

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

KATEDRA BIOFYZIKY A FYZIKÁLNÍ CHEMIE



DIPLOMOVÁ PRÁCE

**Příprava a fotofyzikální hodnocení tetrapyridoporfyrinů vhodných pro
fotodynamickou terapii**



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

V Hradci Králové dne 10.5.2016

.....

Na tomto místě bych rád poděkoval zejména své školitelce doc. PharmDr. Veronice Novákové, Ph.D. za excelentní odborné vedení, trpělivost a přátelský přístup. Nelituji ani minuty čekání ve věčné frontě v laboratoři na její radu společně s ostatními diplomanty, doktorandy, doktory, docenty, profesory, administrativními pracovníky, pracovníky z oboru úklidových a technických služeb a mnohými dalšími adepty, protože se to vždy vyplatilo. Velice si vážím jak našeho profesionálního, tak lidského vztahu a spolupráce. Taktéž děkuji doc. PharmDr. Petru Zimčíkovi, Ph.D. za pomoc a podporu při práci na tomto mém výzkumném projektu. Oběma zmíněným také děkuji za důvěru a samotné umožnění vypracovávat diplomovou práci pod jejich vedením. Dále patří velký dík Mgr. Miloslavu Macháčkovi za pečlivé provedení všech biologických analýz. V neposlední řadě bych rád poděkoval celému kolektivu laboratoře (Jurovi, Lukymu, Tondovi, Honzovi) za pozitivní a přátelskou atmosféru a užitečné rady. Svě rodině, přátelům a přítelkyni děkuji za duševní podporu během celého nesnadného studia na této fakultě.

OBSAH

| | |
|--|----|
| OBSAH | 1 |
| ABSTRACT | 4 |
| ABSTRAKT | 5 |
| SEZNAM ZKRATEK | 6 |
| TEORETICKÁ ČÁST | 7 |
| Fotodynamická terapie | 7 |
| Mechanismus fotodynamického děje | 9 |
| Světlo | 11 |
| Fotosenzitizér | 12 |
| Struktura fotosenzitizérů | 14 |
| Porfyriny | 14 |
| Chloriny | 15 |
| Bakteriochloriny | 16 |
| Texafyriny | 17 |
| Ftalocyaniny | 17 |
| Tetrapyrídonporfyriziny | 17 |
| CÍL PRÁCE | 19 |
| EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST | 21 |
| Schéma prováděných reakcí | 22 |
| Příprava 2-chloro-5,6-dimethylpyridin-3,4-dikarbonitrilu (1) | 24 |
| N- série látek | 25 |
| Příprava 2-diethylamino-5,6-dimethylpyridin-3,4-dikarbonitrilu (2a) | 25 |
| Příprava symetrického bezkového tetrapyrídonporfyrizinu z prekursoru 2a cyklotetramerizační reakcí (3a) | 26 |
| Příprava tetrapyrídonporfyrizinu se zinečnatým kationtem koordinovaným v centru molekuly odvozeného od látky 3a (4a) | 27 |

| | |
|---|----|
| Příprava hydrochloridu tetrapyridoporfyrinu 4a (5a I)..... | 28 |
| Příprava alkylovaného derivátu tetrapyridoporfyrinu 4a pomocí ethyljodidu (5a II) .. | 29 |
| Příprava alkylovaného derivátu tetrapyridoporfyrinu 4a pomocí dimethylsulfátu (5a III)..... | 30 |
| Příprava hydrofilní emulze tetrapyridoporfyrinu 4a (5a IV) | 31 |
| Příprava 2-(bis(2-hydroxyethyl)amino)-5,6-dimethylpyridin-3,4-dikarbonitrilu (2b) | 32 |
| Příprava symetrického bezkového tetrapyridoporfyrinu z prekursoru 2b cyklotetramerizační reakcí (3b)..... | 33 |
| Příprava tetrapyridoporfyrinu se zinečnatým kationtem koordinovaným v centru molekuly odvozeného od látky 3b (4b) | 34 |
| Příprava 2-diisopropylamino-5,6-dimethylpyridin-3,4-dikarbonitrilu (2c) | 36 |
| O- série látek | 37 |
| Příprava 2,6-bis((1 <i>H</i> -imidazol-1-yl)methyl)-4-methylfenolu, fenolického substituentu (1d) | 37 |
| Příprava 2-(2,6-bis((1 <i>H</i> -imidazol-1-yl)methyl)-4-methylfenoxy)-5,6-dimethylpyridin-3,4-dikarbonitrilu (2d)..... | 39 |
| Příprava tetrapyridoporfyrinu s hořečnatým kationtem koordinovaným v centru molekuly z prekursoru 2d (3d) | 40 |
| Příprava symetrického bezkového tetrapyridoporfyrinu odstraněním hořečnatého kationtu z koordinačního centra látky 3d (4d) | 41 |
| Příprava tetrapyridoporfyrinu se zinečnatým kationtem koordinovaným v centru molekuly odvozeného od látky 4d (5d) | 42 |
| Příprava alkylovaného derivátu tetrapyridoporfyrinu 5d pomocí methyljodidu (6d).. | 45 |
| FOTOFYZIKÁLNÍ MĚŘENÍ | 47 |
| Stanovení absorpčních spekter látek | 47 |
| Stanovení extinkčního koeficientu látek | 47 |
| VÝSLEDKY A DISKUZE..... | 48 |
| Tetra-3,4-pyridoporfyriny s N-substituenty..... | 50 |
| Tetra-3,4-pyridoporfyriny s O-substituenty..... | 56 |

| | |
|---------------------------------|----|
| ZÁVĚR | 64 |
| PŘÍLOHA | 65 |
| SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY | 65 |

ABSTRACT

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department: Department of Biophysics and Physical Chemistry

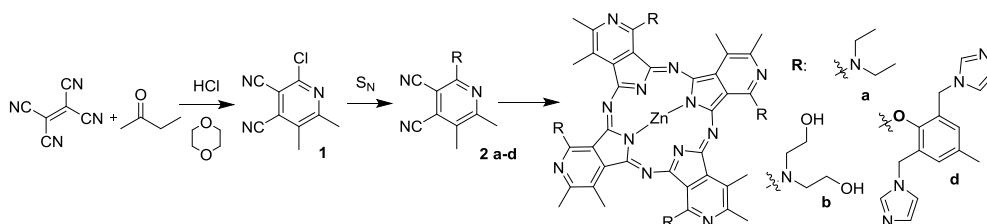
Candidate: Pavel Cermak

Supervisor: Assoc. Prof. Veronika Novakova, PhD.

Title of Thesis: Preparation and photophysical evaluation of tetra-3,4-pyridoporphyrazines suitable for the photodynamic therapy

Tetra-3,4-pyridoporphyrazines (TPyPz) are aza-analogues of phthalocyanines. Their large system of conjugated bonds enables them to absorb light in the red part of the absorption spectrum. Due to their ability to produce singlet oxygen, they can be potentially used as photosensitizers in photodynamic therapy (PDT). Its mechanism is based on co-functioning of three elements - photosensitizer, light and oxygen. Photosensitizer excited by light absorption transfers its energy into tissue oxygen, thus, creating cytotoxic singlet oxygen. This method is beneficial for its high selectivity, low toxicity, minimal invasion and fast effect.

The aim of this work was to synthesize and study water-soluble TPyPz suitable for PDT. Water solubility was achieved by quarternized amines, forming of salts or using suitable delivery systems (hydrophilic emulsion). Hydrophilicity was also increased by introduction of hydrophilic non-charged substituents (OH). At first, appropriate precursors for TPyPz (i.e., 2-substituted-5,6-dimethylpyridine-3,4-dicarbonitriles) were prepared by nucleophilic substitution according to the scheme below. Then, cyclotetramerization of **2 a, b, d** with butoxide as an initiator of the reaction gave required macrocycles. Obtained TPyPz were transferred into metal free derivatives under acidic condition and zinc was then coordinated into the center. At the end water soluble derivatives were prepared. All obtained TPyPz were characterized by physico-chemical properties and biological activity. One of the molecules (**d**) reached excellent effectivity-profile.



ABSTRAKT

Karlova Univerzita v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra: Katedra biofyziky a fyzikální chemie

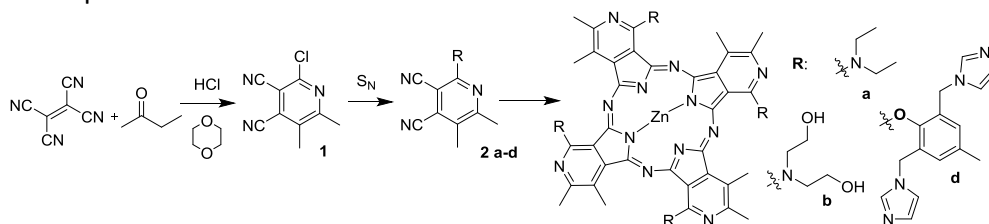
Kandidát: Pavel Čermák

Školitel: Doc. PharmDr. Veronika Nováková, PhD.

Název diplomové práce: Příprava a fotofyzikální hodnocení tetrapyridoporyrazinů vhodných pro fotodynamickou terapii

Tetra-3,4-pyridoporfyriziny jsou aza-analoga ftalocyaninů. Jejich rozsáhlý konjugovaný systém dvojných vazeb jim umožňuje absorbovat světlo v blízké infra-červené oblasti absorpčního spektra. Díky jejich schopnosti generovat singletový kyslík mohou být tyto látky potenciálně použity jako fotosenzitizéry při fotodynamické terapii (PDT). Mechanismus této terapeutické metody je založen na současném působení tří složek- fotosenzitizéru, světla a kyslíku. Světlem excitovaný fotosenzitizér je schopen předat nabytou energii tkáňovému kyslíku, který se takto mění v cytotoxický singletový kyslík. PDT je výhodná díky vysoké selektivitě, nízké toxicitě, minimální invazivitě a rychlému účinku.

Cílem této práce byla syntéza a hodnocení ve vodě rozpustných tetrapyridoporfyrizinů vhodných pro PDT. Rozpustnost ve vodě byla zajištěna kvarternizací aminů, tvorbou solí (protonizací) či přípravou nosičových systémů (hydrofilní emulze). Dále byla hydrofilita zvyšována navázáním nenabitých hydrofilních substituentů (OH). Nejdříve byly připraveny dané prekurzory (2-substituované-5,6-dimethylpyridin-3,4-dikarbonitrily) nukleofilní substitucí dle schématu pod textem. Poté byly pomocí cyklotetramerizace látek **2 a, b, d** s butanolátem, jakožto iniciátorem reakce, syntetizovány požadované makrocykly. Získané tetrapyridoporfyriziny byly v kyselém prostředí převedeny na bezkové deriváty a následně byl do centra molekul koordinován zinečnatý kationt. Nakonec byly připraveny ve vodě rozpustné deriváty. Všechny získané finální molekuly byly podrobeny fyzikálně-chemickým a biologickým testům, přičemž jedna z látek (**d**) dosáhla vynikajícího účinnostního profilu.



SEZNAM ZKRATEK

| | |
|---------------|---|
| ACN | acetonitril |
| ADME | absorpce, distribuce, metabolismus, exkrece |
| BuOH | buthanol |
| CHF | chloroform |
| CHN | elementární analýza („uhlík, vodík, dusík“) |
| DMF | <i>N,N</i> -dimethylformamid |
| EDTA | ethylendiamintetraoctová kyselina |
| IČ | infračervené (spektrum) |
| Φ_F | kvantový výtěžek fluorescence |
| Φ_Δ | kvantový výtěžek singletového kyslíku |
| LDL | nízkodenzitní lipoprotein („ <i>low density lipoprotein</i> “) |
| MCT | triglyceridy se střední délkou řetězce mastných kyselin |
| MeOH | methanol |
| MS | hmotnostní spektrometrie („ <i>mass spectrometry</i> “) |
| NMP | <i>N</i> -methylpyrrolidon |
| NMR | nukleární magnetická rezonance |
| PDT | fotodynamická terapie |
| PS | fotosenzitizér |
| ROS | reaktivní kyslíkaté působky |
| S | singletový stav |
| S_n | nukleofilní substituce |
| T | tripletový stav |
| THF | tetrahydrofuran |
| TLC | tenkovrstvá chromatografie („ <i>thin layer chromatography</i> “) |
| TOL | toluen |

TEORETICKÁ ČÁST

Fotodynamická terapie

Fotodynamická terapie („*the photodynamic therapy*“, PDT) je relativně novou terapeutickou metodou, kterou lze trefně charakterizovat jako neinvazivní, vysoce selektivní způsob destrukce nežádoucích buněk. V devadesátých letech dvacátého století se oficiálně stala alternativou protirakovinných léčebných postupů, a to vedle nosných pilířů boje s touto chorobou- chirurgického odstranění nádoru, chemo- a radioterapie^{1 2}.

K typům nádorovému bujení, u něhož lze PDT uplatnit, se řadí například rakovina kůže, močového měchýře, prostaty, jícnu, plic, mozku, novotvary v krční oblasti či prekancerózní stavy, jakým je kupříkladu Barrettův jícen³.

S rozvíjejícím se výzkumem PDT a jejího klinického využití se ovšem svižně rozšířilo i její pole působnosti, a to i na oblasti kardiologie^{4 5}, urologie⁶, imunologie⁷, zubního lékařství^{8 9}, oftalmologie^{10 11} a kosmetiky^{12 13}. Tuto metodu lze dle současných poznatků dokonce použít pro eradikaci bakteriálních kmenů rezistentních na antibiotika^{14 15} či virových onemocnění^{16 17}.

PDT je založena na současném působení tří složek- fotosenzitizéru (PS), tkáňového kyslíku a světla vhodné vlnové délky. Ani jedna z těchto komponent sama o sobě, či kombinace dvou z nich, není cytotoxicky aktivní. Tento fakt poukazuje na jednu z hlavních výhod použití této metody, tedy vysokou selektivitu. Ozáření pouze kýženého místa vede k zásadnímu omezení systémových nežádoucích účinků, jelikož okolní zdravá tkáň zůstává zcela nepoškozena¹⁸.

Po intravenózní či lokální aplikaci fotosenzitizéru je látce ponechán dostatek času k dokonalé distribuci. Poté je daná tkáň ozářena světlem určité vlnové délky. Fotosenzitizér je schopen energii tohoto světelného záření absorbovat, a tím se dostává do stavu s vyšší energetickou hodnotou. Takto nabytou energii obratem předává tkáňovému kyslíku ³O₂, z něhož se stává vysoce cytotoxický singletový kyslík ¹O₂. Ten společně s taktéž vzniklými volnými radikály působí smrt buněk ve svém sousedství. Vzhledem k velice krátké

životnosti molekul singletového kyslíku ($<0.04 \mu\text{s}$) je akční rádius jejich cytotoxického efektu omezen pouze na bezprostřední okolí ($<0.02 \mu\text{m}$)¹⁹.

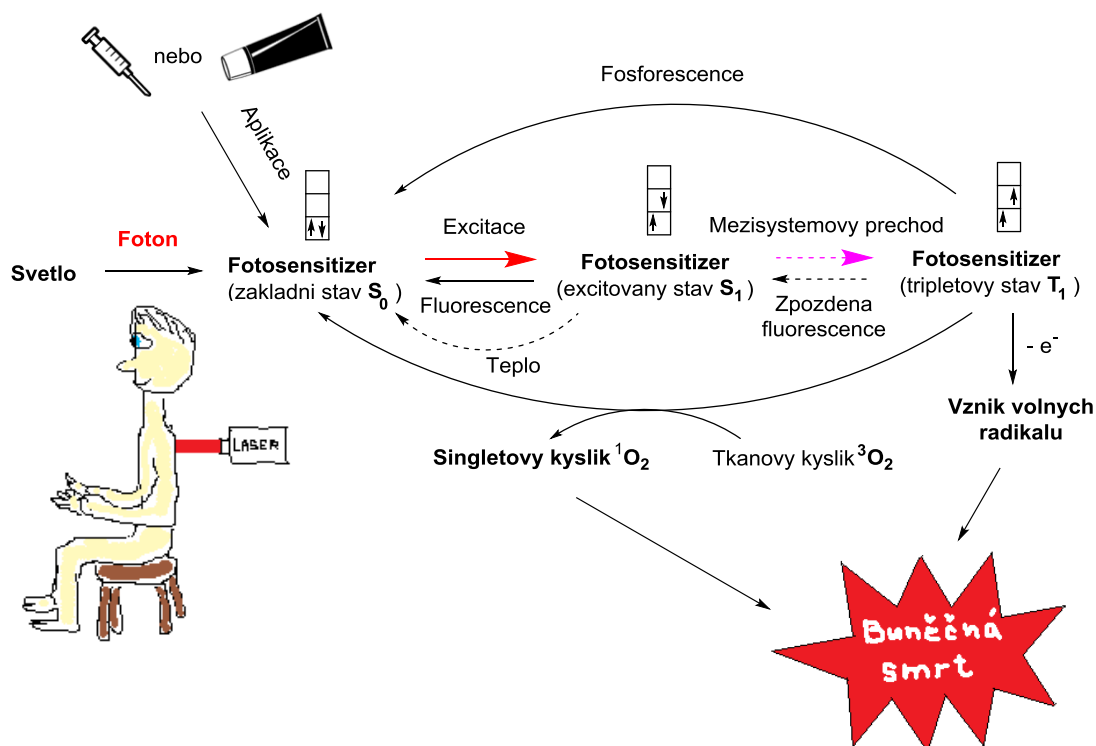
Ke smrti nádorové tkáně dochází buď v důsledku přímého cytotoxického efektu na buňky, poškozením vaskulárního systému nádoru, a tedy přerušением jeho výživy, či aktivací mohutné imunitní odpovědi právě proti buňkám novotvaru¹⁸. PDT může indukci imunitního systému navodit až vznik dlouhodobé protinádorové imunity². K buněčné smrti dochází apoptózou, nekrózou nebo autofagií³. Použití fotosenzitizérů cytotoxicky působících zejména skrze apoptózu je vhodné v případech, kdy je vyvolání masivní imunitní reakce, tedy zánětu a s ním spojeného otoku, nežádoucí, a to například u nádorů mozku. Cesta nekrózy může být na druhou stranu vysoce efektivní pro indukci nejen krátkodobé, ale zejména dlouhotrvající protinádorové imunity²⁰.

Bez zajímavosti taktéž není, že jsou fotosenzitizéry preferenčně distribuovány v nádorové tkáni. Přesný mechanismus tohoto děje není znám. Možná vysvětlení pramení z odlišností zdravé tkáně od tkáně novotvaru, kterými jsou například zvýšená exprese LDL-receptorů (přičemž některé fotosenzitizéry pravděpodobně disponují schopností se na LDL vázat), snížené pH, větší intersticiální prostory, fenestrace endotelu či vysoké množství nově syntetizovaného kolagenu, jenž je schopen vázat porfyriny^{21 22 23 24}.

Pozitivně nabité fotosenzitizéry mnohem úspěšněji procházejí buněčnou membránou než ty nabitě negativně¹⁸.

Některé studie také poukazují na fakt, že látky intracelulárně lokalizované v mitochondriích mají obecně vyšší účinnost než ty distribuované jinde v buňce (například v lysozomech)¹⁸.

Mechanismus fotodynamického děje (Obr. 1)



Obr. 1. Schéma fotodynamických procesů probíhajících při PDT s inkorporovaným modifikovaným Jablonského diagramem (popis viz text), kde jsou zářivé procesy vyznačeny rovnou šipkou, nezářivé přerušovanou.

Fotosenzitizér ve svém základním stavu S_0 disponuje stejným uspořádáním elektronů v molekulových orbitalech jako většina látek- páry elektronů s opačným spinem se nacházejí v nízkoenergetických orbitalech. Absorpcí fotonu světla vhodné vlnové délky se ovšem molekula látky dostává do excitovaného stavu S_1 , dochází k přechodu elektronu do vysokoenergetického orbitalu bez změny spinu. Tato akce trvá přibližně 10^{-15} s^{25 26}.

Z tohoto excitovaného stavu S_1 o nízké životnosti (řádově ns) se molekula může vrátit zpět do stavu základního S_0 několika způsoby, a to buď emisí fotonu, neboli fluorescencí, či nezářivou relaxací- odevzdáním tepla. Alternativně může docházet k relativně vzácnému jevu zvanému mezisystémový přechod, díky němuž se molekula dostává do tripletového stavu T_1 za současné inverze spinu excitovaného elektronu. Elektrony tedy zaujímají paralelní uspořádání. Právě díky nutnosti obrácení spinu jsou přechody mezi S a T stavy pomalé a tripletové stavy disponují dlouhou životností (mikrosekundy až sekundy). Jev se označuje jako spinově zakázaný^{27 18}.

Pravděpodobnost mezisystémového přechodu roste s atomovým číslem, a proto lze volbou vhodného centrálního kationtu kovu docílit výhodnějších fotofyzikálních a fotochemických vlastností PS. Tento jev je označován jako efekt těžkého atomu („*heavy atom effect*“) ^{28 27}. Zatímco hořečnaté komplexy vykazují vyšší míru fluorescence, zinečnaté komplexy s vyšším atomovým číslem se vyznačují výbornou tvorbou singletového kyslíku ^{29 30 31}.

Poměrně dlouhá životnost tripletového stavu T_1 , daná zakázaností přechodů mezi S a T stavy, poskytuje molekule fotosenzitizéru prostor k interakci s okolím, zejména pak s tkáňovým kyslíkem. Ten se přirozeně vyskytuje ve svém základním tripletovém stavu T_0 a lehce může přijmout energii excitované molekuly v T_1 stavu. Takto dochází ke vzniku vysoce reaktivního singletového kyslíku 1O_2 , který je hlavním nositelem cytotoxického účinku během PDT. Mimo transfer energie na molekuly okolí se může molekula fotosenzitizéru vrátit do základního stavu také emisí světla- fosforescencí- či nepřímo, znovu přes excitovaný stav S_1 , zpožděnou fluorescencí ^{26 32}.

Ke ztrátě energie fotosenzitizéru může dojít taktéž srážkami s molekulami okolí, zejména s těmi kyslíkatými, což vede k tvorbě reaktivních kyslíkatých působků („*reactive oxygen species*“, ROS), tedy volných radikálů. Ty se společně se singletovým kyslíkem podílejí na devastaci buněk ve svém dosahu. Čím delší je životnost T_1 stavu fotosenzitizéru, tím vyšší je pravděpodobnost jeho kolize s okolními molekulami ¹⁸.

Důležité je, že relaxace fotosenzitizéru z excitovaného do základního stavu je kompetitivním dějem, který zahrnuje všechny zářivé i nezářivé procesy. Pravděpodobnost návratu excitované molekuly do základního stavu určitou cestou popisují tzv. kvantové výtěžky. Lze je charakterizovat jako počet návratů daným způsobem na celkový počet přijatých fotonů. Kupříkladu počet emitovaných fotonů k počtu přijatých je kvantový výtěžek fluorescence Φ_F . Jedním z klíčových parametrů vysoce účinného fotosenzitizéru je poté kvantový výtěžek singletového kyslíku Φ_Δ , který vyjadřuje počet vzniklých molekul 1O_2 na počet přijatých fotonů.

Světlo

Jedním ze základních parametrů pro PDT je bez pochyby světlo, respektive jeho vlnová délka. Ta určuje hloubku průniku záření do tkáně a tedy přímo efektivitu celého procesu. Světlo disponující kratšími vlnovými délkami- modré světlo- je mohutně absorbováno tzv. endogenními chromofory (například hemoglobin, myoglobin, melanin) a navíc podléhá rozptylu. Není proto schopné dostat se nikterak hluboko pod kůži. Na druhou stranu světlo příliš dlouhých vlnových délek, nad 1300 nm, je pohlcováno molekulami vody. Rozmezí vhodných vlnových délek světla pro použití při PDT se označuje jako tzv. optické či také fototerapeutické okno a činí přibližně 630-1300 nm^{33 34}.

Elektromagnetické záření o vlnové délce nad 800 nm již ovšem zpravidla nemusí poskytovat fotosenzitizéru dostatečnou energii k excitaci tkáňového kyslíku na singletový^{35 36}. Prakticky použitelné je tedy červené světlo v rozmezí 630-800 nm, přičemž čím blíže horní hranici, tím efektivnějšího průniku do tkáně je možné dosáhnout, a to až do 10 mm³.

Za zcela ideální lze poté považovat světlo vlnové délky asi od 700 do 800 nm- čím blíže hodnotě 800 nm, tím lépe.

Fotosenzitizér

Fotosenzitizér je látka citlivá na světlo. Může být jak endogenního, tak exogenního původu. Při PDT přijímá energii od světla a následně ji předává tkáňovému kyslíku. Je tedy jakýmsi motorem celého fotodynamického procesu.

Mezi parametry ideálního fotosenzitizéru patří:

- chemické
 - čistota (látka by měla být jednotnou, čistou entitou, a to nejen kvůli možnosti snadné analytické kontroly, ale i z hlediska bezpečnosti)
 - stabilita
 - rozpustnost ve vodě
 - schopnost látky zůstat monomerní v hydrofilním vodném prostředí (netvořit nefunkční agregáty)
- farmakologické, resp. farmakokinetické
 - výhodný a bezpečný ADME profil- zejména poměrně rapidní clearance, a to hlavně z kůže, pro snížení incidence fototoxických nežádoucích účinků, ale i z celého organismu
- spektrální
 - absorpční maximum v intervalu 630-800, resp. 700-800 nm
 - vysoká intenzita absorpce vyjádřená extinkčním koeficientem (opravdu velmi silnou absorpci představují hodnoty $\epsilon \sim 200\,000\text{ cm}^{-1}\text{ dm}^3\text{ mol}^{-1}$)
- fotofyzikální a fotochemické
 - vysoký kvantový výtěžek singletového kyslíku (tedy množství fotosenzitizérem vytvořených molekul singletového kyslíku na počet všech přijatých fotonů)
 - nízký „*photobleaching*“ neboli destrukce fotosenzitizéru světlem (pozn. některé studie ovšem poukazují na skutečnost, že tento jev nemusí mít pouze negativní efekt- například snižuje tlak na přesnost dávky světla, čímž omezuje riziko hyperaktivity terapie ³⁷)
- ekonomické a ekologické
 - cena
 - dostupnost

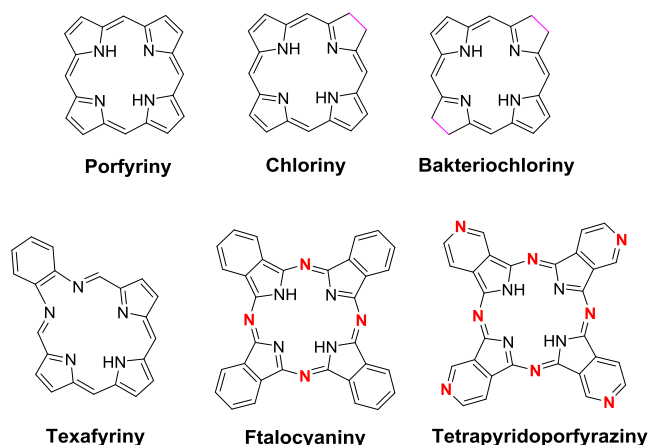
- biologické

- nízká toxicita bez ozáření („*dark toxicity*“)
- vysoká fototoxicita (účinnost po ozáření)
- selektivní vychytávání („*up-take*“) nádorovou tkání zajišťující vysokou koncentraci látky v tumoru
- zcela bez mutagenity a kancerogenity^{38 39 3}.

Při návrhu a následné chemické syntéze nového fotosenzitizéru je zásadní zaměřit se na 4 klíčové vlastnosti molekuly- rozpustnost ve vodě, schopnost neagregovat ve vodném prostředí, vysoký absorpční posun a kvantový výtěžek singletového kyslíku. Od nich se poté odvíjí celkový účinnostní profil látky, tedy míra její fototoxické efektivity. Většinu ostatních parametrů fotosenzitizéru je možné předem ovlivnit podstatně méně.

Struktura fotosenzitizérů

Skupina atomů v molekule fotosenzitizéru zodpovědná za absorpci světla se nazývá chromofor. Obecně se jedná o planární, aromatickou část molekuly disponující systémem konjugovaných dvojných vazeb⁴⁰. Strukturální základ pro většinu syntetických fotosenzitizérů představuje cyklické tetrapyrrolové jádro molekuly a jeho analoga¹⁸. Jedná se o porfyriny a od nich odvozené chloriny, bakteriochloriny, texafyriny, ftalocyaniny či také tetrapyridoporfyraziny (Obr. 2). Přirozeně se vyskytující látka obsahující porfyrinový skelet je například hem.



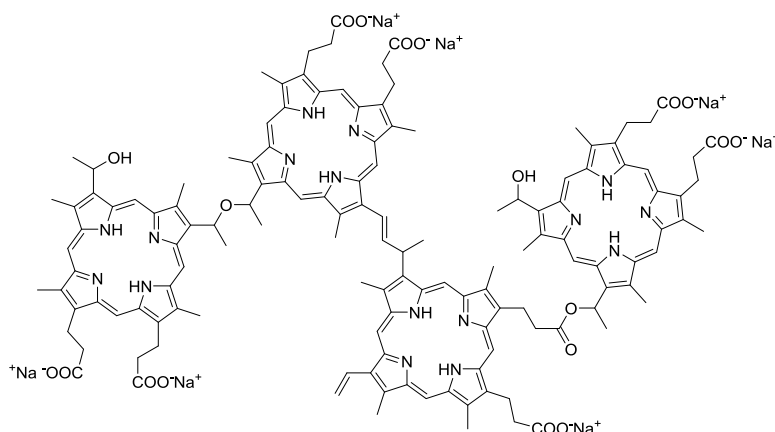
Obr. 2. Základní strukturální typy syntetických fotosenzitizérů.

Porfyriny

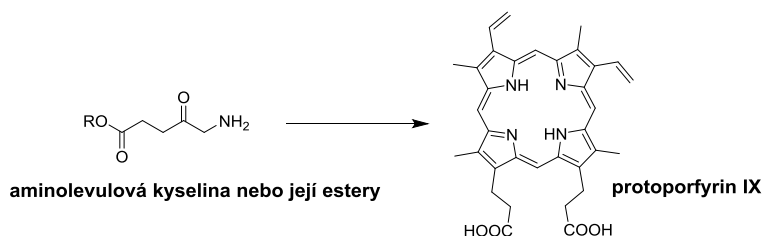
Do skupiny porfyrinů patří historicky nejstarší PS schválený pro klinické použití – porfimer sodný (Obr. 3). Jeho hlavní předností je extrémně vysoký kvantový výtěžek singletového kyslíku ($\Phi_{\Delta} = 0,89$)⁴¹. Na druhou stranu však disponuje celou řadou vážných nedostatků, a to dlouhotrvající kožní fotosenzitivitou pacienta po prodělané terapii, nejednotným složením (látka se skládá přibližně z šedesáti oligomerů), nízkým absorpčním posunem (asi 630 nm) či slabou intenzitou absorpce ($\epsilon \sim 3\,000\text{ cm}^{-1}\text{ dm}^3\text{ mol}^{-1}$)⁴². Jeho fototoxicita vyjádřená v $LD_{50}(EC_{50})$ je přibližně $10\ \mu\text{M}$ ⁴⁹. Negativa této látky vedla ke snahám vyvinout PS bez podobných limitací.

Další látkou patřící do strukturální skupiny porfyrinů je aminolevulová kyselina (ALA), která je proléčivem protoporfyrinu IX (Obr. 3). Tato látka je široce používána především pro léčbu kožních onemocnění, zejména aktinické keratózy. Při lokální aplikaci je ALA a hlavně poté její estery schopná dobře pronikat skrz stratum corneum. Mezi její nevýhody

patří nízká hodnota absorpčního maxima (asi 632 nm) a slabá absorpce ($\epsilon \sim 5\,000\text{ cm}^{-1}\text{ dm}^3\text{ mol}^{-1}$)^{41 43 44}.



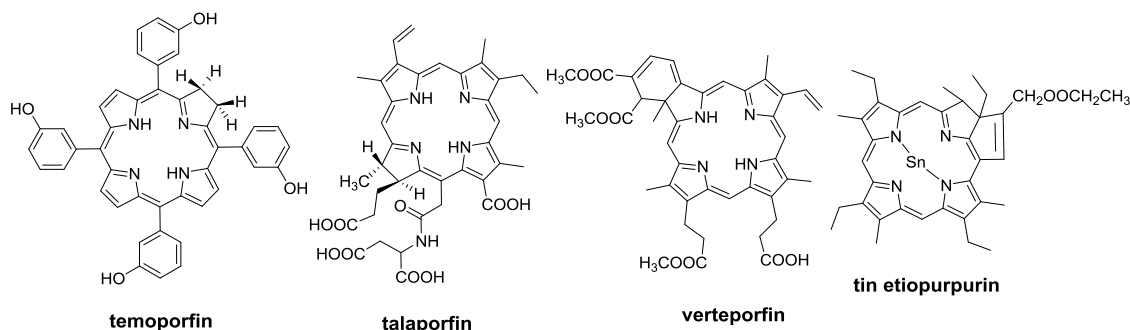
jeden z mnoha možných oligomeru porfimeru sodného



Obr. 3. Struktury nejznámějších porfyrinů používaných v klinické praxi.

Chloriny

Nejznámějšími látkami této strukturní rodiny, která se vyznačuje redukovanou jednou dvojnou vazbou oproti porfyrinům, jsou temoporfin (Foscan[®], *m*-THPC), talaporfin, verteporfin (Visudyne[®], také někdy řazený do skupiny benzoporfyrinů) či tin etiopurpurin (Purlytin[®], SnEt2) (Obr. 4). Hodnota jejich absorpčního maxima je shodně u všech okolo 660 nm, kromě verteporfinu, u něhož dosahuje až 690 nm. Extinkční koeficienty chlorinů se pohybují v oblasti kolem $40\,000\text{ cm}^{-1}\text{ dm}^3\text{ mol}^{-1}$ ^{3 45}.

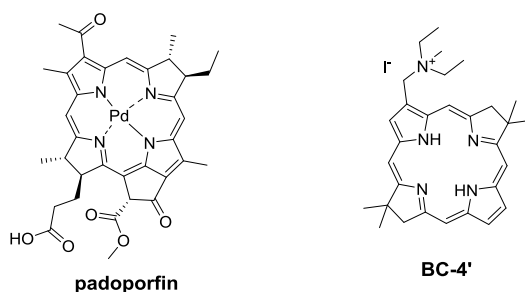


Obr. 4. Příklady chlorinů používaných v klinické praxi.

Bakteriochloriny

Tyto látky se liší od chlorinů další redukovanou dvojnou vazbou porfyrinového skeletu. Vyznačují se relativně silnou absorpcí ($\epsilon \sim 50\,000\text{ cm}^{-1}\text{ dm}^3\text{ mol}^{-1}$) v infračervené oblasti světla 720-850 nm^{46 47}. Znáмым zástupcem této skupiny je padoporfin, jehož absorpční maximum dosahuje 762 nm³ (Obr. 5). Odvrácenou stránkou těchto látek je obecně nízká stabilita, náchylnost k rozkladu světlem a omezená možnost chemických modifikací^{48 49}. Inovativními syntetickými přístupy však lze do určité míry tyto limity překonat a připravit stabilní deriváty bakteriochlorinů s vysokou účinností při PDT¹⁸.

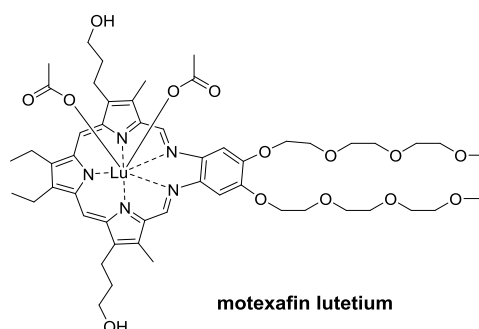
Příkladem takové chemické strategie je navázání geminální dimethylové skupiny na každý ze dvou redukovaných pětičlenných kruhů, které poté brání oxidaci či rozkladu makrocyclu⁴⁶. Aplikací tohoto postupu bylo v nedávné době připraveno několik bakteriochlorinů, přičemž nejlepší z nich (Obr. 5) vykazoval vynikající vlastnosti- absorpční maximum 715-719 nm, $\epsilon \sim 120\,000\text{ cm}^{-1}\text{ dm}^3\text{ mol}^{-1}$, LD₅₀ (EC₅₀) = 1,5-5 nM, „dark toxicity“ do koncentrace 0,5 μM negativní (dále přesně nestanovena). Problémem vlastního bakteriochlorinům však i v případě těchto látek zůstává „photobleaching“ (při ozáření 8 J/cm²), případně také otázka rozpustnosti ve vodě. Jinak se ovšem jedná o velice zajímavé a nadějně látky s dosud nevídaně nízkou hodnotou LD₅₀ v *in vitro* testech- v řádu nM⁵⁰.



Obr. 5. Struktura bakteriochlorinu používaného v klinické praxi (padoporfin) a molekuly z nedávné studie vykazující LD₅₀ v řádu nM (BC-4')⁵⁰.

Texafyriny

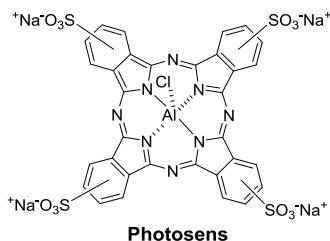
Zástupcem této skupiny je motexafin lutetium (Obr. 6) absorbující při 732 nm. LD₅₀ této látky je přibližně 1 μM⁴⁹.



Obr. 6. Nejznámější klinicky používaný texafyrin.

Ftalocyaniny

Ftalocyaniny standardně absorbují v oblasti 650-720 nm, a to velice silně $\epsilon \sim 200\,000\text{ cm}^{-1}\text{ dm}^3\text{ mol}^{-1}$. Úskalí těchto látek tkví zejména v jejich omezené rozpustnosti ve vodě^{45 47}. Příkladem je Photosens (Obr. 7) s absorpčním maximem 675 nm.



Obr. 7. Nejznámější klinicky používaný ftalocyanin.

Tetrapyridoporfyriziny

Tetrapyridoporfyriziny představují v oblasti fotosenzitizérů zatím velice neprobádanou kapitolu. Na rozdíl od výše zmíněných strukturních typů nebyla dosud žádná látka z této skupiny registrovaná pro použití v klinické praxi. V tomto strukturním základu je však skrytý značný potenciál. Jakožto ftalocyaninům podobné struktury přejímají i jejich vlastnosti, zejména ovšem ty pozitivní, nikoli ve větší míře ty negativní. V mnoha parametrech se navíc zcela vymykají.

Stejně jako ftalocyaniny i tyto látky disponují velice silnou absorpcí světla. Absorpční posun tetrapyridoporfyrizínů může však díky většímu množství atomů dusíku v molekule dosahovat až k hranici 800 nm. Variabilita periferní substituce je vysoká a

možnost chemické modifikace je relativně neomezená. Vhodnou periferní substitucí lze připravit ve vodě rozpustné hydrofilní deriváty⁵⁴.

Pravděpodobně nejstinnější stránkou těchto látek, respektive jejich hydrofilních analog, je enormní sklon k agregaci ve vodném prostředí, přičemž shluky molekul jsou poté zcela neúčinné. K tomuto jevu dochází kvůli jejich planárnímu charakteru a lze mu velice těžko zabránit. Jedinou možností prevence tohoto fenoménu se jeví volba vhodného periferního zbytku- objemného, případně nabytého⁵³.

CÍL PRÁCE

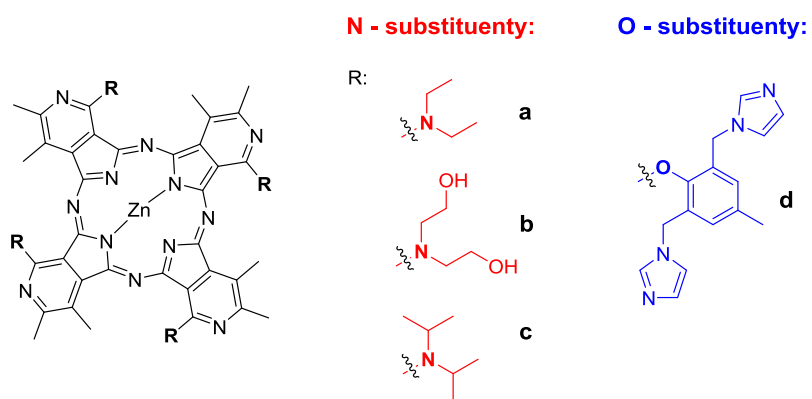
Cílem mé diplomové práce byla syntéza a následná evaluace celkem čtyř zcela nových, unikátních derivátů tetra-3,4-pyridoporfyrinu s vlastnostmi zajišťujícími vysoký potenciál pro použití při fotodynamické terapii jako fotosenzitizérů.

Připravované látky lze rozdělit na dvě skupiny dle atomu, přes který jsou periferní substituenty vázány k centrálnímu skeletu- jedná se o **N**- a **O**- série molekul (Obr. 8). Zatímco u N- derivátů bylo primárním cílem dosáhnout posunu jejich absorpčního maxima co nejbližší k hranici 800 nm, tedy hluboko do blízké IČ oblasti světla, v případě molekuly O- série byl kladen důraz nejen na jednotlivé, izolované důležité vlastnosti, ale na optimalizaci pokud možno všech klíčových parametrů.

Jak bylo patrné z dřívějších výzkumných projektů⁵⁴, periferní substituenty vázané přes atom dusíku k centrálnímu skeletu umožňují látce absorbovat světlo hluboko v blízké oblasti IČ světla. Na základě těchto zkušeností byla navržena N- série molekul, celkem tři deriváty tetra-3,4-pyridoporfyrinu- **a**, **b** a **c**.

Objemný, rigidní a nakonec i kladně nabitý fenolický substituent (**d**) je schopen látky s tetrapyridoporfyrinům podobnou strukturou ve vodném prostředí ochránit před agregací. Samotná schopnost molekuly zůstat monomerní bez excelence v dalších klíčových vlastnostech, zejména pak vysokém absorpčním posunu, ovšem nevede k vysoké účinnosti fotosenzitizéru⁵³. Základní ideou v případě designu O- série, tedy látky **d**, bylo spojení fenolického substituentu, s potenciálem zabránit shlukování finálních molekul, s tetrapyridoporfyrinovým centrálním skeletem, který fotosenzitizéru umožní udržet vysoký absorpční posun. Takto bude vytvořen potenciál pro uplatnění ničím nelimitovaného účinku molekuly.

U všech finálních molekul bylo také cílem zajistit jejich rozpustnost ve vodě, a to buď kvarternizací aminů (alkylací), tvorbou solí (protonizací) či použitím nosičových systémů (hydrofilní emulze). V případě látky **b** bylo záměrem zvýšit hydrofilitu finální látky nenabitými hydrofilními substituenty (hydroxy- skupinami).



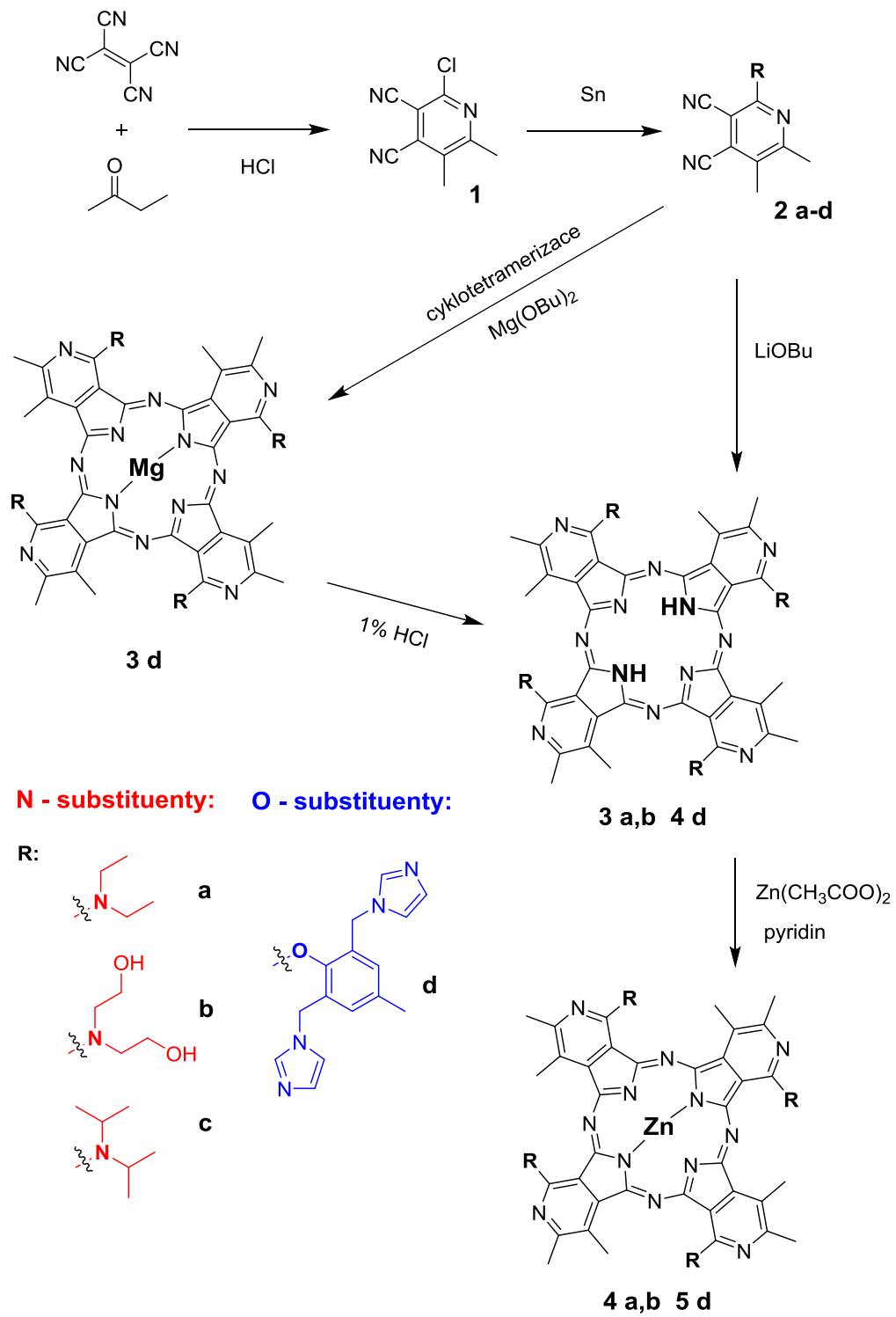
Obr. 8. Názorné schéma všech syntetizovaných látek a jejich rozdělení do dvou skupin dle typu periferního substituentu.

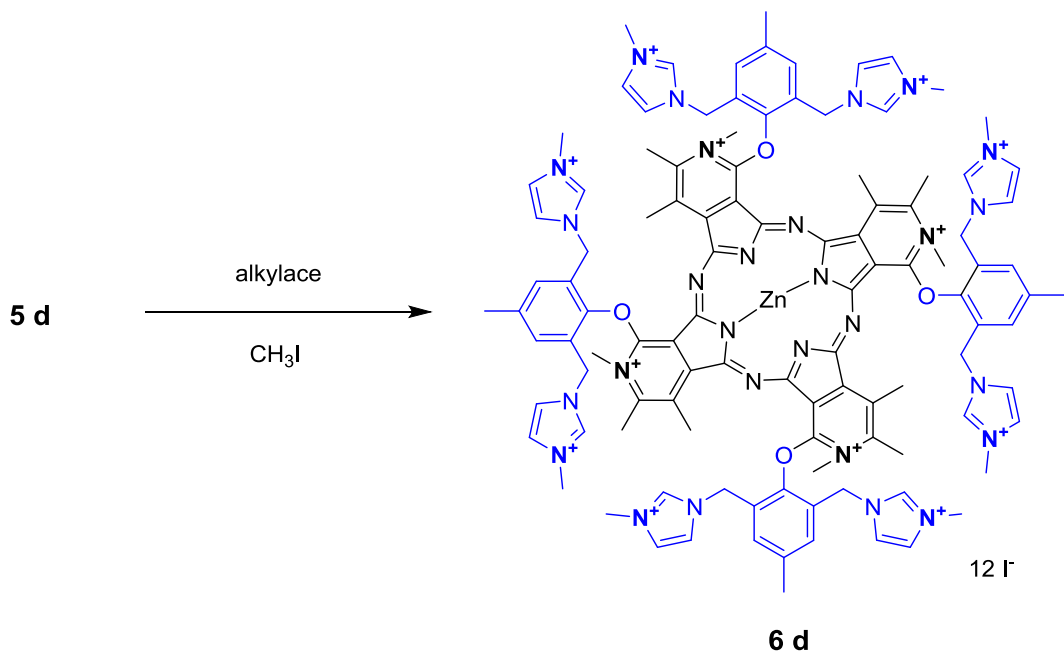
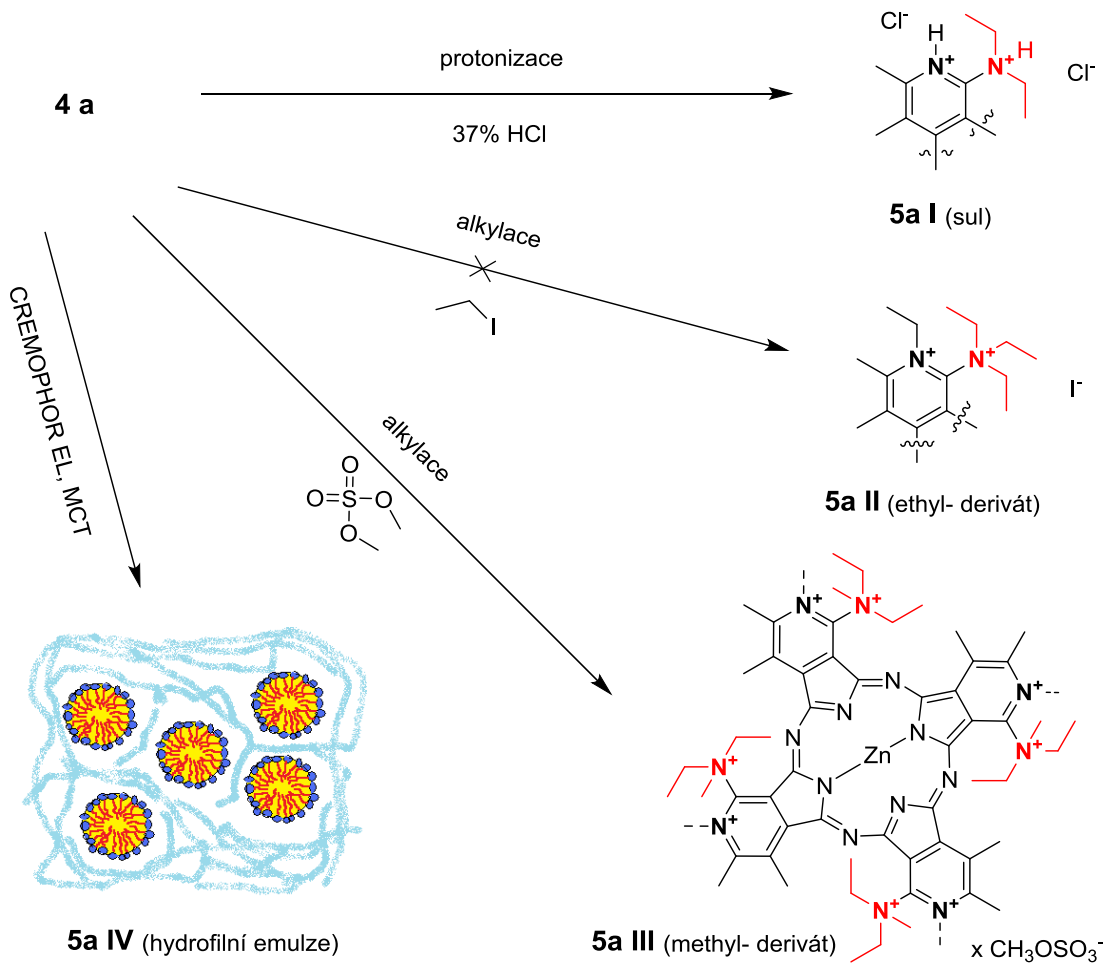
EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Výchozí látky a rozpouštědla pro reakce byly zakoupeny od firem Lach-Ner, Penta, Sigma-Aldrich či Acros. Byly použity bez dalšího čištění.

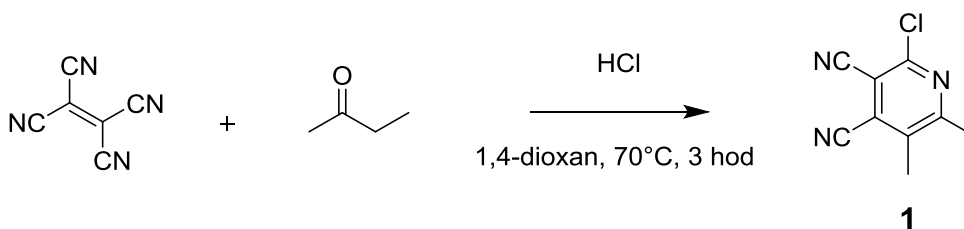
Průběh reakcí a čistota výsledných produktů byly sledovány pomocí tenkovrstevné chromatografie (TLC) na deskách Merck Kieselgel 60 F254. Detekce UV lampou probíhaly při vlnové délce 254 nm nebo 366 nm. Teplota tání sloučenin byla měřena pomocí digitálního přístroje ELECTROTHERMAL IA9200. Čištění produktů reakcí bylo prováděno pomocí sloupcové chromatografie na stacionární fázi Merck Kieselgel 60 (0,040-0,063 mm). Mobilní fáze použité pro jednotlivé reakce jsou popsány níže. Infračervená spektra byla měřena IČ spektrofotometrem Nicolet 6700 v ATR módu na Katedře anorganické a organické chemie. ^1H NMR a ^{13}C NMR spektra byla měřena na přístroji Varian Mercury Vx BB 300 nebo VNMR S500 na Katedře anorganické a organické chemie. Elementární analýza byla provedena na přístroji Automatic Microanalyzer EA1110CE (Fisons Instruments, Milan, Italy) nebo vario Micro Cube Elemental Analyzer (Elementar Analysensysteme GmbH, Hanau, Germany). UV/Vis spektra byla měřena pomocí přístroje Shimadzu UV-2401PC spectrophotometer a fluorescenční spektra na FS5 Spectrofluorometer (Edinburg Instruments). Hmotnostní spektrometrie (MALDI-TOF) byla provedena na přístroji 4800 MALDI TOF/TOF mass spectrometer (AB Sciex, Framingham, MA, USA) s použitím *trans*-2-[3-(4-*tert*-butylfenyl)-2-metyl-2-propenyliden]-malononitrilu jako matrice. Přístroj byl kalibrován externě pětibodovou kalibrační metodou pomocí Peptide Calibration Mix 1 (LaserBioLabs, Sophia-Antipolis, France).

Schéma prováděných reakcí





Příprava 2-chloro-5,6-dimethylpyridin-3,4-dikarbonitrilu (1)



Příprava elementárního prekurzoru, látky **1**, byla založena na postupu popsáném již dříve v literatuře ⁵¹. K butan-2-onu (3,38 g, 0,047 mol) rozpuštěnému v 1,4-dioxanu (100 ml) byl přidán tetrakynoethylen (5,00 g, 0,039 mol). K tomuto žlutě zbarvenému roztoku byla přikapána 36% kyselina chlorovodíková (v/v) (39 ml), přičemž takřka okamžitě byla patrná změna zbarvení na tmavě červenou. Směs byla zahřívána v olejové lázni o teplotě 70°C a míchána po dobu 3 hodin v aparatuře se zpětným chladičem. Kvůli možnosti vzniku a úniku toxického kyanovodíku během reakce byl unikající plyn probubláván a neutralizován roztokem 20% síranu železnatého. Průběh reakce byl kontrolován pomocí TLC, přičemž jako mobilní fáze byl použit chloroform ($R_f = 0,65$).

Posléze byla přidána voda (400-500 ml) a produkt byl nechán krystalizovat po dostatečně dlouhou dobu (18 hodin). Suspenze tmavě fialových krystalů byla vakuově zfiltrována. Vzhledem k tomu, že ve filtrátu byl stále detekován produkt, byla provedena několikanásobná extrakce do CHF. Přebytný CHF byl ze spojených výtěpků odpařen na vakuové odparce. Obě frakce produktu, jak krystaly na filtračním papíru, tak extrahovaná část, byly smíchány.

Směs byla přečištěna sloupcovou chromatografií s mobilní fází CHF.

Výsledným produktem byla narůžovělá krystalická látka lehce voskovitého charakteru.

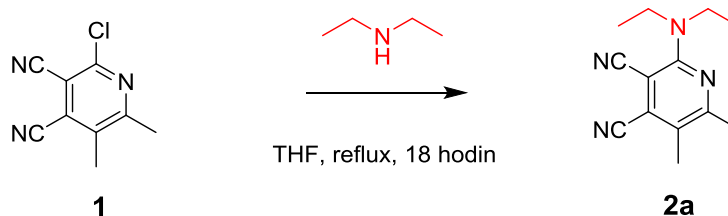
Výtěžek: 4,20 g (56%). Molekulová hmotnost 191,62. T.t. 75,4-76,3°C (literatura 75,7-76,6°C ⁵⁴)

¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ_H 2,56 (3H, s, CH₃); 2,66 (3H, s, CH₃); ¹³C-NMR (CDCl₃, 75 MHz): δ_C 17,3; 23,7; 109,2; 112,4; 112,7; 125,8; 134,3; 150,1 a 164,4. IČ (ATR, cm⁻¹): 2358, 2335, 2206 (CN), 1587, 1562, 1503, 1439, 1402, 1387, 1369, 1275, 1235, 1181, 1123, 1085, 991 a 889. Naměřená data odpovídají publikovaným datům ⁵⁴.

N- SÉRIE LÁTEK

Látka a:

Příprava 2-diethylamino-5,6-dimethylpyridin-3,4-dikarbonitrilu (2a)



Příprava látky **2a** byla založena na postupu popsaném již dříve v literatuře ⁵⁴. K elementárnímu prekursoru **1** (2,02 g, 10,47 mmol) rozpuštěnému v THF (71 ml) byl po kapkách přidán diethylamin (5,40 g, 73,83 mmol). Již za okamžik byl patrný přechod zbarvení na žlutou. Směs byla míchána při teplotě varu rozpouštědla po dobu 18 hodin. Průběh reakce byl kontrolován pomocí TLC s mobilní fází CHF.

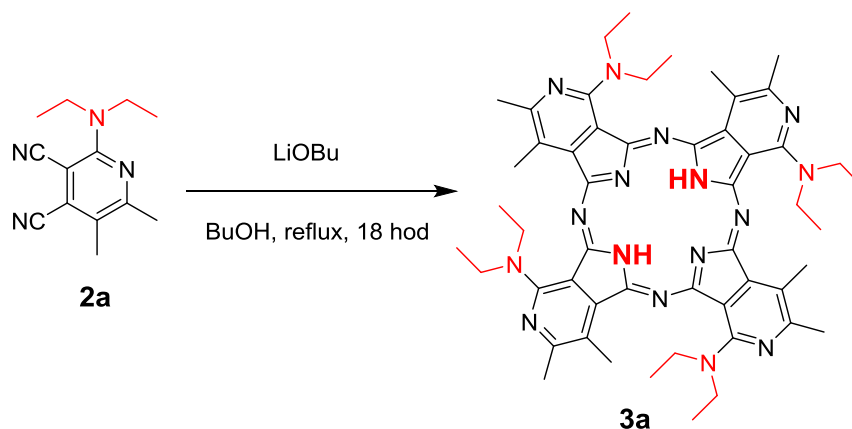
Po ochlazení reakční směsi byla sraženina diethylamonium chloridu odfiltrována pomocí vakuové filtrace. Filtrát byl odpařen za sníženého tlaku na vakuové odparce.

Látka byla přečištěna pomocí sloupcové chromatografie, jako mobilní fáze byl použit CHF. Výsledným produktem byla sytě žlutá, olejovitá látka, chladnutím krystalizující na světleji žlutou, krystalickou látku voskovitého charakteru.

Výtěžek: 1,92 g (80%). Molekulová hmotnost 228,30. T.t. 66,4-67,1°C (literatura 66,2-67,0°C).

¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ_{H} 1,26 (6H, t, J=7,0 Hz, CH₂CH₃); 2,35 (3H, s, CH₃); 2,43 (3H, s, CH₃); 3,68 (4H, q, J=7.0 Hz, CH₂); ¹³C-NMR (CDCl₃, 75 MHz): δ_{C} 13,4; 16,3; 23,9; 44,2; 86,6; 114,8; 117,0; 122,3; 126,7; 155,5 a 162,2. IČ (ATR, cm⁻¹): 2982, 2883, 2201 (CN), 1578, 1543, 1497, 1470, 1448, 1434, 1408, 1376, 1358, 1313, 1294, 1261, 1215, 1172, 1109, 1075, 1013 a 931. Naměřená data odpovídají publikovaným datům ⁵⁴.

Příprava symetrického bezkového tetrapyrRIDOPORFYRAZINU z prekursoru **2a** cyklotetramerizační reakcí (**3a**)



Příprava látky **3a** byla založena na postupu popsáném již dříve v literatuře ⁵⁴. K výchozí látce **2a** (1,477 g, 6,47 mmol) rozpuštěné v čerstvě předestilovaném BuOH (21 ml) bylo přidáno kovové Li⁰ (314 mg, 45,24 mmol). Byla patrná okamžitá změna zbarvení na tmavě zelenou. Reakční směs byla míchána při teplotě zajišťující var rozpouštědla po dobu 18 hodin. Kvůli udržení bezvodého prostředí reakce byl vrchol zpětného chladiče opatřen silikagelovým uzávěrem.

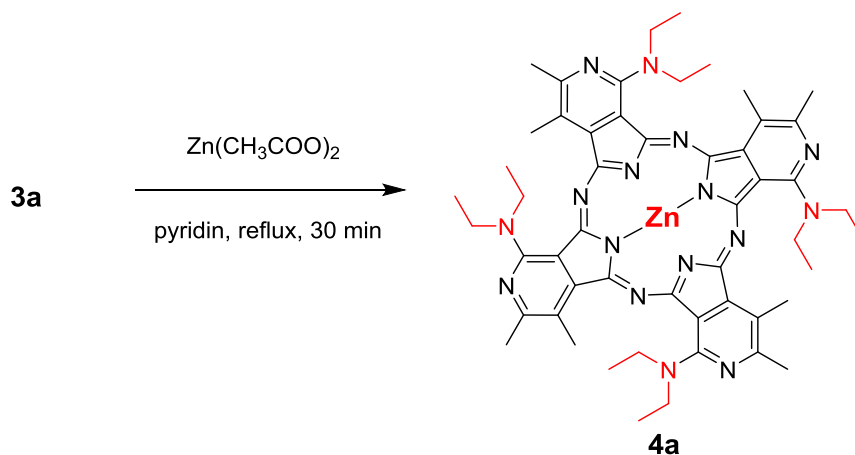
Rozpouštědlo z reakční směsi bylo posléze odpařeno na vakuové odparce. Do mixtury byla dále přidána voda a 96% kyselina octová v poměru 1:1 (celkem 106 ml). Byla detekována změna zbarvení na tmavě fialovou a vznik suspenze. Suspenze byla posléze zfiltrována pomocí prosté filtrace, produkt na filtračním papíře byl důkladně promyt vodou a vysušen v horkovzdušné sušárně (114°C, 1 hod).

Následně byl produkt přečištěn pomocí sloupcové chromatografie s mobilní fází TOL/CHF/THF nejprve v poměru 10:5:1, poté 10:5:0,1. Tento krok přípravy látky **3a** byl nevýhodný, protože látka zůstávala zachycena na silikagelu, a pro případnou budoucí syntézu je nutno doporučit čištění sloupcovou chromatografií provádět až po následujícím kroku.

Většina produktu zachycená na startu silikagelové kolony byla extrahována do pyridinu, jenž byl poté za sníženého tlaku odpařen na vakuové odparce. Takto získaný produkt byl poté bez dalšího přečištění použit jako výchozí látka další reakce.

Výtěžek: 662,8 mg (45%). Molekulová hmotnost 915,21. MS (MALDI): 914.5 [M]⁺

Příprava tetrapyridoporfyrazinu se zinečnatým kationtem koordinovaným v centru molekuly odvozeného od látky 3a (4a)



Syntéza látky **4a** byla založena na postupu popsaném již dříve v literatuře⁵⁴. Výchozí látka **3a** (650 mg, 0,71 mmol) byla smíchána s octanem zinečnatým (910 mg, 4,97 mmol) v pyridinu jako rozpouštědle. Komponenty reakce byly ponechány k vzájemné interakci po dobu 30 minut při teplotě varu rozpouštědla. Zpětný chladič byl opatřen silikagelovým uzávěrem. Průběh reakce byl kontrolován pomocí TLC o mobilní fázi TOL/CHF/THF v poměru 10:5:0,5.

Po vychladnutí reakční směsi byla větší část rozpouštědla odpařena na odparce a reakční mixtura takto zahuštěna. Dále byl do tohoto koncentráту přidán nadbytek vody. Ihned byl detekován vznik suspenze. Ta byla následně zfiltrována prostou filtrací a filtrační membrána promyta dostatečným množstvím vody, nakonec i malým množstvím MeOH.

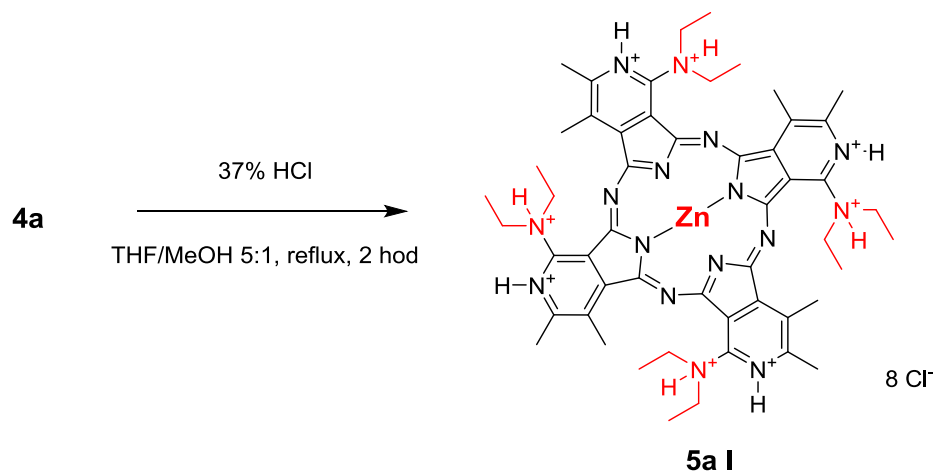
Produkt na filtrační membráně byl kvantitativně převeden do baňky, načež byl přečištěn pomocí sloupcové chromatografie nejprve s mobilní fází TOL/THF v poměru 100:1, po odstranění velké části nečistot poté TOL/CHF/THF v poměru 10:5:0,5.

Produktem je temně fialová látka jemných krystalů.

Výtěžek: 358 g (52%). Molekulová hmotnost 978,58.

$^1\text{H-NMR}$ ($\text{CDCl}_3/\text{pyridin-}d_5$ 3:1, 300 MHz): δ_{H} 1,24-1,34 (24H, m, CH_2CH_3); 3,00 (12H, br s, CH_3); 3,76 (12H, br s, CH_3), 3,87 (12H, br s, CH_3), 4,37-4,57 (16H, m, CH_2); $^{13}\text{C-NMR}$ ($\text{CDCl}_3/\text{pyridin-}d_5$ 3:1, 75 MHz): δ_{C} 12,9, 13,4, 23,0; 29,75; 45,65; 46,74, 153,7 a 156,2; IČ (ATR, cm^{-1}): 2973, 2933, 2867, 1558, 1481, 1443, 1422, 1379, 1337, 1252, 1210, 1172, 1124, 1088, 1062, 990 a 937. MS (MALDI): 976.4 $[\text{M}]^+$

Příprava hydrochloridu tetrapyrridoporfyrazinu 4a (5a I)

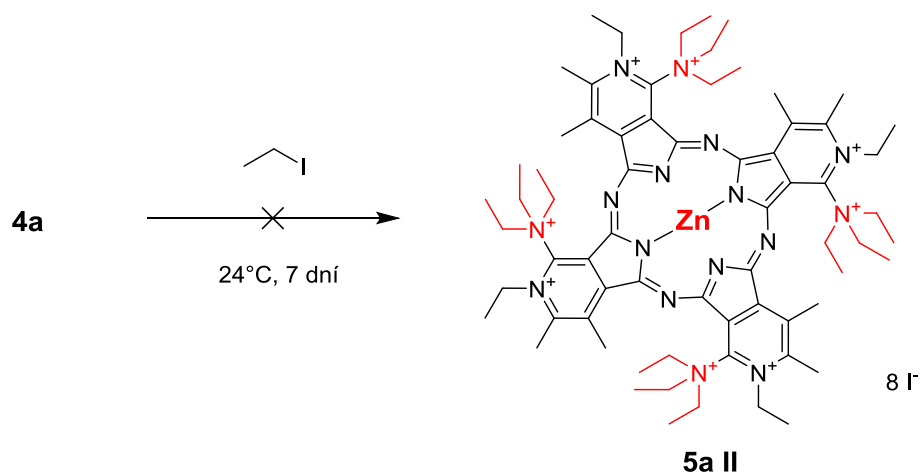


Výchozí látka **4a** (30 mg, 30,7 μmol) byla rozpuštěna ve směsi THF/MeOH, objemovým poměrem 5:1, celkem 120 ml. Do směsi bylo poté přidáno 30 ml 37% kyseliny chlorovodíkové (v/v). Reakce byla prováděna při teplotě varu rozpouštědla po dobu 2 hodin. V průběhu reakčního procesu byla patrná změna zbarvení směsi z hnědé na zelenou.

Byl přidán TOL (50 ml) a reakční mixtura byla následně za sníženého tlaku odpařena do sucha na vakuové odparce.

Látka **5a I** byla následně ihned použita k fotofyzikálním měřením.

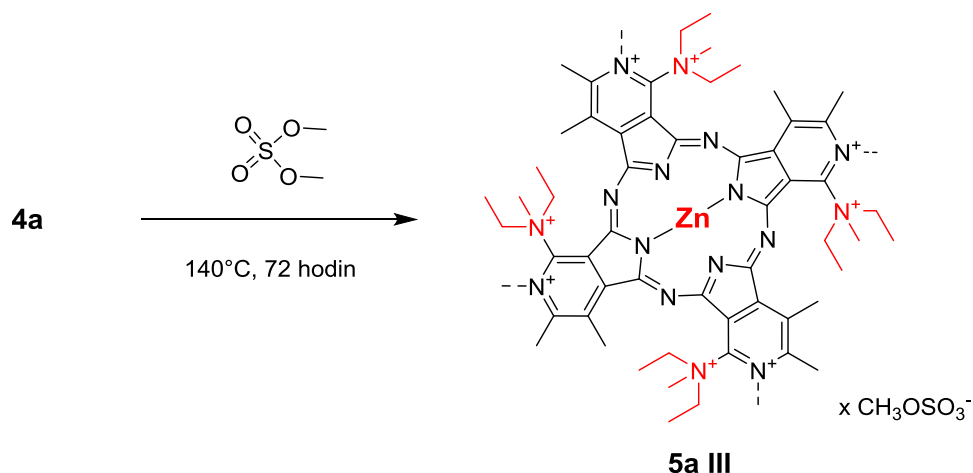
Příprava alkylovaného derivátu tetrapyrridoporfyrazinu **4a** pomocí ethyljodidu (**5a II**)



K výchozí látce **4a** (13 mg, 13,3 μmol) byl přidán ethyljodid (1 ml), který byl zároveň reaktantem i rozpouštědlem. Po několika okamžicích byla patrná tvorba drobné temně fialové suspenze. Reakce probíhala za míchání při pokojové teplotě. V reakčním čase 48 hodin byl do reakční směsi přidán NMP (2 ml). Reakce dále probíhala za míchání při pokojové teplotě 5 dní, celková reakční doba tedy činila 7 dní.

Produkt reakce, ve vodě rozpustný ethyl- derivát tetrapyrridoporfyrazinu (**5a II**), nebyl úspěšně připraven.

Příprava alkylovaného derivátu tetrapyrRIDOPORFYRAZINU **4a** pomocí dimethylsulfátu (**5a III**)



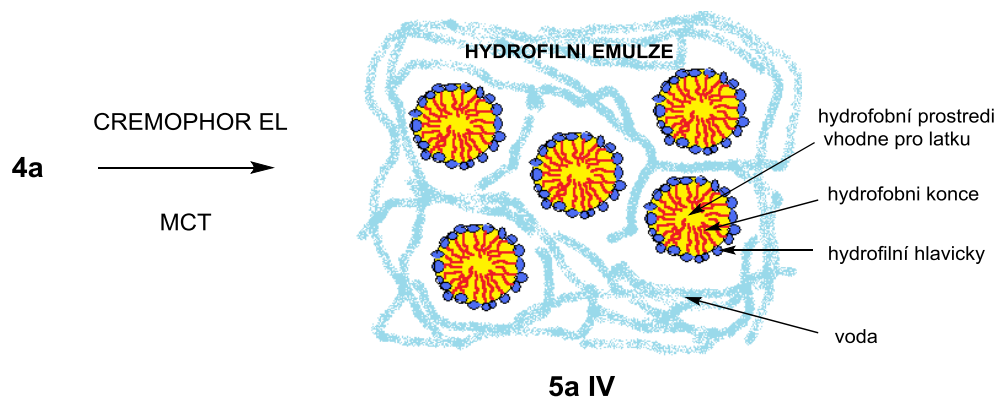
TetrapyrRIDOPORFYRAZIN **4a** (26 mg, 26,6 μmol) byl smíchán s dimethylsulfátem (2 ml), jenž v této reakci plnil jak úlohu reaktantu, tak rozpouštědla. Po 24 hodinách míchání za teploty 140°C byl do reakční směsi přidán NMP (2 ml), přičemž na tuto akci byla patrná bouřlivá odpověď tmavě zelené reakční směsi. Reakce dále pokračovala 48 hodin při stejné teplotě, tedy 140°C.

Čištění produktu bylo započato přidáním acetonu, což bylo doprovázeno vznikem tmavé sraženiny produktu. Dále byla provedena prostá filtrace a následné promytí filtrační membrány acetonem. Čištění produktu pokračovalo trojnásobným přesrážením produktu z MeOH do diethyletheru. Jakožto finální krok čistícího procesu byl produkt vytřepán mezi vodu a CHF. Vodná vrstva byla odpařena do sucha. Methylovaný tetrapyrRIDOPORFYRAZIN **5a III** byl nakonec seškrábán do acetonu a suspenze byla prostou filtrací zfiltrována.

Produktem je tmavě hnědá krystalická pevná látka.

Výtěžek: 27 mg (51,1%). Molekulová hmotnost 1986,85.

Příprava hydrofilní emulze tetrapyridoporfyrinu 4a (5a IV)



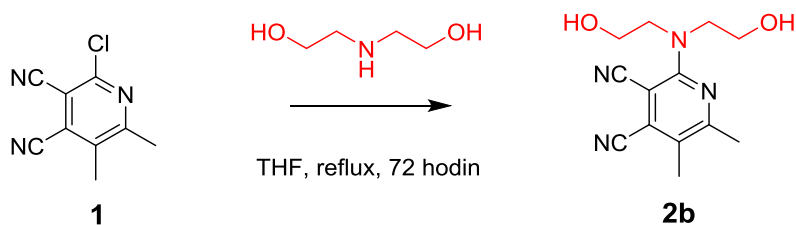
Pro přípravu hydrofilní emulze o koncentraci 50 $\mu\text{mol/l}$ byla použita látka **4a** (0,245 mg, 0,25 μmol), hydrofilní emulgátor CREMOPHOR EL (50 mg), MCT (20 mg) a médium (5 ml).

Složky byly naváženy do baňky, rozpuštěny v CHF a odpařeny do sucha (20 min, 5 mbar) na rotační vaukové odparce. Následně bylo přidáno médium (5 ml) a vzniklá emulze důkladně protřepána pomocí vortexu (5 min).

Vzniklá mikroemulze byla ihned podrobena fotofyzikálním a biologickým testům.

Látka b:

Příprava 2-(bis(2-hydroxyethyl)amino)-5,6-dimethylpyridin-3,4-dikarbonitrilu (2b)



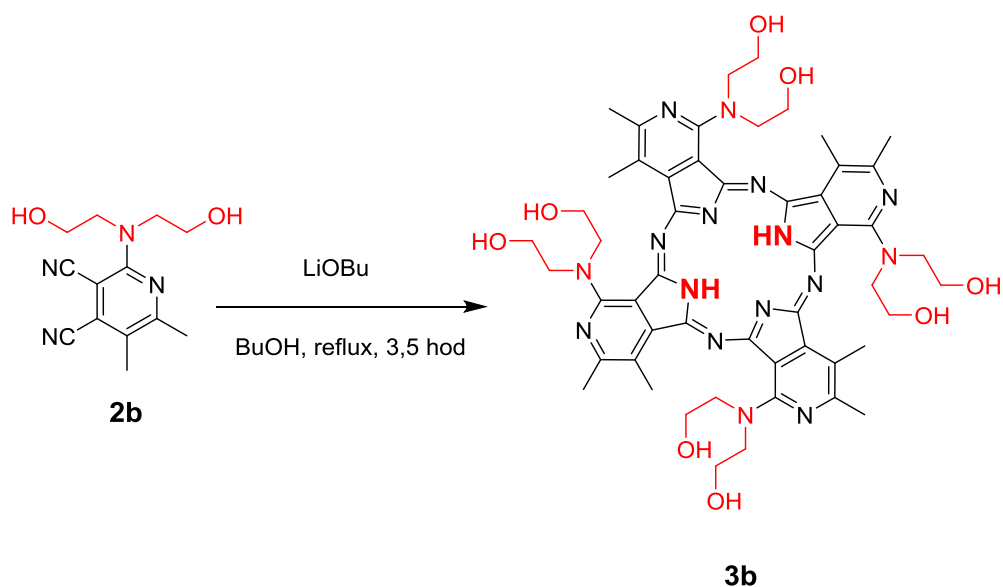
K elementárnímu prekursoru **1** (2,01 g, 10,49 mmol) rozpuštěnému v THF (80 ml) byl po kapkách přidán diethanolamin (15,32 g, 145,71 mmol). Vzhledem k hustě sirupovitému charakteru této látky bylo přikapávání provedeno po předchozím rozpuštění reaktantu v malém množství THF. Bylo možné pozorovat postupnou změnu zbarvení reakční směsi do žluta. Směs byla dále míchána při teplotě varu rozpouštědla po dobu 72 hodin. Průběh reakce byl kontrolován pomocí TLC s mobilní fází CHF/aceton v poměru 5:1.

Látka odpovídající produktu byla přečištěna pomocí sloupcové chromatografie, a to dvakrát. Jako mobilní fáze první kolony byl použit CHF/aceton 5:1, druhé CHF/aceton 5:2. Výsledným produktem byla nahnědle žlutá krystalická látka.

Výtěžek: 1,48 g (54%). Molekulová hmotnost 260,13.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz): δ_{H} 2,37 (3H, s, CH_3); 2,45 (3H, s, CH_3); 3,95 (8H, s, CH_2); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 75 MHz): 16,4; 23,8; 54,2; 61,5; 88,6; 114,4; 116,7; 124,0; 127,0; 156,1 a 162,4. IČ (ATR, cm^{-1}): 3292, 2926, 2854, 2613, 2208 (CN), 1625, 1580, 1546, 1494, 1453, 1396, 1376, 1255, 1178, 1077, 1048, 1029, 1008, 982, 891 a 831.

Příprava symetrického bezkového tetrapyrrodo-porfyrinu z prekursoru **2b** cyklotetramerizační reakcí (**3b**)



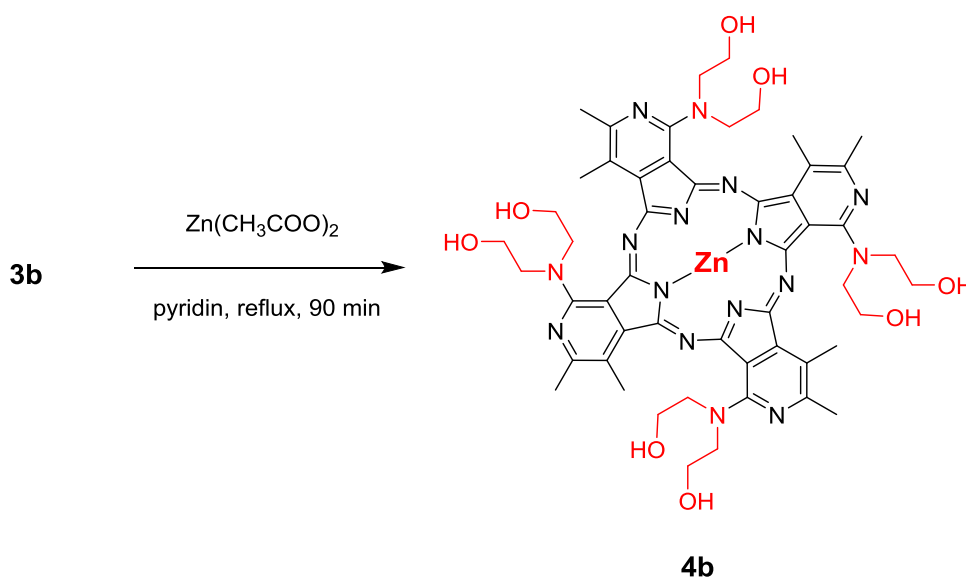
K výchozí látce **2b** (0,491 g, 1,888 mmol) rozpuštěné v čerstvě předestilovaném BuOH (20 ml) bylo přidáno kovové Li⁰ (118,8 mg, 17,12 mmol). Byla patrná okamžitá změna zbarvení na temně fialovou. Reakční směs byla míchána při teplotě zajišťující var (145°C) po dobu 3,5 hodiny. Kvůli udržení bezvodého prostředí reakce byl vrchol zpětného chladiče opatřen silikagelovým uzávěrem.

Průběh reakce byl kontrolován pomocí TLC o mobilní fázi CHF/THF/MeOH v poměru 5:2:1.

Tmavě fialová látka byla po odpaření přebytečného rozpouštědla (BuOH) do sucha použita bez dalšího čištění do následující reakce.

Výtěžek: 600 mg nepřečištěné reakční směsi. Molekulová hmotnost 1043,20.

Příprava tetrapyridoporfyrazinu se zinečnatým kationtem koordinovaným v centru molekuly odvozeného od látky 3b (4b)



Výchozí látka **3b** (600 mg nepřečištěné směsi z předchozí reakce, přibližně 0,575 mmol) byla smíchána s octanem zinečnatým (660 mg, 3,60 mmol) v pyridinu jako rozpouštědla. Reakce byla po dobu 90 minut zahřívána při teplotě varu rozpouštědla. Zpětný chladič byl opatřen silikagelovým uzávěrem. Průběh reakce byl kontrolován pomocí TLC o mobilní fázi CHF/THF/MeOH v poměru 5:2:3.

Po částečném vychladnutí reakční směsi bylo rozpouštědlo odpařeno do sucha za sníženého tlaku na vakuové odparce.

Produkt reakce byl přečištěn následujícím způsobem. Nejdříve byla směs produktu a nečistot rozpuštěna ve směsi rozpouštědel (voda, MeOH, CHF, aceton a THF), poté byl v malém množství přidán silikagel a následně byla rozpouštědla odpařena na vakuové odparce do sucha. Takto byla reakční směs na silikagel adsorbována. Dále byla provedena sloupcová chromatografie o krátké délce kolony. Jako mobilní fáze byla použita v následujícím pořadí tato rozpouštědla: hexan-TOL-aceton-THF-MeOH-CHF. První čtyři sloužila k odstranění oranžově zbarvených nečistot, MeOH a CHF k vymytí produktu ze silikagelové vrstvy.

Průběh čištění byl kontrolován zejména pomocí měření absorbance a absorpčních spekter frakcí, dále také pomocí TLC s mobilní fází CHF/THF/MeOH v poměru 5:2:5.

Látka **4b** byla následně rozpuštěna v MeOH a přesrážena nakapáním do acetonu. Vzhledem ke stále se vyskytující části nečistot byl produkt dále přečištěn pomocí reverzní sloupcové chromatografie nejprve s mobilní fází DMF/voda v poměru 2:1, poté s čistým DMF. Frakce po přečištění byly kontrolovány pomocí stanovení absorpčních spekter a reverzní TLC s mobilní fází DMF/voda 5:1.

Produktem je tmavá, modrá, lehce nahnědlá a nafialovělá krystalická látka.

Výtěžek: 46 mg (2,2%). Molekulová hmotnost 1106,57.

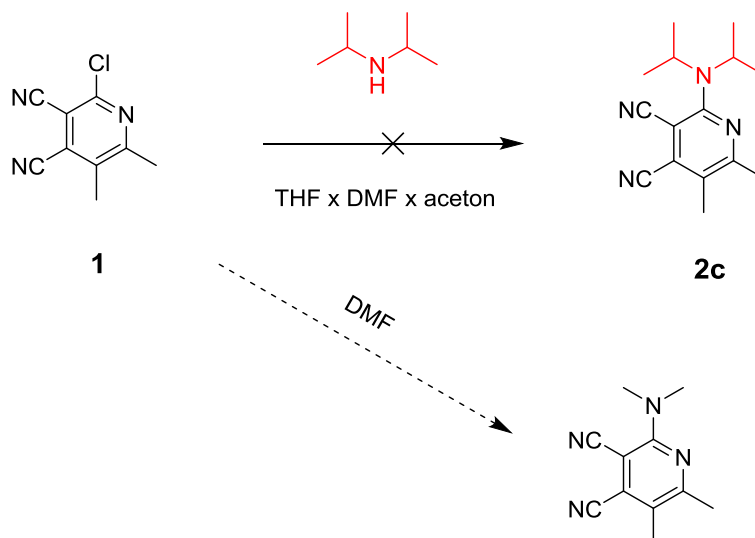
$^1\text{H-NMR}$ ($\text{CDCl}_3/\text{pyridin-}d_5$ 3:1, 300 MHz): δ_{H} 2,32 (12H, s, CH_3); 2,44 (12H, s, CH_3); 3,37 (28H, s, CH_2); 3,62 (4H, s, CH_2); 4,32 (4H, s, OH) a 4,62 (4H, s, OH); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 75 MHz): signály nebyly patrné vlivem silné agregace a špatné rozpustnosti vzorku. IČ (ATR, cm^{-1}): 2924, 2853, 1659, 1573, 1418, 1388, 1258, 1197, 1140, 1057 a 841. MS (MALDI): 1104,4 $[\text{M}]^+$

Látka c:

Příprava

2-diisopropylamino-5,6-dimethylpyridin-3,4-

dikarbonitrilu (2c)



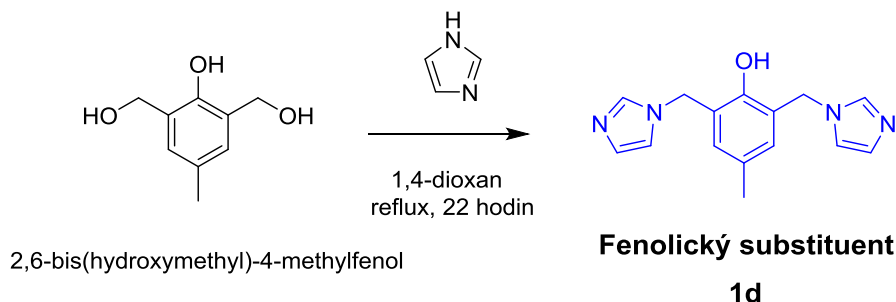
Experimentální syntéza látky **2c** byla provedena následujícím způsobem. Do tří baněk byl navážen elementární prekurzor **1** (50 mg, 0,261 mmol) a přidán nadbytek diisopropylaminu (132 mg, 1,31 mmol). Do každého vzorku bylo přidáno jiné rozpouštědlo, a to THF, DMF a aceton. Směsi byly míchány při teplotě varu rozpouštědla. Průběh reakce byl kontrolován pomocí TLC s mobilní fází CHF, CHF/TOL poměru 1:1 a CHF/aceton v poměru 5:1. Po uplynutí 21 hodin nebyl v žádné z reakčních směsí detekován produkt. Dále byl proveden obdobný pokus reakce se stejným množstvím výchozích látek, jako je uvedeno výše, s rozpouštědly THF v prvním vzorku a ACN ve druhém. Tyto reakční směsi byly podrobeny mikrovlnnému záření. Ani v tomto případě nebyly detekovány žádné stopy po produktu. Dalším pokusem přípravy látky **2c** bylo použití vysokého molárního nadbytku, dvacetinásobku, diisopropylaminu vůči elementárnímu prekurzoru **1**. Jako rozpouštědlo byl použit ACN, reakční čas byl 12 hodin. Produkt nebyl detekován. Látka **2c** tedy nebyla navzdory množství syntetických pokusů úspěšně připravena. Nicméně v reakčních směsích, u nichž byl jako rozpouštědlo použit DMF, byl detekován dimethylamino-derivát látky **1**.

Data pro vedlejší produkt: $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz): δ_{H} 2,36 (3H, s, CH_3); 2,45 (3H, s, CH_3); 3,29 (6H, s, NCH_3); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 75 MHz): 16,4; 23,8; 40,2; 87,9; 114,6; 116,8; 122,9; 126,5; 157,3 a 162,0. IČ (ATR, cm^{-1}): 2948, 2203 (CN), 1578, 1550, 1502, 1403, 1376, 1261, 1178, 1102, 1064, 1009, 958 a 881.

O- SÉRIE LÁTEK

Látka d:

Příprava 2,6-bis((1*H*-imidazol-1-yl)methyl)-4-methylfenolu, fenolického substituentu (1d)



Příprava fenolického substituentu byla inspirována postupem, jenž byl již dříve popsán v literatuře ^{52 53}. Východí fenolická látka, 2,6-bis(hydroxymethyl)-4-methylfenol (5,02 g, 29,85 mmol), byla smíchána s 1*H*-imidazolem (5,40 g, 79,32 mmol). Jako rozpouštědlo byl použit 1,4-dioxan (50 ml). Reakční směs byla ponechána k interakci, a to za podmínek zajišťující var rozpouštědla po dobu 22 hodin. Ihned po krátkém časovém úseku od začátku reakce byla jasně patrná změna zbarvení z nažloutlé na méně zbarvený, více čirý odstín žluté až bílé.

Průběh reakce byl kontrolován pomocí TLC s ethylacetátem jako mobilní fází a dále pomocí Dragendorffova činidla detekujícího terciární aminy.

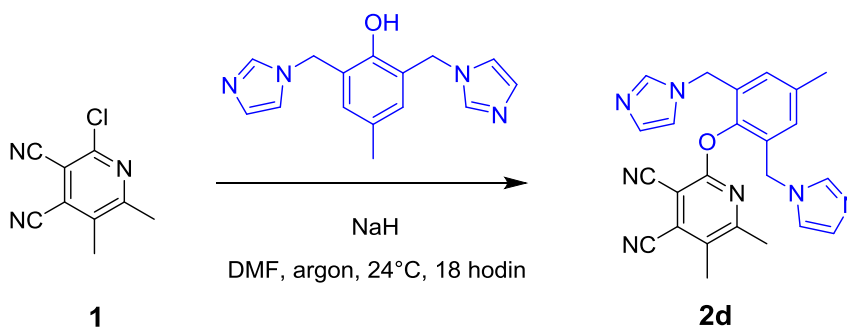
Po uplynutí reakční doby bylo přebytečné rozpouštědlo odpařeno do sucha na vakuové odparce. Takto upravená reakční směs byla za horka rozpuštěna v ethanolu. Poté byla do baňky přidána voda (160 ml), přičemž byl pozorován vznik bílého zákalu. Baňka s reakční směsí byla uložena do chladničky, a takto ponechána 24 hodin při teplotě 2-8°C.

Dalším krokem čištění a tedy izolace produktu byla vakuová filtrace. Produkt zachycený na filtrační membráně byl rekrystalizován opětovným rozpuštěním v minimálním množství ethanolu a nakapáním do vody (500 ml). Poté byl zopakován postup obsahující uložení bílé suspenze v chladničce s následnou filtrací.

Výtěžek: 2,78 g (35%). Molekulová hmotnost 268,32.

$^1\text{H-NMR}$ (aceton- d_6 , 300 MHz): δ_{H} 2,10 (3H, s, CH_3); 5,14 (4H, s, CH_2); 6,77 (2H, s, ArH); 6,86 (2H, s, imidazol); 7,11 (2H, s, imidazol) a 7,66 (2H, s, imidazol); $^{13}\text{C-NMR}$ (aceton- d_6 , 75 MHz): 20,3; 45,2, 119,7; 125,9; 128,5; 129,1; 129,6, 137,6 a 149,9. IČ (ATR, cm^{-1}): 3103, 2912, 1508, 1491, 1448, 1431, 1393, 1353, 1336, 1308, 1289, 1273, 1259, 1224, 1157, 1107, 1084, 1071, 1033 a 989. Naměřená data odpovídají datům v literatuře ⁵².

Příprava 2-(2,6-bis((1*H*-imidazol-1-yl)methyl)-4-methylfenoxy)-5,6-dimethylpyridin-3,4-dikarbonitrilu (**2d**)



K fenolickému substituentu **1d** (2,697 g, 10,01 mmol) byl přidán NaH (0,241 g, 10,01 mmol). Od této chvíle až do konce byla reakce prováděna v argonové atmosféře. Pomocí injekční jehly bylo přidáno rozpouštědlo, tedy bezvodý DMF (40-50 ml). Po chvíli míchání za pokojové teploty byl do reakční směsi přidán elementární prekurzor **1** (1,600 g, 8,35 mmol). Byla pozorována okamžitá změna zbarvení na červenou. Celkový reakční čas, během něhož byla reakční směs míchána za pokojové teploty, činil 18 hodin.

Průběh reakce byl kontrolován pomocí TLC s mobilní fází ethylacetát/triethylamin/MeOH v dílčím poměru 30:1:5 a pomocí Dragendorffova činidla. Produktem je látka s retenčním faktorem 0,4-0,5, která interaguje s Dragendorffovým činidlem.

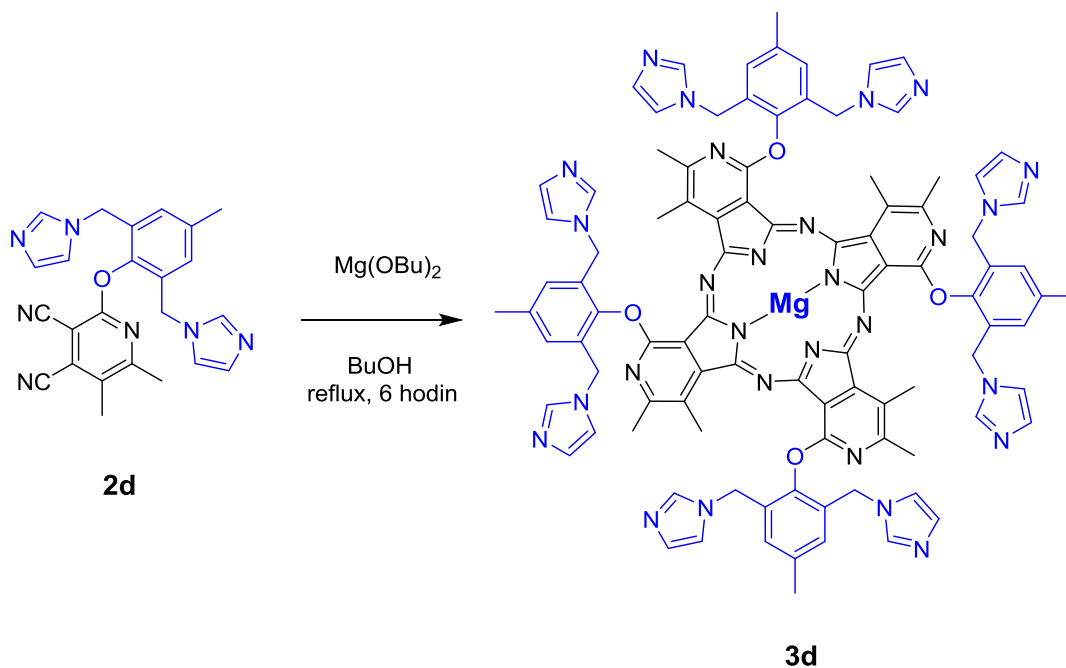
Produkt byl přečištěn sloupcovou chromatografií o mobilní fází ethylacetát/triethylamin/MeOH v poměru 30:1:5. Vizuálně byla frakce produktu tmavě modrá a předcházela jí žlutě zbarvená frakce patřící jedné z nečistot. Přebytečné rozpouštědlo bylo z produktové frakce odpařeno do sucha na vakuové odparce.

Produktem je tmavě modrá, nafialovělá pevná látka.

Výtěžek: 2,57 g (72,5%). Molekulová hmotnost 423,48. T.t. 164,4-167,8°C.

^1H NMR (500 MHz, Aceton- d_6): δ_{H} 7,43 (2H, s, imidazol); 7,22 (2H, s, ArH); 6,96 (2H, t, $J = 1,3$ Hz, imidazol); 6,76 (2H, t, $J = 1,1$ Hz, imidazol); 5,14 (4H, s, CH_2); 2,46 (3H, s, CH_3); 2,37 (3H, s, CH_3); 2,28 (3H, s, CH_3). ^{13}C NMR (126 MHz, Aceton- d_6): δ_{C} 164,2; 160,9; 146,8; 138,1; 138,0; 131,6; 131,5; 130,9; 129,5; 126,5; 120,0; 114,5; 113,6; 95,9; 46,1; 23,4; 209 a 16,8. IČ (ATR, cm^{-1}): 3113, 2359, 1574, 1560, 1507, 1474, 1442, 1417, 1399, 1330, 1281, 1240, 1205, 1142, 1106, 1077, 1034, 1001 a 948. MS (ESI): 424,2 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Příprava tetrapyridoporfyrazinu s hořečnatým kationtem koordinovaným v centru molekuly z prekurzoru 2d (3d)



Do baňky byl navážen kovový Mg^0 (1,00 g, 41,15 mmol), k němuž byl posléze přilít čerstvě předestilovaný BuOH (85 ml). Tato dvojice látek byla ponechána k vzájemné interakci za míchání při teplotě varu rozpouštědla po dobu 2 hodin. Takto došlo ke vzniku butanolátu hořečnatého *in situ*. Poté byl do reakce přidán prekurzor **2d** (2,5 g, 5,90 mmol) a ta dále pokračovala za míchání při stejné teplotě po dobu 6 hodin. Po chvíli byl patrný přechod zbarvení reakční směsi na sytě zelenou.

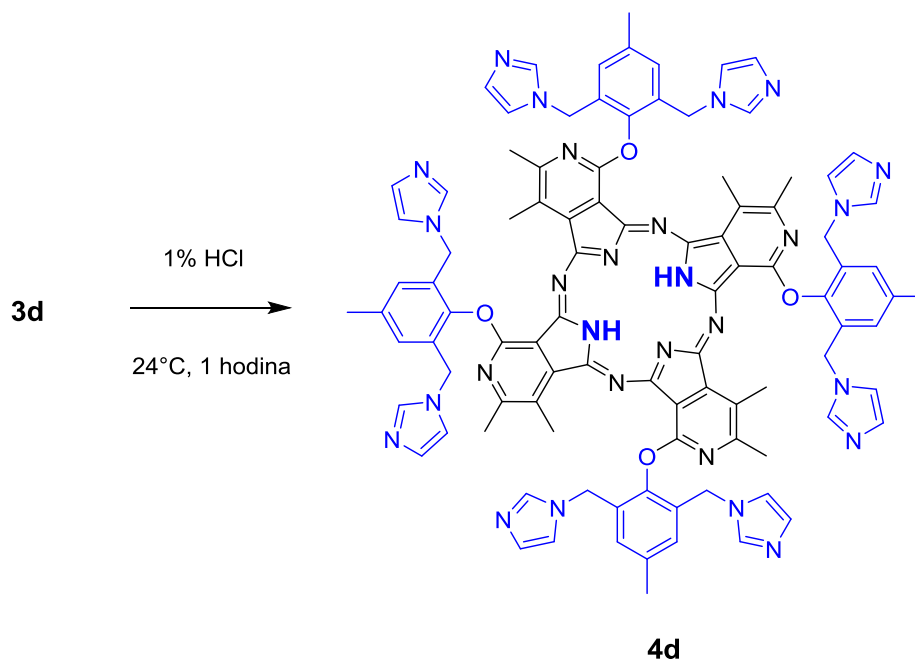
Produkt byl z reakční směsi izolován mnohonásobnou extrakcí pomocí CHF a THF. Následovala filtrace, a to nejdříve vakuová, poté prostá. Průběh reakce a chování látky **3d** bylo pozorováno pomocí TLC s mobilní fází CHF/MeOH 1:1 a TLC se stacionární fází obsahující Al_2O_3 a mobilní fází CHF/THF 1:1. Dokonalejší přečištění produktu nebylo po tomto syntetickém kroku provedeno vzhledem k chování a vlastnostem látky- zejména kvůli ulpívání na silikagelu. Hrubý produkt byl použit do další reakce.

Produktem je sytě zelená krystalická látka.

Výtěžek: 3 g hrubého produktu. Molekulová hmotnost 1718,23.

MS (MALDI): 1717,6 $[\text{M}+\text{H}]^+$

Příprava symetrického bezkového tetrapyridoporfyrazinu odstraněním hořečnatého kationtu z koordinačního centra látky **3d** (**4d**)



K nepřečištěnému produktu předchozí reakce, tedy k látce **3a** (3 g, přibližně 1,75 mmol) bylo přidáno přiměřené množství 1% kyseliny chlorovodíkové (v/v). Reakční směs byla míchána za pokojové teploty po dobu jedné hodiny. Poté bylo pH reakční směsi ovlivněno přidáním takového množství 10% roztoku NaOH (m/m), aby výsledkem byla mírně zásaditá reakce. Ihned byla patrná tvorba sraženiny produktu. Ten byl poté zfiltrován a filtrační membrána byla promyta vodou až do neutrální reakce.

Reakce proběhla bez změny zbarvení.

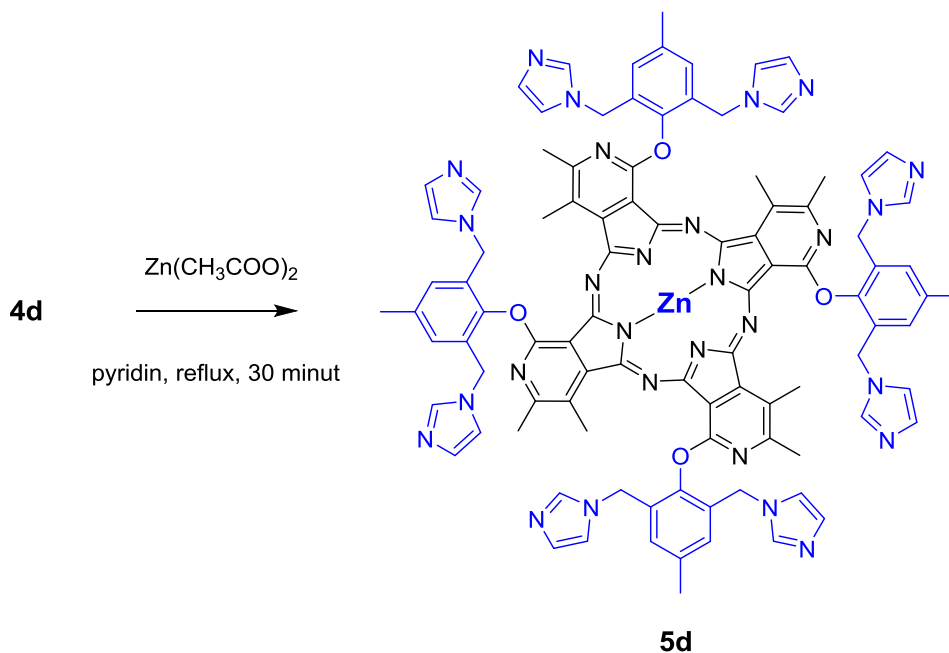
Chování látky **4d** bylo zkoumáno pomocí TLC s mobilní fází CHF/THF/triethylamin/MeOH v poměru 10:3:3:5.

Dokonalejší přečištění produktu nebylo po tomto syntetickém kroku provedeno vzhledem k chování a vlastnostem látky (ulpívání na vrstvě silikagelu). Hrubý produkt byl použit do další reakce.

Produktem je sytě zelená krystalická látka. Výtěžek: 2,43 g hrubého produktu. Molární hmotnost 1695,94.

MS (MALDI): 1695,7 [M+H]⁺

Příprava tetrapyridoporfyrazinu se zinečnatým kationtem koordinovaným v centru molekuly odvozeného od látky 4d (5d)



Výchozí látka **4d** (2,43 g, 1,43 mmol) byla rozpuštěna v optimálním množství pyridinu (80ml). Poté byl přidán octan zinečnatý (1,84 g, 10,05 mmol). Reakce probíhala 30 minut při teplotě zajišťující var rozpouštědla. Zpětný chladič byl opatřen silikagelovým uzávěrem. Byla detekovatelná změna odstínu zelené barvy reakční směsi na tmavší.

Po ukončení reakčního procesu byla směs zahuštěna za sníženého tlaku na vakuové odparce. Následně bylo přidáno relativně velké množství vody (180-200 ml). Vzhledem k tomu, že očekávaný vznik suspenze produktu neproběhl, dalším krokem byla mnohonásobná extrakce látky **5d** do CHF. Během extrakce byla patrná tvorba jak vodné a chloroformové vrstvy, tak tvorba prostřední, těžko definovatelné, „emulzní“ vrstvy. Proto bylo do směsi přidáno vhodné množství EDTA a nasyceného roztoku NaCl („brine“). Všechny chloroformové frakce byly spojeny a rozpouštědlo bylo následně kompletně odpařeno.

Celá vodná vrstva a vrstva ne zcela známého složení byly vakuově zfiltrány a promyty vodou. Na filtrační membráně bylo zachyceno znatelné množství pevných částic, plasticky-voskovitého charakteru, v barvě produktu, tedy tmavě zelené. Po vyschnutí tohoto pevného podílu byla přidána voda a 3% kyselina chlorovodíková (v/v). Za pomoci

tohoto média byl produkt postupně rozpouštěn. Proces probíhal pozvolna, velice dlouho, a to do té doby, než pevné částice zcela neztratily zelené zbarvení. Poté byla provedena jak vakuová tak prostá filtrace a filtrační membrány byly promyty vodou a 3% kyselinou chlorovodíkovou (v/v) v dostatečném množství.

Tato produktová frakce byla spojena s frakcí produktu získanou odpařením chloroformové vrstvy po původní mnohonásobné extrakci, která byla předtím rozpuštěna ve stejném médiu (voda, 3% HCl) a zfiltrována.

Následně byl tento kyselý roztok s rozpuštěným produktem několikrát vytřepán s CHF pro odstranění nečistot organického původu. Poté byla vodná vrstva zneutralizována 10% roztokem NaOH (m/m) do změny pH na lehce zásadité. Byla patrná tvorba suspenze produktu. Produkt byl v následujícím kroku několikanásobně vytřepán do CHF. Opět byla přidána EDTA a nasycený roztok NaCl. Všechny organické frakce byly smíchány a odpařeny na vakuové odparce do sucha.

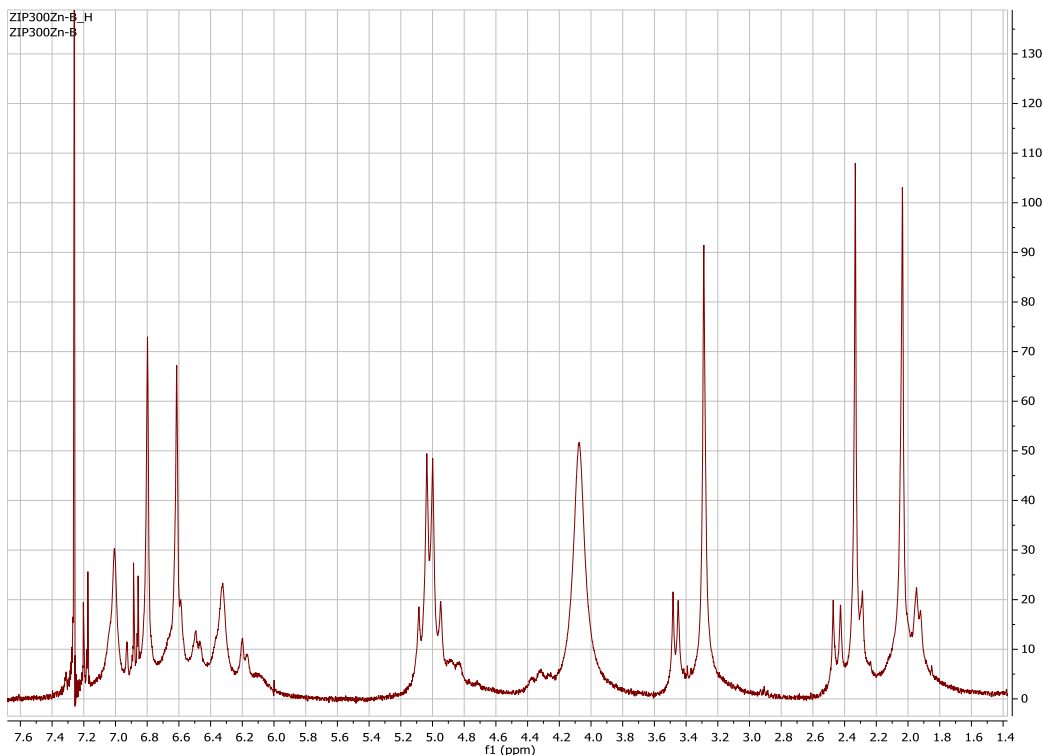
Finálním krokem čištění látky **5d** bylo nakapání produktu z CHF do hexanu. Vzniklá suspenze byla vakuově zfiltrována.

Chování produktu, látky **5d**, bylo také analyzováno pomocí TLC s mobilní fází CHF/THF/triethylamin/MeOH 10:3:3:5 a CHF/THF/triethylamin/MeOH 10:3:0,5:3. Na základě výsledků tohoto zkoumání byl stanoven jednoznačný závěr, že sloupcová chromatografie je nevhodnou metodou pro čištění nejen látek **3d** a **4d**, ale taktéž látky **5d**.

Produktem je tmavě zelená, krystalická látka.

Výtěžek: 1,50 g (14,4% - počítáno z původního množství prekurzoru pro cyklizaci).
Molekulová hmotnost 1759,30.

Na $^1\text{H-NMR}$ je možno rozeznat 2 polohové izomery – C_{4h} and C_{2v} v poměru přibližně 3:1, přítomnost ostatních izomerů je sice minimální, ale nemůže být vyloučena:



Data pro C_{4h} isomer: ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃/Pyridin-*d*₅ 3:1) δ_H 7,46 – 7,32 (8H, m); 7,16 (8H, s); 7,01 – 6,94 (8H, m); 6,76 – 6,61 (8H, m); 5,48 – 5,29 (16H, m, CH₂); 3,65 (12H, s, CH₃); 2,75 – 2,63 (12H, m, CH₃); 2,47 – 2,35 (12H, m, CH₃).

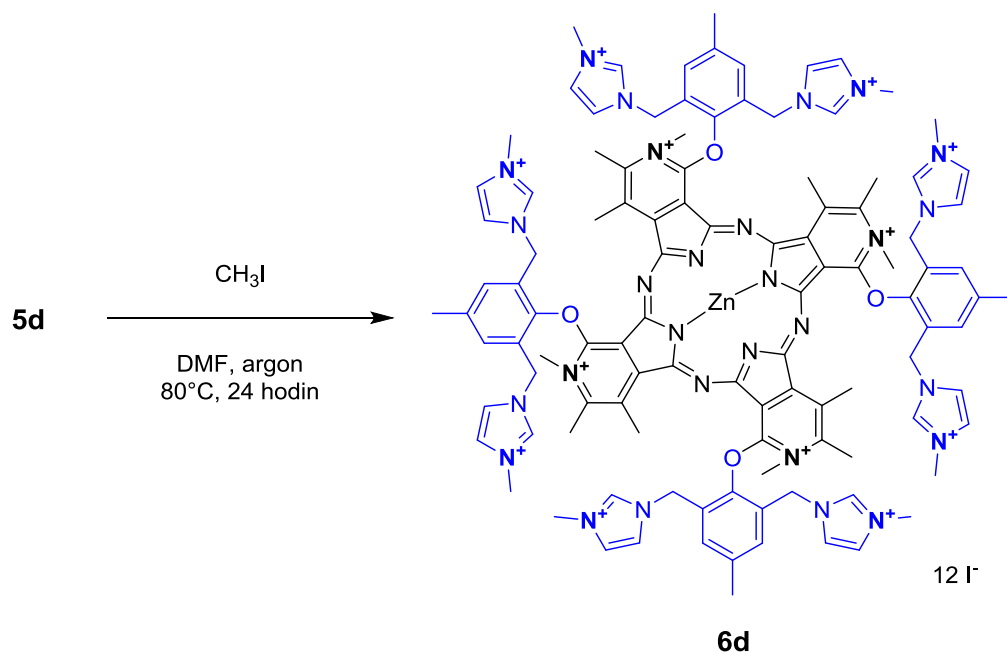
Data pro C_{2v} isomer: ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃/Pyridin-*d*₅ 3:1) δ_H 7,59 – 7,55 (4H, m); 7,55 – 7,52 (4H, m); 7,27 – 7,24 (4H, m); 7,23 – 7,19 (4H, m); 6,89 – 6,80 (8H, m); 6,60 – 6,50 (8H, m); 5,29 – 5,14 (16H, m, CH₂); 3,84 (6H, s, CH₃); 3,81 (6H, s, CH₃); 2,83 (6H, s, CH₃); 2,78 (6H, s, CH₃) a 2,34 – 2,25 (12H, m, CH₃).

Data pro směs izomerů: ¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃/Pyridin-*d*₅ 3:1) δ_C 157,4; 155,3; 154,7; 152,4; 148,2; 146,3; 139,2; 137,2; 136,4; 133,5; 130,7; 130,6; 128,5; 124,9; 119,6; 117,2; 46,6; 22,6; 21,1 a 13,9.

IČ (ATR, cm⁻¹): 3112, 2919, 1596, 1506, 1477, 1441, 1416, 1383, 1332, 1273, 1229, 1197, 1140, 1078, 1034, 1002 a 926.

MS (MALDI): 1756,5 [M]⁺

Příprava alkylovaného derivátu tetrapyridoporfyrazinu **5d** pomocí methyljodidu (**6d**)



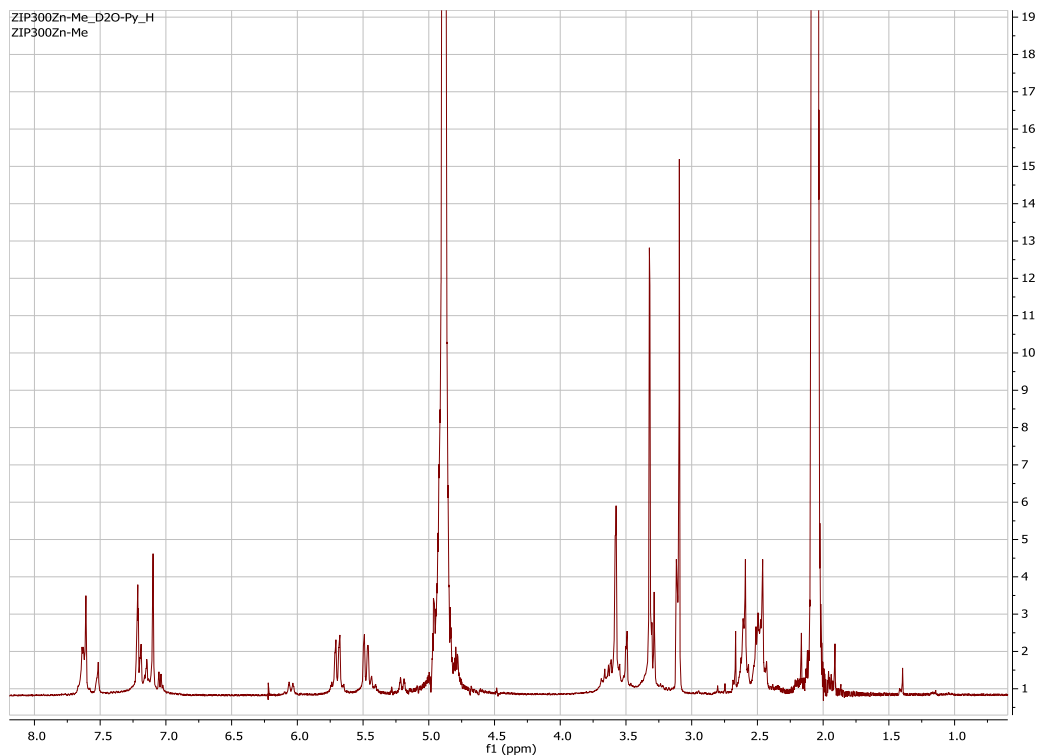
Tato reakce byla založena na postupu popsaném již dříve v literatuře pro podobnou molekulu ⁵³. Látka **5d** (400 mg, 0,227 mmol) byla navážena do baňky a rozpuštěna v bezvodém DMF (5ml). Celá operace již probíhala v argonové atmosféře. Poté byl přidán methyljodid (510 μl = 1162 mg, 8,185 mmol). Reakční směs byla míchána a zahřívána 24 hodin při teplotě 80°C.

Po ukončení reakce bylo rozpouštědlo pečlivě odpařeno na vakuové odparce do sucha. Poté byl přidán aceton, což vedlo k vysrážení suspenze produktu. Ta byla zfiltrována a důkladně promyta acetonem.

Produktem je tmavě zelená pevná krystalická látka.

Výtěžek: 118 mg (15%). Molekulová hmotnost 3462,57.

¹H NMR spektrum má komplexní charakter a není možné ho použít k jednoznačnému potvrzení struktury:



^{13}C NMR (126 MHz, D_2O /pyridin- d_5 3:1) δ_{C} 158.07, 154.83, 154.61, 152.17, 148.29, 145.98, 138.30, 135.76, 133.59, 127.45, 125.34, 123.25, 122.26, 116.67, 55.05, 48.84, 35.56, 21.93, 20.07, 13.47.

Elementární analýza: vypočteno pro $\text{C}_{107}\text{H}_{117}\text{I}_{11}\text{N}_{28}\text{O}_4\text{Zn}$: N 11,33; C 37,46; H 3,49; nalezeno: N 11,74; C 38,43; H 4,17 (po první alkylaci: N 11,88; C 38,67; H 3,96).

FOTOFYZIKÁLNÍ MĚŘENÍ

Stanovení absorpčních spekter látek:

Absorpční spektra byla měřena na roztocích látek o přesné koncentraci 1 $\mu\text{mol/l}$, přičemž postup k získání takto koncentrovaných roztoků byl následující:

Bylo naváženo přibližně 0,5 mg měřené látky s přesností na tisícinu miligramu. Poté bylo přidáno takové množství rozpouštědla, aby cílová koncentrace látky byla 100 $\mu\text{mol/l}$. Toto množství bylo vypočteno ze vztahu:

$$V = \frac{m}{M c}$$

Do kyvety bylo poté pomocí pipety přidáno 2,475 ml rozpouštědla a pomocí transferpatoru 25 μl připraveného 100 μM zásobního roztoku dané sloučeniny.

Měření byla prováděna proti standardu představovým kyvetou s čistým rozpouštědlem.

Stanovení extinkčního koeficientu látek:

Extinkční koeficienty ϵ [$\text{cm}^{-1} \text{dm}^3 \text{mol}^{-1}$] byly vypočítány pomocí Lambert-Beerova zákona:

$$\epsilon = \frac{A}{c d}$$

A - absorbance, c - koncentrace [mol/l], d - tloušťka kyvety [cm]

VÝSLEDKY A DISKUZE

Cílem mé diplomové práce bylo syntetizovat zcela nové, potenciálně vysoce účinné fotosenzitizéry použitelné pro PDT. Struktura každé z připravovaných látek byla předem pečlivě navržena tak, aby v maximální míře přispívala ke zlepšení účinnostního profilu finální molekuly.

Klíčovými čtyřmi předem ovlivnitelnými vlastnostmi zajišťujícími vysokou účinnost PS jsou:

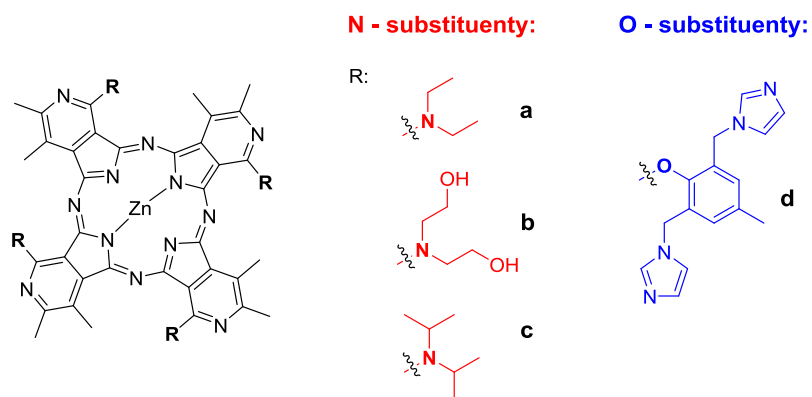
- schopnost absorpce světla v IČ oblasti 700-800 nm
- rozpustnost ve vodě (v případě plánovaného systémového podání PS)
- schopnost látky zůstat monomerní ve vodném prostředí a netvořit nefunkční agregáty
- vysoký kvantový výtěžek singletového kyslíku neboli schopnost přeměnit velkou část energie nabyté světlem na tvorbu vysoce cytotoxických molekul singletového kyslíku

Pro celou sérii molekul připravovaných v rámci této mé práce byl zvolen tetrapyridoporfyrizinový základní skelet. Tato volba byla provedena naprosto racionálně a s jasnou vizí- dosáhnout vysokého absorpčního posunu. Oproti skeletu ftalocyaninovému (či azaftalocyaninovému) je tento základ schopen umožnit finální látce absorpci světla v ještě vyšším horizontu vlnových délek, optimálně právě až v blízkosti „ideální“ hranice 800 nm. Dále také tato strukturální kostra nabízí i dostatečnou variabilitu periferní substituce.

Jakožto kationt kovu koordinovaný v centru molekul byl zcela záměrně použit kationt zinečnatý, a to z důvodu jeho efektu na zvýšení kvantového výtěžku singletového kyslíku a minoritně také kvůli jeho dobré dostupnosti a ceně.

Naprosto krucální pro výsledné vlastnosti látek, a tedy míru jejich účinnosti jakožto fotosenzitizérů, byla volba periferních substituentů k centrálnímu tetrapyridoporfyrizinovému skeletu. Dle struktury a také určitého důrazu na jednotlivé

finální vlastnosti lze syntetizované látky zahrnuté v této práci rozdělit do dvou skupin, a to na látky s **N**-substituenty a **O**-substituenty, jak již bylo zmíněno výše (Obr. 8).

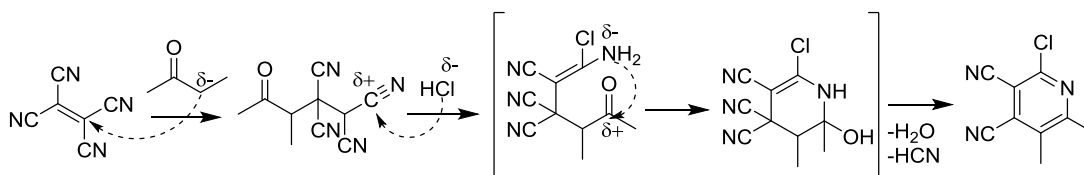


Obr. 8. (opakování) Názorné schéma všech syntetizovaných látek a jejich rozdělení do dvou skupin dle typu periferního substituentu.

Tetra-3,4-pyridoporfyraziny s N-substituenty

První skupina, deriváty tetrapyridoporfyrazinu s N-substituenty, sestávala ze tří původně navržených molekul- **a**, **b** a **c**. Tyto látky byly designovány s primárním cílem dosáhnout u nich absorpčního posunu tak vysoko v tzv. blízké IČ oblasti („near infra red region“, NIR), jak jen to bude možné. Z předchozích výzkumných projektů a zkušeností vyplývá, že právě molekuly s periferními substituenty vázanými přes atomy dusíku vynikají svou schopností vysokého absorpčního posunu⁵⁴ Vzhledem k obecnému charakteru a reaktivitě aminů bylo předpokládáno, že následná příprava ve vodě rozpustných derivátů finálních látek založená zejména na alkylaci (tvorba kvarterních amoniových solí) či případně protonizaci (tvorba solí) by měla být relativně snadno proveditelná. Tímto by bylo možné zajistit další z klíčových vlastností- rozpustnost ve vodě. V případě látky řady **b** bylo dále záměrem zvýšit hydrofilitu finální molekuly pomocí hydroxylových skupin diethanolaminových periferních zbytků.

Syntéza všech tetrapyridoporfyrazinových derivátů bez rozdílu začíná přípravou elementárního prekurzoru, látky **1**. Mechanismus reakce je upřesněn v tomto schématu⁵⁵ (Obr. 9):



Obr. 9. Reakční mechanismus vzniku elementárního prekurzoru.

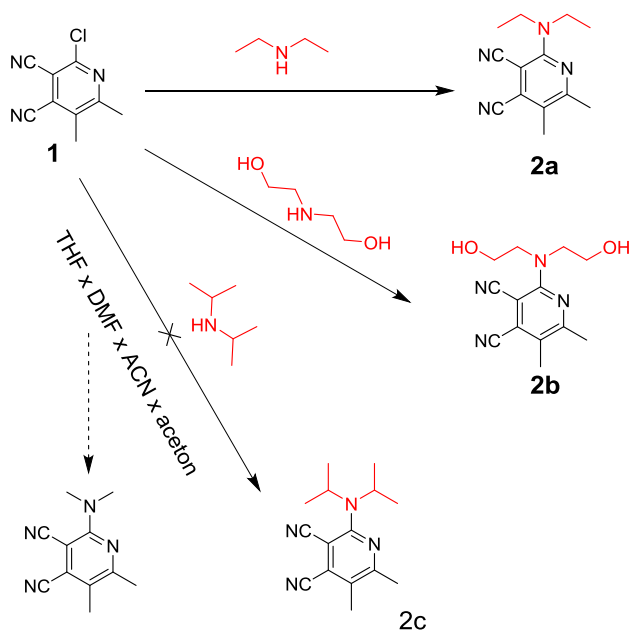
Nejdříve dochází k adičnímu procesu tetrakynoethylenu a butan-2-onu, zde z pozice *beta* uhlíku. Poté se váže chlor kyseliny chlorovodíkové na uhlík okrajové karbonitrilové skupiny a zároveň dochází k elektronovému přelivu. Nakonec molekula cyklizuje za odstoupení vody a kyanovodíku ve finální látku **1**.

Prekurzory pro cyklotetramerizační reakci byly připraveny nukleofilní substitucí elementárního prekurzoru a příslušného aminu, tedy budoucího N- substituentu. Jak látka **2a**, tak **2b** byly úspěšně syntetizovány za příslušných reakčních podmínek uvedených výše. Avšak příprava prekurzoru **2c** úspěšná nebyla, a to i přes mnoho různých syntetických

pokusů. Mezi tyto snahy patřilo vyzkoušení celkem čtyř rozpouštědel (THF, DMF, ACN, aceton), podrobení reakční směsi mikrovlnnému záření, velice dlouhé reakční časy či použití enormního nadbytku, až dvacetinásobku, diisopropylaminu vůči elementárnímu prekursoru. Ani jeden z těchto experimentů nevedl být k minimálnímu výtěžku látky **2c**.

Pouze v případě reakce s DMF jako rozpouštědlem byl ve směsi detekován nikoli diisopropylamino-, ale dimethylamino- derivát (Obr. 10). Tento jev lze přisoudit vysoké reakční teplotě spolu s dlouhým reakčním časem, což pravděpodobně vedlo k tomu, že se rozpouštědlo samotné stalo donorem dimethylaminových skupin pro elementární prekursor.

Neúspěch přípravy látky **2c** byl s nejvyšší pravděpodobností zapříčiněn přílišnou objemností diisopropylaminového substituentu a prostorové inkompatibilitou celého potenciálního finálního útvaru.



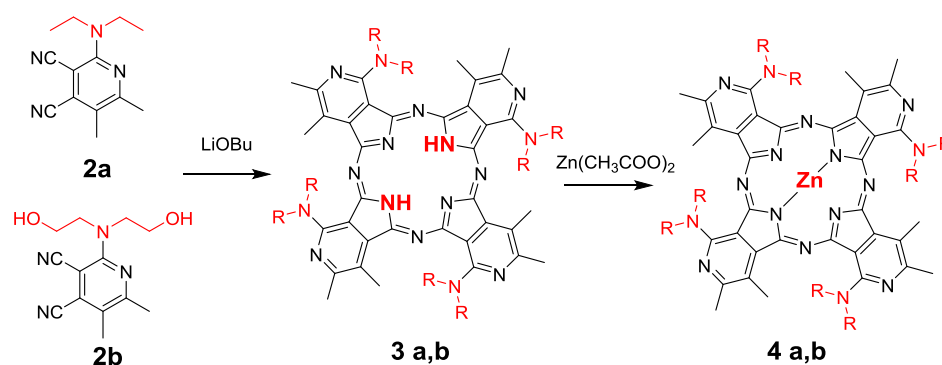
Obr. 10. Schéma přípravy prekursorů pro cyklotetramerizaci N- řady látek nukleofilní substitucí a nezáměrný vznik dimethylamino- derivátu během snahy o přípravu látky **2c**.

Tetrapyrrodo-pyrazinový skelet látek **a** a **b** byl zformován prostřednictvím reakce zvané cyklotetramerizace. Mechanismem je v případě použití alkoholátu alkalického kovu či kovu alkalických zemin jakožto iniciátoru reakce vždy postupné spojování prekursorů do výsledného skeletu⁵⁶. Produktem je tetrapyrrodo-pyrazinový derivát s koordinovaným kationtem kovu, jenž byl použit při reakci, tedy v tomto případě kation lithný (resp.

v případě jednomocných kationtů jsou do centra molekuly koordinovány kationty dva, nikoli pouze jeden). Ten byl následně z centra molekuly odstraněn použitím směsi voda/koncentrovaná kyselina octová v poměru 1:1.

V dalším kroku byl do centra bezkových tetrapyridoporfyrazinů koordinován zinečnatý kation reakcí s octanem zinečnatým v pyridinu (Obr. 11).

Velice důležitým poznatkem během snahy o čištění látek **3a**, **3b** a **4a**, **4b** byl rozdíl v jejich chování při sloupcové chromatografii. Zatímco purifikace látek řady **3** touto metodou vykazovala velké problémy, protože produkty zůstávaly zachycené na silikagelové vrstvě, u látek řady **4** žádné podobné nedostatky pozorovány nebyly a tento čistící proces probíhal dobře. Z této zkušenosti plyne doporučení pro případnou budoucí syntézu těchto látek – pomocí sloupcové chromatografie nečistit bezkové tetrapyridoporfyraziny **3a** a **3b**, ale aplikovat tuto purifikační metodu až po nakoordinování zinečnatého kationtu do centra molekul (**4a** a **4b**). Bude tak dosaženo snížení ztrát produktů a dojde k zjednodušení a zlevnění syntézy.

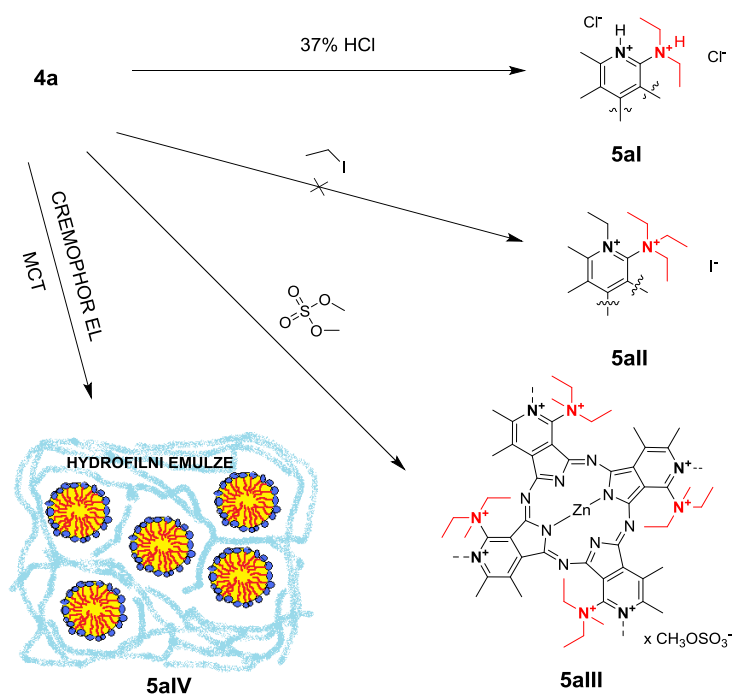


Obr. 11. Schéma přípravy tetrapyridoporfyrazinového skeletu N-řady látek a následné koordinace zinečnatého kationtu do centra molekuly.

Zatímco výtěžek látky **4a** dosáhl relativně uspokojivé hodnoty, efektivita přípravy látky **4b** nabývala pouze jednotek procent a bylo získáno jen minimální množství produktu. Ten navíc nejevil rozpustnost ve vodě, i přes zvýšenou hydrofilitu díky hydroxylovým skupinám periferních substituentů. Celkově byla manipulace se sérií látek **b**, zejména poté proces čištění, velice náročné, a to jak časově, tak metodicky. Z těchto důvodů nebylo přistoupeno k následujícím pokusům o přípravu ve vodě rozpustných derivátů této látky

řady **b**. V případě látky řady **a** tyto experimenty provedeny byly a hydrofilní deriváty byly úspěšně syntetizovány. Jedná se o sůl, alkylovaný derivát a hydrofilní emulzi.

Sůl **5aI** byla připravena protonizací látky **4a** koncentrovanou kyselinou chlorovodíkovou. Alkylace pomocí ethyljodidu neprobíhala (**5aII**), protože látka **4a** v něm nebyla dokonale rozpustná a zůstávala spíše ve formě suspenze. Ovšem syntéza methylovaného derivátu díky dimethylsulfátu již úspěšná byla (**5aIII**). V tomto případě mohla pomoci i vyšší reakční teplota, která v případě alkylace ethyljodidem nepřipadala v úvahu kvůli jeho těkavosti. Pro přípravu hydrofilní emulze byl použit CREMOPHOR EL, jeden z makrogolů s hodnotou HLB 12-14, jakožto hydrofilní neionický emulgátor, a MCT neboli tuk se střední délkou řetězce mastných kyselin („medium-chain triglycerides“) (**5aIV**) (Obr. 12).



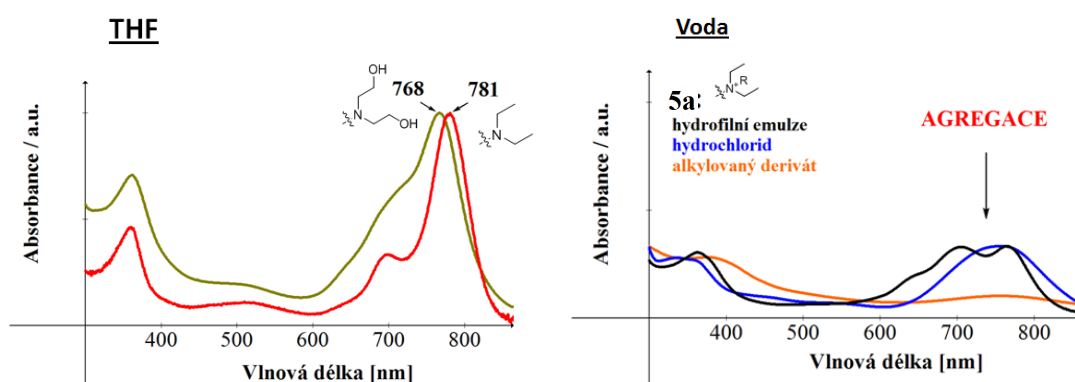
Obr. 12. Schéma příprav ve vodě rozpustných derivátů série **5a**.

U všech syntetizovaných tetrapyrído-porfyrazinů s N-substituenty na periférii byla měřena absorpční spektra. U lipofilních látek **4a** a **4b** bylo jako rozpouštědlo použito THF, u hydrofilních derivátů řady **5a** voda (Obr. 13). Dále byl u látky **4a** stanoven extinkční koeficient ϵ a kvantový výtěžek singletového kyslíku Φ_{Δ} (Tab. 1).

Přehledně finální fotofyzikální a fotochemické výsledky tetrapyrído-porfyrazinů s N-substituenty shrnují následující schémata:

| | 4a (THF) | 4b (THF) |
|---|-----------------|-----------------|
| λ [nm] | 781 | 768 |
| ϵ [M ⁻¹ ·cm ⁻¹] | 94 000 | |
| Φ_{Δ} | 0.41 | |

Tab. 1. Fotofyzikální a fotochemické vlastnosti látek **4a** a **4b**.

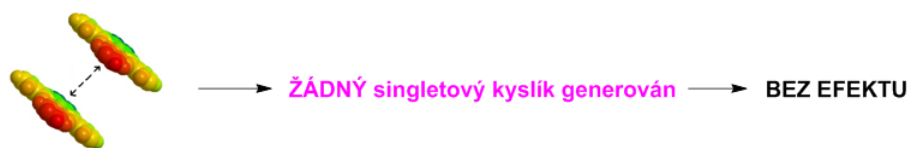


Obr. 13. VLEVO- absorpční spektra látek **4a** (červeně) a **4b** (zeleně) měřena v THF. VPRAVO- absorpční spektra ve vodě rozpustných derivátů řady **5a** měřena ve vodě.

Z výsledků měření je patrné, že skutečně největší výhodou N- série molekul je jejich absorpční posun maxima absorpce velice hluboko do blízké IČ oblasti spektra, který v případě látky **4a** činí 781 nm a u látky **4b** 768 nm. Tyto hodnoty se blíží ideálu a potenciálně přislubují látkám dostatečný přísun aktivujícího světla během PDT. Extinkční koeficient látky **4a** 94000 cm⁻¹ dm³ mol⁻¹ představující sílu absorpce odpovídá dobré hodnotě. Spíše průměrných či lehce podprůměrných hodnot tato látka dosahuje v případě kvantového výtěžku singletového kyslíku, jenž činí 41%.

Co se týče derivátů rozpustných ve vodě, ať hovoříme o soli (hydrochloridu), methylované látce nebo hydrofilní emulzi, všechny podobně vykazují charakteristický široký („broad“), nemonomerní Q-pás v absorpčním spektru. Toto shodně a neomylně u všech tří látek poukazuje na fakt, že ve vodném prostředí tyto molekuly nezůstávají monomerní, nýbrž podléhají agregaci. Vzhledem k tomu, že nositelem schopnosti absorpce světla je u těchto látek systém konjugovaných dvojných vazeb planárního centra molekuly,

který je shlukováním ve změti komplexů ireverzibilně narušen, nemohou být agregující látky účinné (Obr. 14).



Obr. 14. Znázornění negativního efektu agregace na účinnost látky.

Biologické *in vitro* testy provedené Mgr. Miloslavem Macháčkem z katedry Biochemických věd, Faf, UK, se všemi třemi ve vodě rozpustnými deriváty řady **5a** pouze potvrdily hypotézy o pravděpodobné neúčinnosti těchto látek. Žádná z nich skutečně nevykazovala ani minimální aktivitu či účinnost.

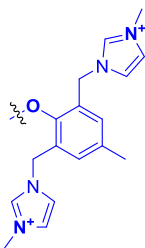
Za tento neblahý fakt je s nejvyšší pravděpodobností zodpovědný periferní dimethylaminový substituent, jenž není v prostoru dostatečně objemný a rigidní na to, aby shlukování molekul zabránil.

Tetra-3,4-pyridoporfyraziny s O-substituenty

Do této skupiny navržených a následně připravovaných látek patří právě jeden fotosenzitizér. Ten byl vyvinut s vizí získat látku s vlastnostmi blízcími se optimu v co možná nejvíce parametrech pro ideální fotosenzitizér.

Vzhledem k planárnímu charakteru tetrapyridoporfyrazinového, ale i ftalocyaninového a azaftalocyaninového skeletu, dochází u molekul derivátů těchto látek ve vodném prostředí velice často k agregaci, jak tomu mimo jiné bylo právě i v případě látek řady **5a** zmíněných výše. Protože tento fenomén zcela zbavuje látku jakéhokoliv fotodynamického účinku, představuje naprosto klíčový problém. Jinými slovy bez prevence agregace nelze připravit fungující fotosenzitizér, byť by ve všech ostatních parametrech exceloval. Bylo tedy naprosto zásadní tomuto jevu zabránit, ne však na úkor ostatních výhodných vlastností, ale právě naopak- s nimi v kooperaci.

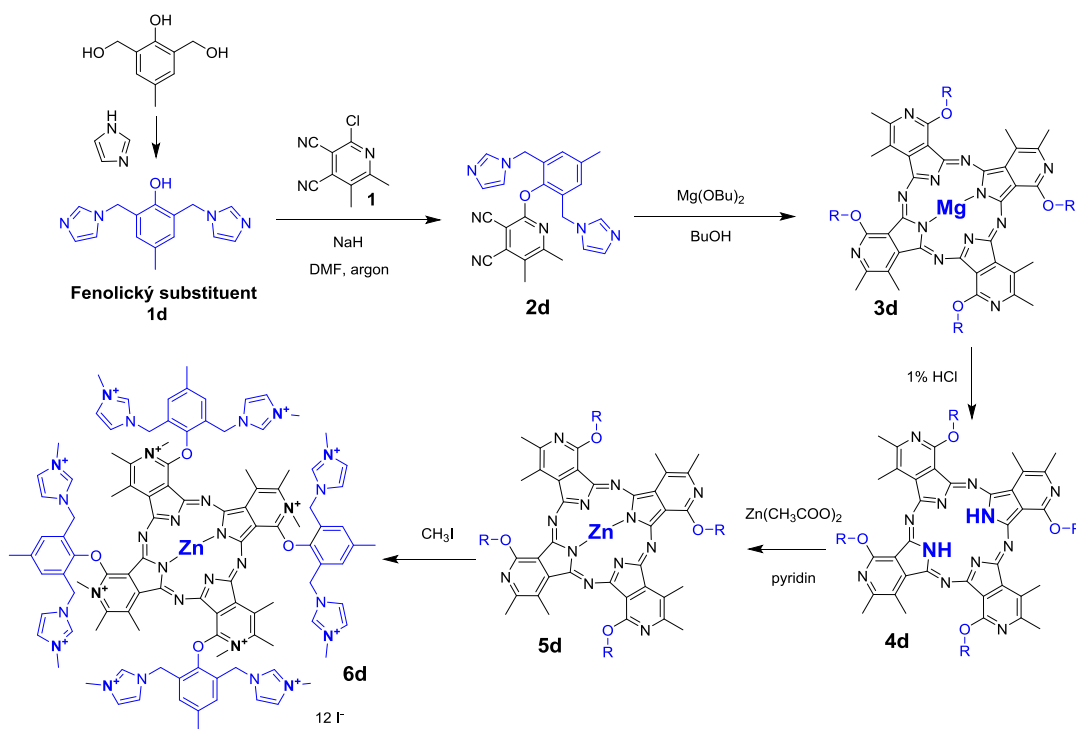
Struktura látky řady **d** byla založena na tetrapyridoporfyrazinové kostře, výrazně zlepšující absorpční posun finální molekuly do blízké IČ oblasti, a periferním fenolickým substituentem (Obr. 15), jehož objemnost v prostoru, rigidita a nakonec i kladný náboj atomů dusíku mají dohromady výrazný potenciál udržet PS v monomerním stavu ve vodném prostředí. Kladné náboje navíc zajišťují látce rozpustnost ve vodě.



Obr. 15. Fenolický periferní substituent.

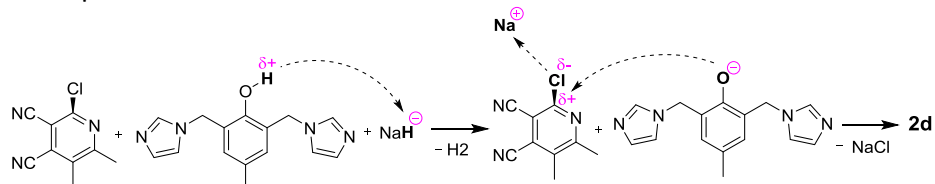
První krok syntézy spočíval právě v přípravě fenolického substituentu **1d**, 2,6-bis[(1H-imidazol-1-yl)methyl]-4-methylfenolu (Obr. 16), jenž není komerčně dostupný. Ze zkušeností nabytých během tohoto reakčního procesu a následného čištění produktu vyplývají velmi cenné poznatky a doporučení pro případnou budoucí repetici této přípravy. Je výhodnější reakci provádět do úplného spotřebování fenolické výchozí látky, čehož lze s nejvyšší pravděpodobností dosáhnout použitím většího molárního nadbytku 1H-imidazolu či prodloužením reakčního času. Bude tak docíleno vyššího výtěžku reakce a

výrazného zjednodušení čistícího procesu vzhledem k vlastnostem a charakteru jak výchozích látek, tak produktu reakce. Výchozí fenol, stejně jako fenolický produkt, není rozpustný ve vodě ani ve směsi voda/EtOH, na rozdíl od 1*H*-imidazolu, jenž ve vodě rozpustný je. Během čištění tedy 1*H*-imidazol snadno odchází s vodnou frakcí, ale oba fenoly jsou vysráženy v podobě tvorby suspenze. Výchozí fenol tedy může, byť v malé míře, znečistit produkt a ztížit jeho purifikaci. Tomuto lze předejít právě dokonalým spotřebováním této výchozí látky během reakce.



Obr. 16. Kompletní schéma přípravy tetrapyridoporfyrazinu **6d**.

Dalším krokem syntézy byla příprava prekurzoru pro cyklotetramerizaci **2d** z fenolického substituentu a elementárního prekurzoru **1**. Stejně jako u *N*-řady látek je zde reakčním mechanismem nukleofilní substituce, ovšem v tomto případě katalyzovaná silnou bazí, konkrétně hydridem sodným. Nejdříve dochází k odtržení vodíku fenolického hydroxylyu hydridem, což vede ke vzniku fenolátu sodného, tedy mnohem silnějšího nukleofilu (Obr. 17). Takto je vytvořen značný potenciál pro takřka kvantitativní či alespoň velice efektivní průběh reakce.



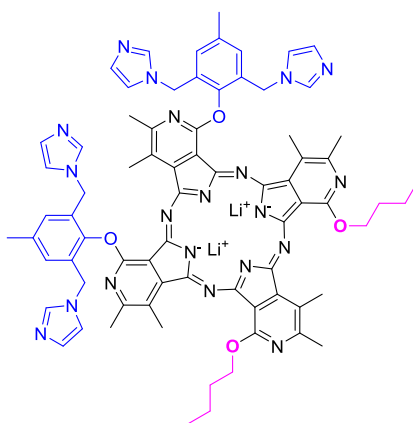
Obr. 17. Reakční mechanismus vzniku prekurzoru **2d**.

Reakce byla experimentálně provedena také s fluoridem cesným jakožto silnou aktivující bází, přičemž byl stanoven jasný závěr, že použití tohoto katalyzátoru nepřináší reakci žádné výhody, spíše naopak. Látka se hůře rozpouští, nezajišťuje vyšší výtěžek a navíc je znatelně dražší.

Ze tří různých vysoko vroucích rozpouštědel- THF, DMSO (dimethylsulfoxid) a DMF, se kterými byla reakce zkušebně provedena, byl zvolen DMF. V THF nedocházelo k příliš dobrému rozpouštění látek a ve zbylých dvou rozpouštědlech reakce probíhala podobně, přičemž úplně nejlépe právě v DMF.

Jak bylo také zjištěno, pro výtěžek reakce je zcela klíčový molární nadbytek fenolického substituentu a hydridu sodného k elementárnímu prekurzoru.

Následně byla provedena cyklotetramerizační reakce, zde nikoli pomocí butanolátu lithného, ale hořečnatého, a to z důvodu menší agresivity této sloučeniny vůči syntetizované látce. Vazba periferního substituentu přes atom kyslíku vykazuje nižší odolnost vůči štěpení, než vazba přes atom dusíku. Proto by při použití butanolátu lithného hrozilo, že bude docházet ke vzniku hybridních sloučenin, kdy část periferních substituentů bude správná, ale část bude obsahovat butoxy- skupinu butanolátu (Obr. 18).

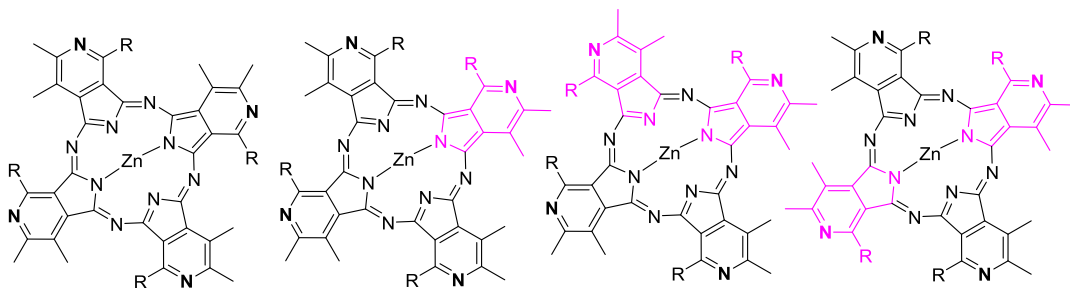


Obr. 18. Příklad hybridní molekuly, která by teoreticky mohla vzniknout při použití agresivnějšího butanolátu lithného jako iniciátoru cyklotetramerizace.

Hořečnatý kationt byl poté z centra molekuly odstraněn reakcí se zředěnou kyselinou chlorovodíkovou, načež byl na jeho místo nakoordinován kationt zinečnatý pomocí octanu zinečnatého a pyridinu jako rozpouštědla.

Nakonec byl syntetizován ve vodě rozpustný derivát alkylací methyljodidem. Vzhledem k tomu, že dle CHN analýzy proběhla alkylace látky napoprvé neúplně (1:11), byl celý reakční postup zopakován. Výtěžek reakce odpovídá této dvojnásobné alkylaci.

Avšak ani poté nebylo dosaženo úplné alkylace, data z elementární analýzy byla téměř shodná. Tento jev lze vysvětlit možností vzniku čtyř izomerů při tvorbě tetrapyridoporfyrizinového skeletu, přičemž u některých z nich může dojít k takovému prostorovému uspořádání, že methylová skupina při alkylaci nemůže proniknout k některému z atomů azomethinového dusíku. I přesto, že pravděpodobnost vzniku izomeru s pravidelným uspořádáním je z prostorových a termodynamických důvodů nejvyšší, nelze se zcela vyhnout utváření i ostatních tří. Z podrobné analýzy $^1\text{H-NMR}$ spekter bylo zjištěno, že se jedná o směs dvou takovýchto izomerů v poměru přibližně 3:1. Větší podíl tvoří izomer zobrazený vlevo, druhým pak je pravděpodobně izomer zobrazený jako třetí v pořadí (Obr. 19). Z toho důvodu lze předpokládat, že první izomer bude plně alkylován, na rozdíl od druhého, který bude na makrocyklu alkylován jen částečně vlivem sterického bránění azomethinového dusíku. V součtu se pak alkylace dle CHN analýzy projeví jako 1:11.



Obr. 19. Čtyři možné izomery vznikající během utváření tetrapyridoporfyrizinového skeletu

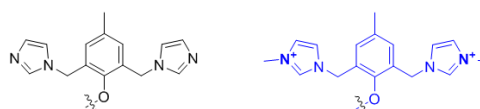
Čištění tetrapyridoporfyrinů **3-5d** je velice specifickým procesem a zasluhuje si pozornost. Metodu sloupcové chromatografie pro purifikaci těchto látek nelze použít, a to z důvodu značného zachytávání a ulpívání molekul produktů na silikagelové vrstvě sloupce. Docházelo by k naprosto fatálním ztrátám. Nejvýhodnějším řešením se ukázalo provedení série reakcí bez dokonalého přečišťování látek **3d** a **4d** a důsledná purifikace až látky **5d**.

Fakt, že čištění tetrapyridoporfyrinů série **d** zcela vylučuje použití sloupcové chromatografie, osobně nepovažuji za záporný, spíše naopak. Alternativně vyvinutý proces čištění je relativně méně ztrátový, není časově náročnější a je pravděpodobně méně

finančně nákladný. Pro teoretickou hromadnou výrobu této látky by nepředstavoval limitaci, ale spíše výhodu.

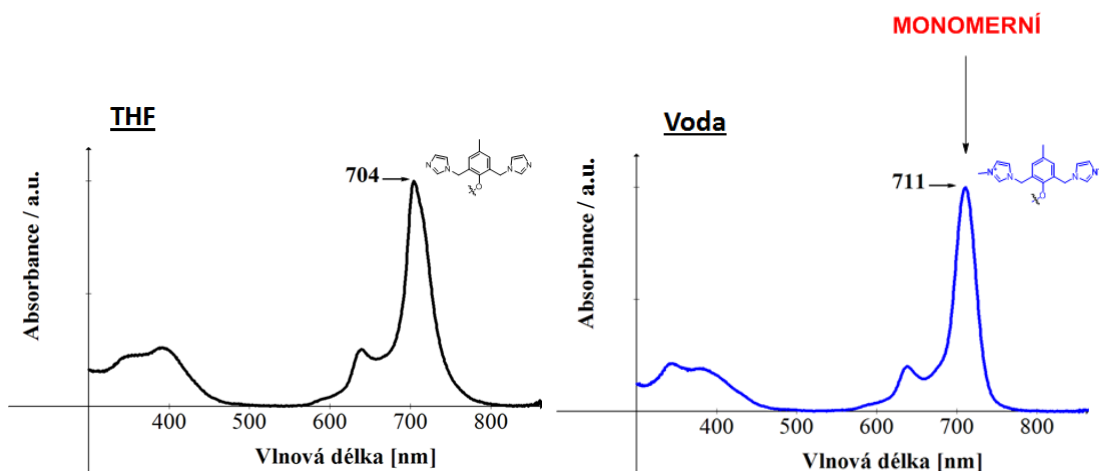
Během čistícího procesu dále docházelo k velice zvláštnímu jevu, kdy byl produkt **5d** zakomponován do určitého makrokomplexu tvořeného pravděpodobně produktem a určitým způsobem modifikovaným produktem s vázaným zinečnatým kationtem nejen v centru molekuly, ale i na periférii. Tento makrokomplex vykazoval odlišné a nečekané vlastnosti ve srovnání s čistou látkou zejména v oblasti rozpustnosti, když byl částečně rozpustný ve vodě. K vytržení periferně vázaných zinečnatých kationtů byla použita EDTA. Vzhledem k mnohem větší stabilitě centrálně vázaných kationtů kovu tyto nebyly ohroženy.

U finálních molekul **5d** a **6d** byla měřena absorpční spektra, přičemž u první zmíněné, lipofilní látky v THF a u druhé, ve vodě rozpustné, ve vodě (Obr. 20). U látky **6d** byl dále stanoven extinkční koeficient ϵ a kvantový výtěžek singletového kyslíku (Tab. 2).



| | 5d (THF) | 6d (voda) | 6d (DMF) |
|---|-----------------|------------------|-----------------|
| λ [nm] | 704 | 711 | |
| ϵ [M ⁻¹ ·cm ⁻¹] | | 201 200 | |
| Φ_{Δ} | | 0,58 | 0,69 |

Tab. 2. Fotofyzikální a fotochemické vlastnosti látek **5d** a **6d** (kvantové výtěžky Φ_{Δ} měřeny fyzikální luminiscenční metodou RNDr. Pavlem Kubátem, CSc., Heyrovského institut fyzikální chemie, AV ČR Praha)

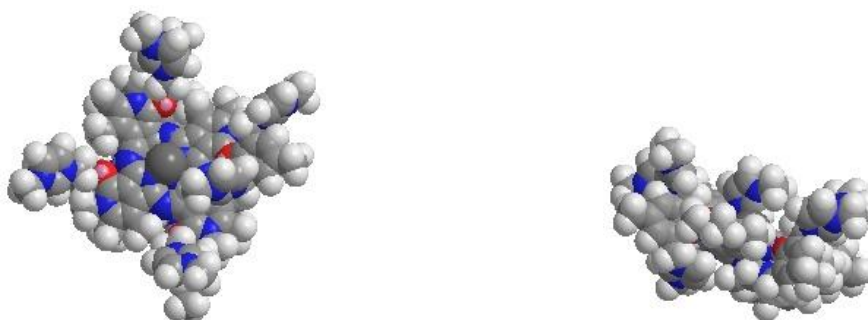


Obr. 20. VLEVO absorpční spektrum látky **5d** (černě) měřené v THF. VPRAVO absorpční spektrum látky **6d** (modře) měřeno ve vodě.

Maximum absorpce o vlnové délce 711 nm látky **6d**, respektive 704 nm u látky **5d**, představuje vynikající výsledek, byť se nejedná o hodnotu bezprostředně atakující hranici 800 nm. Extinkční koeficient $201\,200\text{ cm}^{-1}\text{ dm}^3\text{ mol}^{-1}$ molekuly **6d** je výjimečně vysokou hodnotou míry absorpce, které dosahují nejsilněji absorbující fotosenzitizéry. Kvantový výtěžek singletového kyslíku 0,58 ve vodě, respektive 0,69 v DMF, látky **6d** představuje velice dobrou hodnotu (v DMF výbornou). Fotosenzitizér je schopen 58% (případně 69%) všech přijatých fotonů transformovat v reakci molekul cytotoxického singletového kyslíku.

Zcela klíčovou byla otázka chování látky **6d** ve vodném prostředí, respektive zda se její molekuly budou shlukovat či nikoliv. Zjištění, že lipofilní látka **5d** vykazuje ideální, monomerní tvar křivky v THF nebylo velkým překvapením. Ovšem fakt, že i látka **6d**, byť ve vodě, dosahuje minimálně stejně optimálního, naprosto monomerního, ostrého („*sharp*“) tvaru křivky v oblasti Q-pásu, bylo velkým úspěchem. Molekuly látky **6d** zůstávají v hydrofilním, vodném prostředí monomerní, k agregaci vůbec nedochází. Fotosenzitizér **6d** tedy nic nebrání v tom, aby mohl ve fyziologickém prostředí lidského organismu v případě systémového podání plně uplatnit svůj účinnostní potenciál.

Tímto byla potvrzena naše původní hypotéza, že objemný, rigidní a nabitý fenolický substituent by mohl být schopen tetrapyridoporfyrinový derivát před tvorbou agregátů ochránit. V prostoru substituent pravděpodobně zaujímá vertikální, kolmé postavení vůči planárnímu centrálnímu skeletu (Obr. 21) a zcela znemožňuje agregační interakci s dalšími molekulami látky.

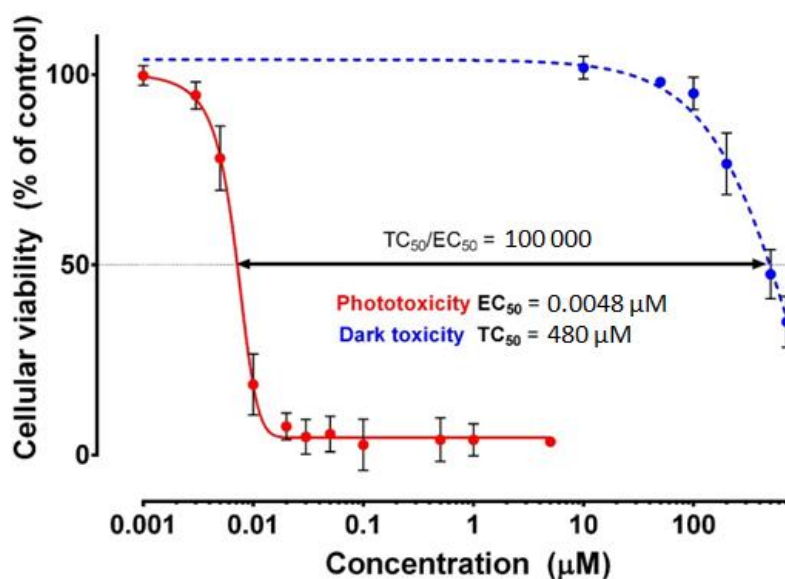


Obr. 21. Orientační 3D modely látky **6d** (shora a z boku) znázorňující její možné uspořádání v prostoru, respektive vertikální postavení periferních substituentů k základu molekuly.

Klíčovými vlastnostmi potenciálně „ideálního“ fotosenzitizéru látka **6d** téměř beze zbytku disponuje- relativně vysoký absorpční posun maxima absorpce, výjimečně vysoký extinkční koeficient, dobrý kvantový výtěžek singletového kyslíku a kruciální schopnost

zůstat monomerní ve vodném prostředí, tedy teoreticky i v krevním oběhu. I přes tyto skutečnosti zůstávalo otázkou, zda PS bude či nebude účinný v testech na živých nádorových buňkách, popřípadě v jaké míře.

Biologické *in vitro* testy byly opět prováděny Mgr. Miloslavem Macháčkem pracujícím pod záštitou katedry Biochemických věd, Faf, UK. Pro testy byla použita HeLa linie nádorových buněk. Výsledky mnohokrát opakovaných měření znázorňuje následující graf závislosti životaschopnosti buněk na koncentraci fotosenzitizéru (Obr. 22):



Obr. 22. Graf závislosti životaschopnosti buněk na koncentraci fotosenzitizéru 6d.

EC_{50} – „effective concentration“, koncentrace látky, která po ozáření vede k usmrcení 50% nádorových buněk

TC_{50} – „toxic concentration“, koncentrace látky, která bez ozáření vede ke smrti 50% nádorových buněk

EC_{50} / TC_{50} – terapeutický index

„Phototoxicity“ – toxicita látky po jejím ozáření vyjádřená hodnotou EC_{50} , tedy terapeutická účinnost

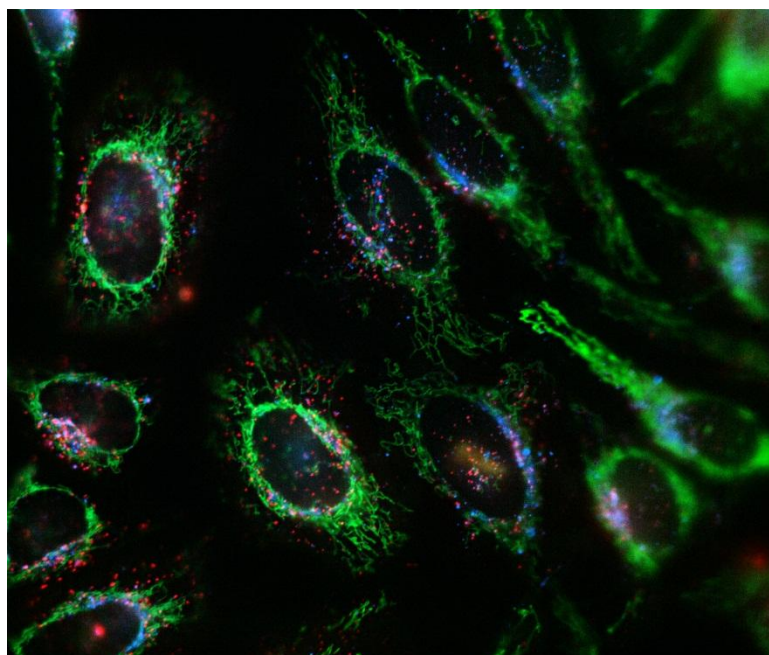
„Dark toxicity“ – toxicita látky bez ozáření vyjádřená hodnotou TC_{50} , tedy jedovatost samotné látky pro buňky

EC₅₀ (~ LD₅₀) látky **6d** je 4,8 nM. Tato hodnota je přibližně o dva řády nižší než v případě dosud nejefektivněji fotosenzitizujících molekul. Fotosenzitizér **6d** je tedy asi stokrát účinnější než nejlépe fungující látky, které kdy byly popsány- s výjimkou několika nedávno objevených derivátů bakteriochlorinů, které taktéž vykazují EC₅₀ v řádu nM⁵⁰.

TC₅₀ látky 480 μM, neboli 480 000 nM, představuje o pět řádů vyšší koncentraci než EC₅₀. Terapeutický index látky je tedy enormně široký, přesně 100 000. Fotosenzitizér **6d** v tomto směru představuje velice bezpečnou terapeutickou alternativu.

Je třeba zdůraznit, že tyto výsledky biologických testů se vztahují k chování látky *in vitro*, jak je deklarováno výše. Analýza chování fotosenzitizéru *in vivo* dosud nebyla provedena.

Co se týče intracelulární lokalizace molekul PS **6d**, nachází se převážně v lysozomech (Obr. 23). Vzhledem k enormní účinnosti se PS takto zcela vymyká předpokladům o obecně nižší efektivitě látek distribuovaných v lysozomech oproti těm nacházejících se v mitochondriích¹⁸.



Obr. 23. Intracelulární lokalizace PS **6d**- přičemž molekuly látky jsou znázorněny **červeně**, lysozomy **modře** a mitochondrie **zeleně**. (Fotografie pořízena epifluorescenčním mikroskopem

Mgr. Miloslavem Macháčkem, Katedra Biochemických věd, Faf, UK)

ZÁVĚR

V rámci mé diplomové práce byly připraveny a evaluovány tři deriváty tetra-3,4-pyridoporfyrasinů ze čtyř původně navržených. Obě látky z N- série, **a** a **b**, dosáhly vynikajících spektrálních parametrů, když jejich absorpční maxima byla 781 (**a**), respektive 768 nm (**b**), což bylo také primárním cílem jejich syntézy. Bohužel agregace ve vodném prostředí a nízké výtěžky přípravy (**b**) představují fatální limitaci případného praktického využití těchto látek. Fotosenzitizér **d**, pracovně nazývaný **ZIP300Zn-Me**, plně dostal všem cílům a očekáváním, pro něž byl syntetizován- a co víc, zcela je předčil. Dle všech dosud provedených analýz představuje ideálu tak blízkou fotosenzitizující molekulu jako téměř žádná jiná látka, která kdy byla uvedena do klinické praxe či popsána v literatuře. Struktura látky je jakousi mozaikou, skládačkou (viz „Příloha“, Obr. 24), kde vše do sebe výborně zapadá- centrální tetrapyridoporfyrasinový skelet posunující absorpční maximum do blízké IČ oblasti a zároveň poskytující molekule enormní sílu absorpce, zinečnatý kationt v centru molekuly zvyšující Φ_{Δ} a periferní fenolický substituent chráníci před agregací a zajišťující rozpustnost ve vodě. Jako celek se jedná o jeden ze suverénně nejefektivnějších PS, s efektivní koncentrací v řádu nM (4,8 nM), které kdy byly popsány, a to navíc s terapeutickým indexem v řádu statisíců (100 000) (Tab. 3). Navíc není známo, že by tetrapyridoporfyrasiny podléhaly rozkladu světlem, jako je tomu například u derivátů bakteriochlorinů. Jak bylo deklarováno výše, zatím byly provedeny pouze biologické testy *in vitro*. Budoucím cílem by měl být vývoj vhodného zvířecího modelu pro *in vivo* analýzy, které by jistě prozradily o účinnostním a bezpečnostním profilu látky více.

| | λ [nm] | ϵ [M ⁻¹ .cm ⁻¹] | Φ_{Δ} | EC ₅₀ [nM] | TC ₅₀ [nM] | TI |
|-------------------------|----------------|---|-----------------|-----------------------|-----------------------|---------|
| 6d (ZIP300Zn-Me) | 711 | 201 200 | 0,58 | 4,8 | 480 000 | 100 000 |

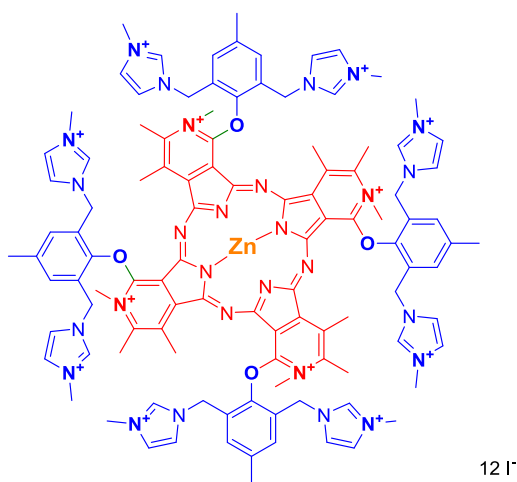
Tab. 3. Finální přehled fyzikálně-chemických, spektrálních a fotodynamických vlastností látky **6d** (detaily analýz byly uvedeny výše).

Výsledky mé diplomové práce se staly součástí publikace, které jsem spoluautorem (viz „Příloha“).

PŘÍLOHA

Článek publikovaný v odborném časopise:

VACHOVA L, MACHACEK M., KUČERA R, DEMUTH J, **CERMAK P**, KOPECKY K, MILETIN M, JEDLICKOVA A, SIMUNEK T, NOVAKOVA V, ZIMCIK P, [Heteroatom-substituted tetra\(3,4-pyrido\)porphyrazines: a stride toward near-infrared-absorbing macrocycles](#), *Organic & Biomolecular Chemistry*, **2015**; 13: 5608-5612. DOI: 10.1039/C5OB00651A



Obr. 24. Znáznornění jednotlivých komponent fotosenzitizéru **6d**.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

¹ WAINWRIGHT M. Photodynamic therapy: The development of new photosensitisers. *Anti-Cancer Agents Med. Chem.*, 2008, vol. 8, no. 3, p. 280-291.

² CASTANO A. P., MROZ P., HAMBLIN M. R. Photodynamic therapy and anti-tumour immunity. *Nat. Rev. Cancer*, 2006, vol. 6, no. 7, p. 535-545.

³ AGOSTINIS, PATRIZIA, KRISTIAN BERG, KEITH A. CENGEL, THOMAS H. FOSTER, ALBERT W. GIROTTI, SANDRA O. GOLLNICK, STEPHEN M. HAHN, MICHAEL R. HAMBLIN, ASTA JUZENIENE, ET AL. Photodynamic therapy of cancer: An update. *Ca-Cancer J. Clin.* [online]. 2011, **61**(4): 250-281 [cit. 2016-01-01]. DOI: 10.3322/caac.20114. ISSN 00079235. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.3322/caac.20114>

⁴ WAKSMAN R, MCEWAN PE, MOORE TI, ET AL: PhotoPoint photodynamic therapy promotes stabilization of atherosclerotic plaques and inhibits plaque progression. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 2008; 52: 1024–1032.

⁵ WOODBURN KW, FAN Q, KESSEL D, ET AL: Phototherapy of cancer and atheromatous plaque with texaphyrins. *J. Clin. Laser Med. Surg.*, 1996; 14: 343–348.

⁶ BOZZINI G, COLIN P, BETROUNI N, ET AL: Photodynamic therapy in urology: what can we do now and where are we heading? *Photodiagn. Photodyn. Ther.*, 2012; 9: 261–273.

⁷ COTTER TG: Apoptosis and cancer: the genesis of a research field. *Nat. Rev. Cancer*, 2009; 9: 501–507.

⁸ MEISEL P, KOCHER T: Photodynamic therapy for periodontal diseases: state of the art. *J. Photochem. Photobiol., B* 2005; 79: 159–170.

⁹ KONOPKA K, GOSLINSKI T: Photodynamic therapy in dentistry. *J. Dental. Res.*, 2007; 86: 694–707.

¹⁰ SILVA JN, FILIPE P, MORLIERE P, ET AL: Photodynamic therapy: dermatology and ophthalmology as main fields of current applications in clinic. *Biomed. Mater. Eng.*, 2008; 18: 319–327.

¹¹ MICHELS S, SCHMIDT-ERFURTH U: Photodynamic therapy with verteporfin: a new treatment in ophthalmology. *Semin. Ophthalmol.*, 2001; 16: 201–206.

¹² SZEIMIES RM, LISCHNER S, PHILIPP-DORMSTON W, ET AL: Photodynamic therapy for skin rejuvenation: treatment options – results of a consensus conference of an expert group for aesthetic photodynamic therapy. *J. Dtsch. Dermatol. Ges.*, 2013; 11: 632–636.

-
- ¹³ TAUB AF: Cosmetic clinical indications for photodynamic therapy. *J. Cosmet. Dermatol.*, 2012; 25: 218–224.
- ¹⁴ ARENAS Y, MONRO S, SHI G, ET AL: Photodynamic inactivation of *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *S. aureus* with Ru(II)- based type I/type II photosensitizers. *Photodiagn. Photodyn. Ther.*, 2013; 10: 615–625.
- ¹⁵ SPERANDIO FF, HUANG YY, HAMBLIN MR: Antimicrobial photodynamic therapy to kill Gram-negative bacteria. *Recent Pat Antiinfect. Drug Discov.*, 2013; 8: 108–120.
- ¹⁶ COSTA L, FAUSTINO MAF, NEVES MGPMS, ET AL: Photodynamic inactivation of mammalian viruses and bacteriophages. *Viruses*, 2012; 4: 1034–1074.
- ¹⁷ WAINWRIGHT M: Local treatment of viral disease using photodynamic therapy. *Int. J. Antimicrob. Agents.*, 2003; 21: 510–520.
- ¹⁸ BENOVA LUDMIL. Photodynamic Therapy: Current Status and Future Directions. *Medical Principles and Practice* [online]. 2015, **24**(s1): 14-28 [cit. 2016-01-02]. DOI: 10.1159/000362416. ISSN 1423-0151. doi=10.1159/000362416
- ¹⁹ MOAN J, BERG K. The photodegradation of porphyrins in cells can be used to estimate the lifetime of singlet oxygen. *Photochem. Photobiol.*, 1991;53: 549–53.
- ²⁰ GARG AD, NOWIS D, GOLAB J, VANDENABEELE P, KRYSKO DV, AGOSTINIS P. Immunogenic cell death, DAMPs and anticancer therapeutics: an emerging amalgamation. *Biochim. Biophys. Acta.*, 2010;1805:53-71.
- ²¹ MUSSER DA, WAGNER JM, WEBER FJ, DATTA-GUPTA N. The binding of tumor localizing porphyrins to a fibrin matrix and their effects following photoirradiation, *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.*, 1980;28:505–25.
- ²² DVORAK HF, DVORAK AM, MANSEAU EJ, WILBERG L, CHURCHILL WH. Fibrin gel investment associated with line 1 and line 10 solid tumor growth, angiogenesis, and fibroplasia in guinea pigs. Role of cellular immunity, myofibroblasts, microvascular damage, and infarction in line 1 tumor regression. *J. Natl. Cancer Inst.*, 1979;62:1459–72.
- ²³ DVORAK HF, ORENSTEIN NS, CARVALHO AC, CHURCHILL WH, DVORAK AM, GALLI SJ, ET AL. Induction of a fibrin-gel investment: an early event in line 10 hepatocarcinoma growth mediated by tumor-secreted products. *J. Immunol.*, 1979;122:166–74.
- ²⁴ KESSEL D. The role of low-density lipoprotein in the biodistribution of photosensitizing agents. *J. Photochem. Photobiol., B.* 1992;14:261-262.
- ²⁵ OGILBY PR: Singlet oxygen: there is indeed something new under the sun. *Chem. Soc. Rev.*, 2010; 39: 3181–3209.
- ²⁶ NOOMNARM U., CLEGG R. M. Fluorescence lifetimes: fundamentals and interpretations. *Photosynth. Res.*, 2009, vol. 101, no. 2-3, p. 181-194.

-
- ²⁷ BIRKS B. B., *Photophysics of Aromatic Molecules. 1. vydání, Londýn: Wiley-Interscience, 1970. 704 s. ISBN 0-471-07420-9.*
- ²⁸ LAKOWICZ J. R., *Principles of fluorescence spectroscopy. 3. vydání. New York: Springer, 2006. 953 s. ISBN 978-0-387-31278-1.*
- ²⁹ MITZEL F., FITZGERALD S., BEEBY A., FAUST R. Acetylenic quinoxalinoporphyrazines as photosensitisers for photodynamic therapy. *Chem.-Eur. J.*, 2003, vol. 9, no. 5, p. 1233-1241.
- ³⁰ SAKA E. T., DURMUS M., KANTEKIN H. Solvent and central metal effects on the photophysical and photochemical properties of 4-benzyloxybenzoxy substituted phthalocyanines. *J. Organomet. Chem.*, 2011, vol. 696, no. 4, p. 913-924.
- ³¹ FAUST R., WEBER C. Three-step synthesis and absorption and emission properties of peripherally peralkynylated tetrapyrazinoporphyrazines. *J. Org. Chem.*, 1999, vol. 64, no. 7, p. 2571-2573.
- ³² IUPAC GOLD BOOK [online]. Poslední revize 2010-12-22 [cit. 2011-06-13]. Dostupné z <http://goldbook.iupac.org/D01579.html>.
- ³³ YOON I, LI JZ, SHIM YK: Advance in photosensitizers and light delivery for photodynamic therapy. *Clin. Endosc.*, 2013; 46: 7–23.
- ³⁴ CASTANO AP, DEMIDOVA TN, HAMBLIN MR: Mechanisms in photodynamic therapy. Part 1. Photosensitizers, photochemistry and cellular localization. *Photodiagn. Photodyn. Ther.*, 2004; 1: 279–293.
- ³⁵ NYMAN E. S., HYNINEN P. H. Research advances in the use of tetrapyrrolic photosensitizers for photodynamic therapy. *J. Photochem. Photobiol., B*, 2004, vol. 73, no. 1-2, p. 1-28.
- ³⁶ JUZENIENE A, NIELSEN KP, MOAN J. Biophysical aspects of photodynamic therapy. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.*, 2006;25:7-28.
- ³⁷ ASCENCIO M, COLLINET P, FARINE MO, MORDON S. Protoporphyrin IX fluorescence photobleaching is a useful tool to predict the response of rat ovarian cancer following hexaminolevulinate photodynamic therapy. *Lasers Surg. Med.*, 2008;40:332-341.
- ³⁸ WILSON B. C., PATTERSON M. S. The physics, biophysics and technology of photodynamic therapy. *Phys. Med. Biol.*, 2008, vol. 53, no. 9, p. R61-R109.
- ³⁹ ABRAHAMSE, HEIDI A MOHAMED ABDEL HARITH. Photodynamic Cancer Therapy—Recent Advances [online]. In: . s. 5-11 [cit. 2016-02-03]. DOI: 10.1063/1.3631802. Dostupné z: <http://scitation.aip.org/content/aip/proceeding/aipcp/10.1063/1.3631802>

-
- ⁴⁰ ALLISON R. R., SIBATA C. H. Oncologic photodynamic therapy photosensitizers: A clinical review. *Photodiagn. Photodyn. Ther.*, 2010, vol. 7, no. 2, p. 61-75.
- ⁴¹ ORMOND AB, FREEMAN HS: Dye sensitizers for photodynamic therapy. *Materials* 2013; 6: 817–840.
- ⁴² ZIMCIK P., MILETIN M., Photodynamic Therapy. In Lang, A. R. Dyes and Pigments: New Research, *New York: Nova Science Publishers, Inc.*, 2009; pp. 1-62. ISBN: 978-1-60692-027-5.
- ⁴³ F.S. DE ROSA, M.V. BENTLEY, Photodynamic therapy of skin cancers: sensitizers, clinical studies and future directives, *Pharm. Res.* 17 (2000) 1447–1455.
- ⁴⁴ JUARRANZ, ÁNGELES, PEDRO JAÉN, FRANCISCO SANZ-RODRÍGUEZ, JESÚS CUEVAS A SALVADOR GONZÁLEZ. Photodynamic therapy of cancer. Basic principles and applications. *Clin. Transl. Oncol.* [online]. 2008, **10**(3), 148-154 [cit. 2016-03-22]. DOI: 10.1007/s12094-008-0172-2. ISSN 1699-048x. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s12094-008-0172-2>
- ⁴⁵ ALLISON R. R., SIBATA C. H. Oncologic photodynamic therapy photosensitizers: A clinical review. *Photodiagn. Photodyn. Ther.*, 2010, vol. 7, no. 2, p. 61-75.
- ⁴⁶ HUANG, YING-YING, PAWEL MROZ, TIMUR ZHIYENTAYEV, ET AL. In Vitro Photodynamic Therapy and Quantitative Structure–Activity Relationship Studies with Stable Synthetic Near-Infrared-Absorbing Bacteriochlorin Photosensitizers. *J. Med. Chem.* [online]. 2010, 53(10), 4018-4027 [cit. 2016-03-22]. DOI: 10.1021/jm901908s. ISSN 0022-2623. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jm901908s>
- ⁴⁷ ZIMCIK P., MILETIN M., Photodynamic Therapy. In Lang, A. R. Dyes and Pigments: New Research, *New York: Nova Science Publishers, Inc.*, 2009; pp. 1-62. ISBN: 978-1-60692-027-5.
- ⁴⁸ HUANG YY, BALASUBRAMANIAN T, YANG E, ET AL: Stable synthetic bacteriochlorins for photodynamic therapy: role of dicyano peripheral groups, central metal substitution (2H, Zn, Pd), and Cremophor EL delivery. *Chem. Med. Chem.*, 2012; 7: 2155–2167.
- ⁴⁹ MROZ, P., Y.-Y. HUANG, A. SZOKALSKA, ET AL. Stable synthetic bacteriochlorins overcome the resistance of melanoma to photodynamic therapy. *The FASEB J.* [online]. 2010, 24(9), 3160-3170 [cit. 2016-03-22]. DOI: 10.1096/fj.09-152587. ISSN 0892-6638. Dostupné z: <http://www.fasebj.org/cgi/doi/10.1096/fj.09-152587>
- ⁵⁰ SHARMA, SULBHA K., MICHAEL KRAYER, FELIPE F. SPERANDIO, LIYI HUANG, YING-YING HUANG, DEWEY HOLTEN, JONATHAN S. LINDSEY A MICHAEL R. HAMBLIN. Synthesis and evaluation of cationic bacteriochlorin amphiphiles with effective in vitro photodynamic activity against cancer cells at low nanomolar concentration. *J. Porphyrins Phthalocyanines* [online]. 2013, **17**(01n02), 73-85 [cit. 2016-03-23]. DOI: 10.1142/S108842461250126X. ISSN 10884246. Dostupné

- ⁵¹ K. V. LIPIN, V. N. MAKSIMOVA, O. V. ERSHOV, A. V. EREMKIN, Y. S. KAYUKOV AND O. E. NASAKIN, *Russ. J. Org. Chem.*, 2010, 46, 617–618.
- ⁵² YANG, LI, LIANG LUO, SHUAI ZHANG, XIAOYU SU, JINGBO LAN, CHI-TIEN CHEN A JINGSONG YOU. Self-assembly from metal–organic vesicles to globular networks: metallo-gel-mediated phenylation of indole with phenyl boronic acid. *Chem. Commun.* [online]. 2010,46(22), 3938- [cit. 2016-04-13]. DOI: 10.1039/c0cc00112k. ISSN 1359-7345. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=c0cc00112k>
- ⁵³ MAKHSEED S, MACHACEK M, ALFADLY W, TUHL A, VINODH M, SIMUNEK T, NOVAKOVA V, KUBAT P, RUDOLF E, ZIMCIK P, Water soluble non-aggregating phthalocyanine and in vitro studies for photodynamic therapy, *Chem. Commun.*, 2013; 49(95): 11149-11151.
- ⁵⁴ VACHOVA L, MACHACEK M., KUČERA R, DEMUTH J, CERMAK P, KOPECKY K, MILETIN M, JEDLICKOVA A, SIMUNEK T, NOVAKOVA V, ZIMCIK P, Heteroatom-substituted tetra(3,4-pyrido)porphyrazines: a stride toward near-infrared-absorbing macrocycles, *Org. Biomol. Chem.*, 2015; 13: 5608-5612.
- ⁵⁵ NASAKIN O. E., NIKOLAEV E. G., TERENCEV P. B., BULAI A. K., LAVRENTEVA I. V. *Khim. Geterotsikl. Soedin.*, 1987, 5, 653-656.
- ⁵⁶ KUDREVICH S. V., VAN LIER J. E. Azaanalogs of phthalocyanine: Syntheses and properties. *Coord. Chem. Rev.*, 1996, vol. 156, p. 163-182.