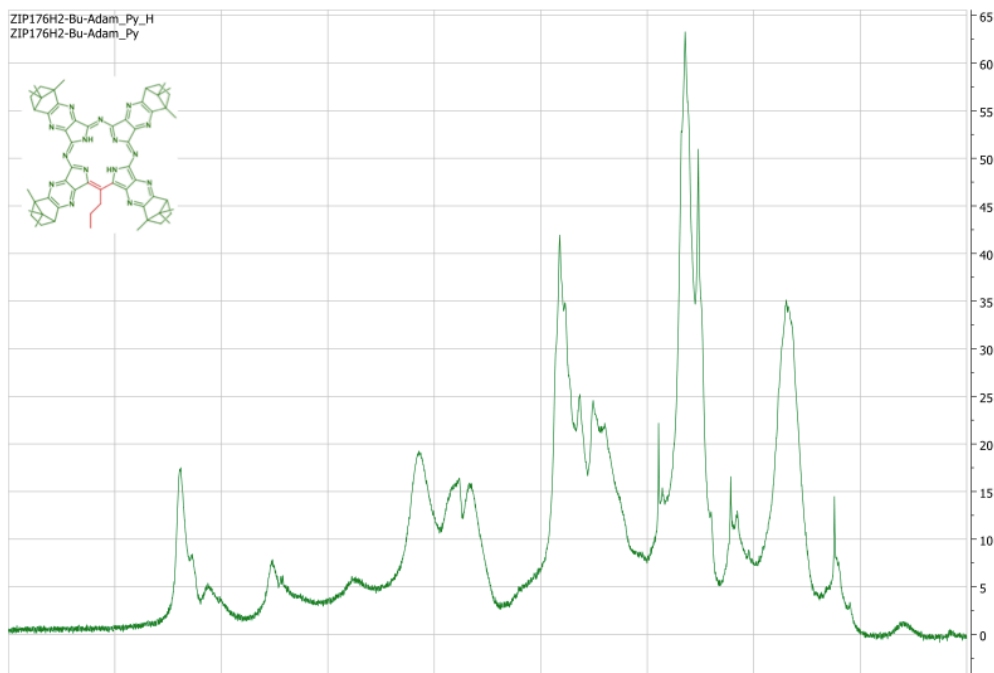
Obr. 13 NMR spektrum bezkovového derivátu 2.

Pri analýze bočného produktu **2b** bola pozorovaná vyššia molekulová hmotnosť, ako hmotnosť syntetizovanej molekuly. Taktiež táto hmotnosť bola nepárne číslo, čo by podľa dusíkového pravidla mohlo znamenať zmenu v počte dusíkov v molekule oproti látke **2**. Boli zaznamenané fragmenty odštiepujúcej sa metylénovej skupiny, ktoré neboli prítomné v spektre AzaPc **1**. Počet fragmentov bol tri, čo odpovedá prítomnosti propylového reťazca (Obr. 14).



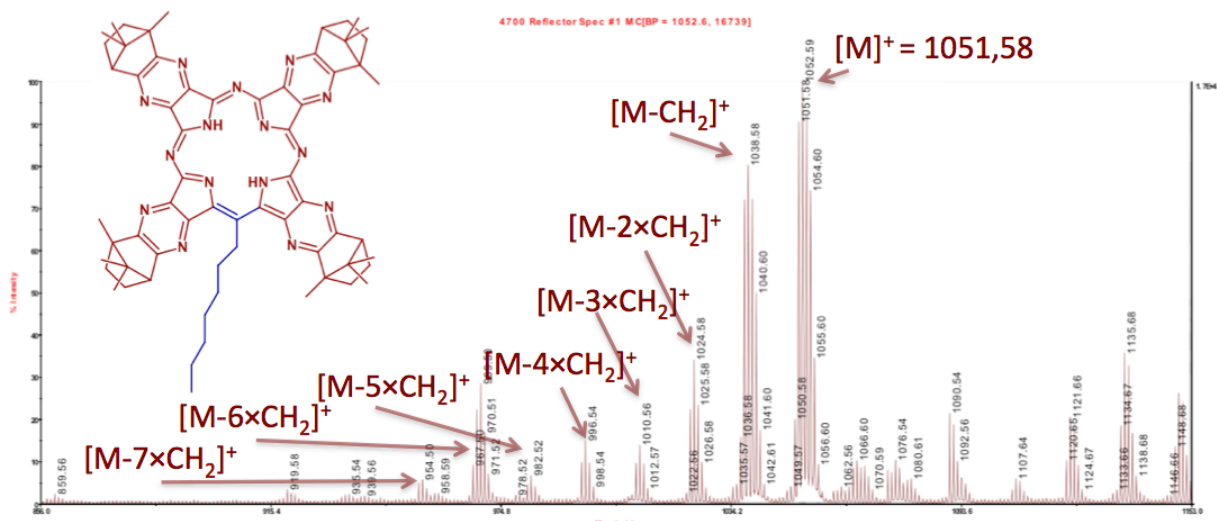
Obr. 14 MS spektrum látky **2b**

NMR spektrum bočného produktu bolo omnoho zložitejšie, ako spektrum látky **1**, čo indikuje zmenu symetrie molekuly. Metylénový vodík pri 4 ppm je rozdelený na niekoľko signálov okolo 3,6 ppm, čo tiež potvrdzuje zmenu symetrie molekuly v súlade s navrhovanou štruktúrou (Obr. 15).



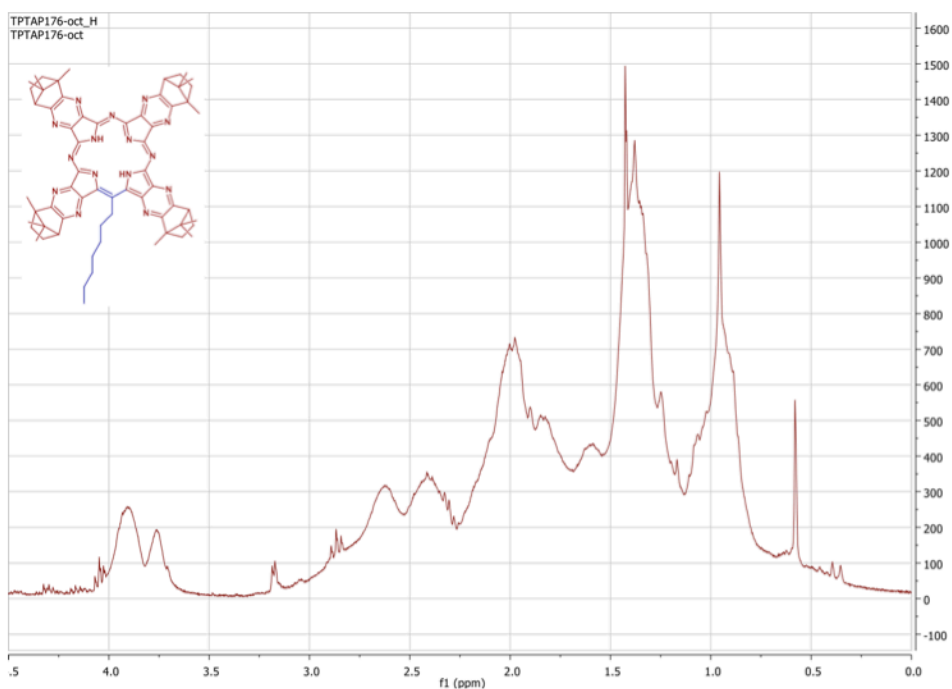
Obr. 15 NMR spektrum látky **2b**

Hmotnostná analýza heptylového derivátu **2c** potvrdila predpokladanú štruktúru. Taktiež sme pozorovali 7 fragmentov odštiepujúcej sa metylénovej skupiny z heptylového reťazca pripojeného na triazaporfyrinový cyklus (Obr. 16).



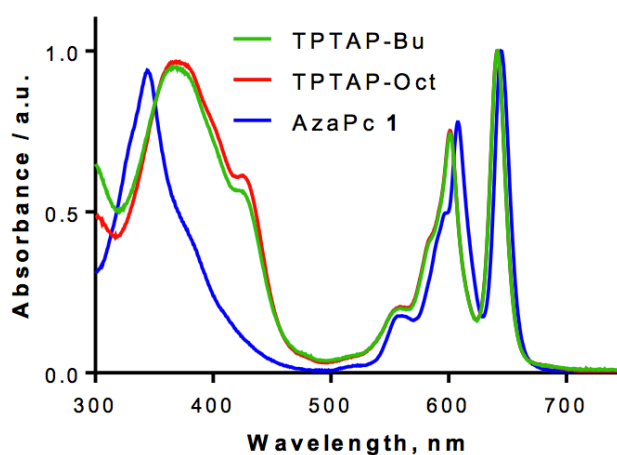
Obr. 16 MS spektrum látky **2c**

NMR spektrum látky **2c** je tiež pomerne neprehľadné, ale aj napriek tomu môžeme opäť pozorovať rozštiepenie metylénového vodíka okolo 4 ppm (Obr. 17).



Obr. 17 NMR spektrum látky **2c**

Po porovnaní absorpčných spektier nasyntetizovanej látky a bočných produktov sme pozorovali hypsochromný posun Q-pásu bočných produktov **2b** a **2c** oproti povodnej látke **2**. Spektra látok **2b** a **2c** sú takmer identické, čo je vysvetlené podobnosťou štruktúr a faktom, že dĺžka alkylylového reťazca nemá na absorpčné spektrum významný vplyv (Graf 1).



Graf 1 Porovnanie absorpčných spektier skúmaných látok

8. ZÁVER

V tejto práci som sa zaoberal syntézou bornanových derivátou azaftalocyanínov. Cieľom bolo vytvoriť sériu komplexov s rôznymi kovmi, ktoré by objemnými postrannými reťazcami bránili agregácií, avšak pri syntéze vznikol zaujímavý bočný produkt, ktorý sme sa rozhodli preskúmať. Popri bezkovovom, horečnatom a zinočnatom bornanovom deriváte, boli nasyntetizované, izolované a analyzované neočakávané 2 rôzne bočné produkty, s naviazaným rôzne dlhým alkylovým reťazcom, namiesto jedného centrálného dusíka. Hypotetické využitie daných bočných produktov by mohlo spočívať vo vytvorení funkčných derivátov, kedy by na daný alkylový reťazec mohla byť pripojená biologicky aktívna skupina, pomocou ktorej by sa molekula vo zvýšenej miere vychytávala v nádorovom tkanive. Otázka do akej miery by nádorová bunka bola schopná reagovať na postranný reťazec, je predmetom ďalšieho výskumu.

9. POUŽITÁ LITERATÚRA

1. HENDERSON, B., DOUGHERTY, T.J. How does photodynamic therapy work? *Photochem. Photobiol.*, 1992, 55: 145-157.
2. AGOSTINIS, P., et al. Photodynamic therapy of cancer: An update. *CA Cancer J. Clin.*, 2011, 61(4): 250 - 281.
3. DOLMANS, D., FUKUMURA, D., JAIN, R. Photodynamic therapy for Cancer. *Nat. Rev. Cancer*, 2003, 3: 380 - 387.
4. HAMBLIN, M. R., HUANG, Y.. Handbook of photomedicine. Boca Raton : CRC Press, 2014. s. 37 - 38. ISBN 978-1-4398-8469-0
5. LIPSON, R. L., EDWARD, M. D., BALDES, J. The Photodynamic Properties of a Particular Hematoporphyrin Derivative. *Arch. Dermatol.*, 1960, 82(4): 508 - 516.
6. HAMBLIN, M. R., HUANG, Y. Handbook of photomedicine. Boca Raton : CRC Press, 2014. s. 40 - 41. ISBN 978-1-4398-8469-0
7. HUANG, Z. A Review of Progress in Clinical Photodynamic Therapy. *Technol. Cancer Res. Treat.*, 2005, 4(3): 283 - 293.
8. WACHOWSKA, M., et al. Aminolevulinic Acid (ALA) as a Prodrug in Photodynamic Therapy of Cancer. *Molecules*, 2011, 16: 4140 - 4164.
9. ORMOND, A. B., FREEMAN, H. S. Dye Sensitizers for Photodynamic Therapy. *Materials*, 2013, 6: 817 - 840.
10. MCBRIDE, G., et al. Studies Expand Potential Uses of Photodynamic Therapy. *J. Natl. Cancer Inst.*, 2002, 94(23): 1740 - 1742.
11. DOUGHERTY, T. J., et al. Cutaneous phototoxic occurrences in patients receiving Photofrin®. *Lasers Surg. Med.*, 1990, 10(5): 485 - 488.
12. KREIGMAIR, M., et al. Fluorescence Photodetection of Neoplastic Urothelial Lesions Following Installation of 5-Aminolevulinic Acid. *Urology*, 1994, 44: 836 - 841.
13. CLARK, C. et al. Topical 5-Aminolevulinic Acid Photodynamic Therapy for Cutaneous Lesions; Outcome and Comparison of Light Sources. *Photodermatol. Photoimmunol.*, 2003, 19: 134 - 141.
14. RHODES, L. E., et al. Photodynamic Therapy Using Topical Methyl Aminolevulinate vs Surgery for Nodular Basal Cell Carcinoma: Results of a Multicenter Randomized Prospective Trial. *Arch. Dermatol.*, 2004, 140(1): 17 - 23.

-
15. PARISER, D. M. Photodynamic therapy with topical methyl aminolevulinate for actinic keratosis: Results of a prospective randomized multicenter trial. *J. Am. Acad. Dermatol.*, 2003, 48(2): 227 - 232.
 16. SCHULLER, D. E., et al. Photodynamic Therapy in Head and Neck Cancer. *Arch. Otolaryngol.*, 1985, 111: 351 - 355.
 17. CAI, H., WANG, Q., LUO, J., LIM C. K. Study of temoporfin metabolism by HPLC and electrospray mass spectrometry. *Biomed. Chromatogr.*, 1999, 13(5): 354 - 359.
 18. Summary of Product Characteristics (SPC) - Foscan® 4 mg/ml, inj 1x5ml; Biolitec Pharma Ltd., electronic Medicines Compendium, October 2006.
 19. BLINDER, K. J., et al. Verteporfin therapy of subfoveal choroidal neovascularization in pathologic myopia: 2-year results of a randomized clinical trial. *Ophthalmology*, 2003, 110(4): 667 - 673.
 20. GIBAUT F., et al. Non-Photoinduced Biological Properties of Verteporfin. *Curr. Med. Chem.*, 2016, 23(11): 1171 - 1184.
 21. Summary of Product Characteristics (SPC) - Visudyne® 15 mg, powder for solution for infusion; Novartis, electronic Medicines Compendium, October 2012.
 22. USUDA, J., et al. Photodynamic therapy for lung cancers based on novel photodynamic diagnosis using talaporfin sodium (NPe6) and autofluorescence bronchoscopy. *Lung Cancer*, 2007, 58(3): 317 - 323.
 23. WANG, S., BROMLEY, E., XU, L., CHEN., J.C., KELTNER, L. Talaporfin sodium. *Expert Opin. Pharmacother.*, 2010, 11(1): 133 - 140.
 24. BARRETT, P. A., et. al. Phthalocyanines and Related Compounds. Part XV. Tetrabenzotriazaporphin: its Preparation from Phthalonitrile and a Proof of its Structure. *J. Chem. Soc.*, 1939, 1809 - 1820.
 25. CAMMIDGE, A. N., et. al. A remarkable side-product from the synthesis of an ocaalkylphthalocyanine: formation of a tetrabenzotriazaporphyrin. *Chem. Commun.*, 2005, 930 - 932.
 26. DÍAZ-MOSCOSO, A., et al. Synthesis of meso-Substitued Tetrabenzotriazaporphyrins: Easy Access to Hybrid Macrocycles. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2013, 52: 10784 - 10787.

-
27. KALASHNIKOV, V. V., TOMILOVA, L.G. New Synthetic Method for Zinc Complexes of 20-Aryltetrabenzo[5,10,15]-triazaporphyrin. *Macroheterocycles*, 2011, 4: 209 – 210.
28. NYOKONG, T. Effects of substituents on the photochemical and photophysical properties of main group metal phthalocyanines. *Coord. Chem. Rev.*, 2007, 251(13-14): 1707 - 1722.
29. GEORGE, R. D., et al. The Alpha Substitution Effect on Phthalocyanine Aggregation. *J. Porphyrins Phthalocyanines*, 1998, 2(1): 1 - 7.