

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



Diplomová práce

Syntéza asymetrických derivátů azaftalocyaninů IV.



Děkuji PharmDr. Petru Zimčikovi, PhD. za pomoc a trpělivost při vypracování této diplomové práce.

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

V Hradci Králové 5.5.2008

Zuzana Dvořáková

Obsah

1	SEZNAM ZKRATEK.....	5
2	TEORETICKÁ ČÁST	6
2.1	Úvod.....	6
2.2	Historie PDT	7
2.3	Základní principy PDT.....	8
2.3.1	Mechanismus PDT.....	8
2.3.2	Fotofyzika PDT	9
2.3.4	Fotochemie	10
2.3.4.1	fotoproces typu I (přenos elektronu)	10
2.3.4.2	Fotoproces typu II (přenos energie)	11
2.3.5.	Biologické mechanismy PDT	13
2.4.	Fotosenzitizéry	14
2.4.1.	Vlastnosti ideálního fotosenzitizéru.....	14
2.4.2	Přehled fotosenzitizérů	17
2.4.2.1	První generace	17
2.4.2.2	Druhá generace	19
3	CÍL PRÁCE.....	28
4	METODICKÁ ČÁST	29
4.1	Syntéza nesymetrických ftalocyaninů (Pc).....	29
4.1.1	Nesymetrický prekurzor	29
4.1.2	Dva různé prekurzory	31
5	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	37
	SEZNAM POUŽITÝCH CHEMIKÁLIÍ	37
5.1	Schéma prováděných reakcí.....	38
5.2	Příprava prekurzorů	40
5.2.1	Příprava 5,6-dioxo-1,4,5,6-tetrahydropyrazin-2,3-dikarbonitrilu (1).....	40
5.2.2	Příprava 5,6-dichlorpyrazin-2,3-dikarbonitrilu (2)	40
5.2.3	Příprava 5,6-bis(<i>terc</i> -butylsulfanyl)pyrazin-2,3-dikarbonitrilu (3).....	41
5.2.4	Příprava 5,6-dipyridin-2-yl-pyrazin-2,3-dikarbonitrilu (4).....	42
5.3	Syntéza asymetrických AzaPc – obecný postup.....	43
5.3.1	[2,3,9,10,16,17-Hexakis(<i>terc</i> -butylsulfanyl)-23,24-bis(pyridin-2-yl)- 1,4,8,11,15,18,22,25-(oktaaza)ftalocyaninato] zinečnatý komplex (6)	43
5.3.2	2,3,16,17-Tetrakis(<i>terc</i> -butylsulfanyl)-9,10,23,24-terakis(pyridin-2-yl)-1,4,8,11,15,18,22,25-(oktaaza)ftalocyaninato] zinečnatý komplex (7)	44
5.3.3	2,3-Bis(<i>terc</i> -butylsulfanyl)-9,10,16,17,23,24-hexakis(pyridin-2-yl)- 1,4,8,11,15,18,22,25-(oktaaza)ftalocyaninato] zinečnatý komplex (9).....	46

6	DISKUZE	47
7	ZÁVĚR.....	49
8	POUŽITÁ LITERATURA	50

1 Seznam zkratek

AzaPc.....	azaftalocyanin
CHF.....	chloroform
DMF.....	dimethylformamid
DMAE.....	dimethylaminoethanol
Hp.....	hematoporfyrin
HpD.....	hematoporfyrinový derivát
Pc.....	ftalocyanin
PDT.....	fotodynamická terapie
PS.....	fotosenzitizér
THF.....	tetrahydrofuran

2 Teoretická část

2.1 Úvod

Fotodynamická terapie (PDT – photodynamic therapy) je nová perspektivní metoda léčby kancerózních i nekancerózních onemocnění. Použití netoxických organických barviv jako fotosenzitizéru (PS) v kombinaci s neškodným viditelným světlem je známo už přes sto let, ale teprve v posledních letech se začala více využívat. Prvotně byla metoda vyvinuta k léčbě nádorových onemocnění, avšak některé z úspěšných aplikací můžeme najít i mezi nenádorovými onemocněními¹. PDT má oproti již zavedeným terapiím jako je chirurgie nebo radioterapie řadu výhod: je poměrně neinvazivní, cíleně zasahuje postiženou tkáň a měla by být bez vedlejších efektů klasické léčby. Díky tomu neexistují žádné omezení, které by nám teoreticky určovali nejvyšší dávku aplikované látky². PDT je pouze léčba lokální nelze ji využít u nádorových onemocnění s metastázami.

Princip PDT zahrnuje kombinaci PS, světla o vhodné vlnové délce a molekulárního kyslíku. PS je aplikován do krevního řečiště a kumuluje se v cílové tkáni. Ta je následně ozářena světlem s vlnovou délkou 600-900 nm (oblast tzv. terapeutického okna), které prochází tkání do větší hloubky a excituje PS. Po ozáření přenáší excitovaný PS absorbovanou energii na volně rozpuštěný kyslík v tkáních za vzniku reaktivních forem kyslíku (především singletového kyslíku). PS se přenesením energie vrací do základního stavu a děj se může opakovat dokud trvá světelná excitace a je přítomen kyslík. Oxidativní atak cytotoxického kyslíku vede k buněčnému poškození a následně k destrukci cílových buněk. Tato přímá buněčná destrukce je doprovázena poškozením cév vyživující tkáň a tím je významně omezen přísun kyslíku a živin. Navíc PDT může aktivovat imunitní systém³.

2.2 Historie PDT

Světlo bylo využíváno k léčbě různých nemocí již od starověku. Již staří Egypťané, Indové nebo Číňané používali světlo k léčbě některých kožních onemocnění (např. psoriasis, vitiligo), infekčních nemocí způsobených rickettsiemi nebo i některých psychóz. Za otce helioterapie je považován řecký lékař Hérodotos, který zdůrazňoval vliv světla na obnovu zdraví.

Přestože léčebné účinky světla jsou známy již staletí, k rozšíření této léčby došlo až počátkem 20. století. Jedním z průkopníků fototerapie byl dánský lékař Niels Finsen, který popsal, že ozáření červeným světlem zabraňuje praskání neštovicových pustul. Za použití ultrafialového světla léčil také kožní formu tuberkulózy, za což obdržel v roce 1903 Nobelovu cenu. První pozorování možnosti indukce buněčné smrti interakcí světla a chemikálií provedl Oscar Raab, student medicíny v Mnichově, v roce 1900. Během pozorování vlivu akridinu na prvoky rodu *Paramecium* zjistil, že kombinace světla a akridinové červeně je pro tato protozoa letální. Von Tappeiner společně s Jesionkem aplikoval kombinaci bílého světla a eosinu k léčbě kožního nádoru, což později vedlo k jeho teorii, že pro účinnost terapie je zapotřebí také kyslík a jako první použil výraz „fotodynamický efekt“.

V roce 1911 Hausmann zjistil, že hematoporfyrin (Hp) v kombinaci se světlem zabíjí prvoky rodu *Paramecium* a červené krvinky. V polovině 50.let minulého století byl připraven z HP jeho účinnější derivát (hematoporphyrin derivate- HpD), známý jako Photofrin^{®4}.

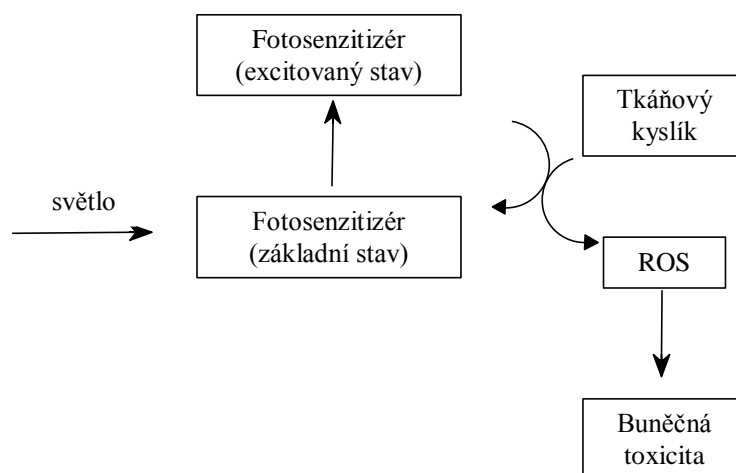
Photofrin[®] byl první PS regulérně schválený pro léčbu různých druhů nádorů v mnohých zemích světa. Když byly shromážděny informace o terapii tumorů pomocí HpD-PDT, zjistilo se, že má mnoho nevýhod: dlouhodobá citlivost kůže na sluneční záření trvající po mnoho týdnů, ne zcela dokonalá selektivita a také velice nízkou maximální vlnovou délku vhodnou pro aktivaci- 630 nm. V posledních letech je tedy práce vědeckých pracovníků zaměřena na objevení nových PS s lepšími vlastnostmi jak z hlediska farmakokinetiky tak farmakodynamiky. V současnosti už je nalezen velký počet potenciálních PS pro PDT, ale je obtížné rozhodnout k jaké aplikaci nebo pro jakou nemoc jsou vhodné¹.

2.3 Základní principy PDT

2.3.1 Mechanismus PDT

Podstata léčby je založena na fotodynamickém účinku. Tento jev lze definovat jako schopnost fotosenzitivních látek, především organických barviv, vyvolávat za přítomnosti světelného záření oxidaci nejrůznějších látek. Základem léčby je kombinace tří složek: fotosenzitizéru (PS), světla a molekulárního kyslíku. Fotodynamický efekt je založen na celkovém nebo lokálním podání PS. Fotosenzitizující látka se selektivně kumuluje v cílové tkáni a poté dojde k ozáření světlem vhodné vlnové délky shodné s absorpčním maximem PS. Po absorpci světla dochází v PS ke vzniku excitovaných stavů a k přenosu energie na kyslík. Tak vzniká singletový kyslík, který je mnohem reaktivnější než jeho základní molekulární stav, což vede k oxidaci membránových lipidů a proteinů, které se projevuje cytolýzou a tumorózní destrukcí. Předpokládá se, že oba mechanismy mohou probíhat při PDT současně, avšak jejich relativní podíl na destrukci nádoru závisí na typu a koncentraci fotosenzitizéru, na koncentraci kyslíku v nádoru a na vazbě fotosenzitizéru na substrát. Výsledným terapeutickým efektem je nekróza, současně s apoptózou nádorových buněk^{4,5}.

Mechanismus PDT (viz obr. 1):



Obr. 1: Zjednodušený princip PDT

2.3.2. Fotofyzika PDT

Základem fyzikálního principu PDT je aktivace fotosenzitizéru světlem o vhodné vlnové délce. Ideální rozpětí se pohybuje v oblasti mezi 680-800 nm. Světlo o nižší vlnové délce proniká pouze do malých hloubek tkáně (řádově několika milimetrů) a zasahují malou plochu. Naopak při vyšších vlnových délkách energie záření je nízká, což limituje aktivaci PS⁴.

Základní stav PS má dva elektrony s opačnými spiny (singletový) v molekulárním orbitalu s nízkou energií. Po absorpci světla dochází k excitaci elektronu na orbital s vyšší energetickou hladinou: $^1\text{PS} \rightarrow ^1\text{PS}^*$ = první excitovaný singletový stav. Ten trvá pouze nanosekundy a z této hladiny může PS přecházet zpět do energeticky nižší hladiny více způsoby a to buď procesy radiačními (emisí světla-fluorescencí), anebo vnitřní konverzí dochází k uvolnění přebytečné energie ve formě tepla (neradiační proces)¹.

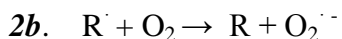
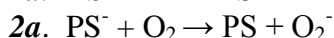
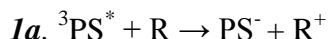
První excitovaný stav může také vést k procesu známému jako „intersystem crossing“, při němž dochází k inverzi spinu jednoho elektronu. $^1\text{PS}^*$ přechází do stavu relativně déle trvajícího (řádově mikrosekundy) - do excitovaného tripletového stavu ($^3\text{PS}^*$). Relativně dlouhotrvající tripletový stav PS je tzv. proces „spinem-

zakázány“. Tento proces je preferovaný mnohem méně než „povolené“ procesy. Ale dobrý PS prochází touto „nepovolenou“ cestou poměrně s velkou pravděpodobností, což je pro fotodynamickou aktivitu velmi důležité^{1,4}.

2.3.4 Fotochemie

Z tripletového stavu se PS může uvolnit buď vyzářením protonu ve formě fosforescence, nebo dvěma procesy, které jsou pro PDT zásadní. Jedná se o fotoproces typu I a hlavně fotoproces typu II, který je zejména odpovědný za fotodynamický účinek. Oba dva zmíněné fotoprocesy se objevují současně a poměr mezi nimi je silně ovlivněn použitým PS, substrátem a koncentrací kyslíku⁴.

2.3.4.1 fotoproces typu I (přenos elektronu)



Obr.2. Reakce probíhající při fotoprocesu I

Ve fotoprocesu typu I může PS reagovat jak se substrátem, tak i s buněčnými membránami nebo molekulami. Dochází k přenosu protonu či elektronu a vzniká radikál dané částice. Tyto radikály mohou později reagovat s molekulárním kyslíkem a produkovat vysoce reaktivní formy kyslíku, které jsou zodpovědné za následné poškození tkáně¹.

k fotoprocesu I dochází většinou za snížené koncentrace kyslíku. Při úplné anoxii reaguje excitovaný fotosenzitizér (${}^3\text{PS}^*$) přímo s okolním biologickým substátem (R), dochází k přenosu elektronu a vzniká oxidovaný substrát (R^+) a redukovaný fotosenzitizér (PS^-) (viz obr.2 *1a*). Za snížené koncentrace může PS^-

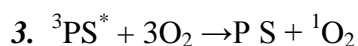
reagovat dále a při jeho reakci s kyslíkem vzniká superoxid anion radikál ($O_2^{\cdot -}$) (viz obr.2 **2a**).

Může nastat i druhá varianta, kdy již v prvním kroku dochází k tvorbě radikálů z biologického substrátu (R \cdot) nebo rozpouštědla (viz obr.2 **1b**) a ten může reagovat s kyslíkem za vzniku superoxid anion radikálu ($O_2^{\cdot -}$) (viz obr.2 **2b**) nebo přímo zafixují změnu v biologické molekule její oxidací RO^4 .

Superoxid není mimořádně reaktivní v biologických systémech a nezpůsobuje sám o sobě velké oxidativní poškození, ale mohou spolu reagovat jeho dvě molekuly za vzniku peroxidu vodíku a kyslíku (dismutace). Často dochází k tzv. Fentonově reakci, kdy díky superoxidu vzniká z peroxidu vodíku (H_2O_2) reaktivní hydroxylový radikál (HO^{\cdot}) a hydroxidový iont (HO^-). Reakce je katalyzována kovy obsaženými v buňkách (např. železo, měď a jiné), ty jsou superoxidem redukovány a mohou štěpit vazbu O-O peroxidu vodíku.

Hydroxylový radikál (HO^{\cdot}) je vysoce reaktivní, způsobuje oxidativní změny v substrátech a dává vznik dalším reaktivním iontům. Jedná se o řetězovou reakci a ta demonstruje proč hydroxylový radikál (HO^{\cdot}) způsobuje takové rozsáhlé poškození.

2.3.4.2 Fotoproces typu II (přenos energie)

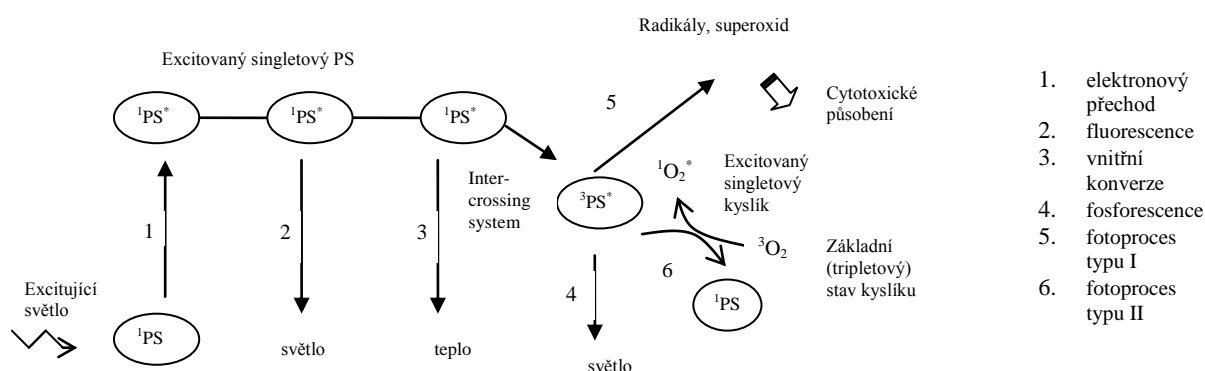


Obr.3. Reakce probíhající při fotoprocesu II

Při zvýšené koncentraci kyslíku dochází k fotoprocesu II. Energie se přenáší z excitovaného PS (${}^3PS^*$) na základní stav molekulárního kyslíku, díky inverze spinu v jednoho z elektronu ve vnější vrstvě vzniká velmi reaktivní singletový kyslík (1O_2 , viz obr. 3). Doba života 1O_2 je různá a je závislá na prostředí ve kterém se nachází (např. voda 2-4 μs , lipidy 10-100 μs , organická rozpouštědla 10-100 μs). Oxidativní atak cytotoxického 1O_2 vede k buněčnému poškození a následné destrukci rakovinných buněk ⁴.

Singletový kyslík má malý difuzní poloměr ($\leq 0,1 \mu\text{m}$), panuje jednotný názor, že $^1\text{O}_2$ není schopný prostoupit hlouběji než je šířka lipidové buněčné membrány. Díky tomuto malému difúznímu poloměru lze PDT považovat za selektivní metodu tumorové léčby, protože zasahuje pouze ozářenou oblast tumoru obsahující senzitivizátor^{3,4}.

Terčem $^1\text{O}_2$ jsou především molekuly obsažené v membránách, dále DNA, nenasycené mastné kyseliny, cholesterol a aminokyseliny např. cystein, methionin, tyrozin, histidin a tryptofan. Aktivovaný kyslík reaguje s biologickým materiálem oxidací nebo cykloadicí. Po poškození reaktivním kyslíkem přestávají biomolekuly plnit své biologické funkce a dochází k celkovému ireversibilnímu poškození buňky a v konečném důsledku až k její smrti.



Obr.4. Grafická ilustrace fotofyzikálního a fotochemického mechanismu PDT

2.3.5. Biologické mechanismy PDT

Na zničení nádorů se nepodílí pouze destrukce každé jednotlivé molekuly, ale dochází ke spolupůsobení několika mechanismů, které vedou ke smrti buňky apoptózou nebo nekrózou. Za hlavní mechanismy jsou v současnosti považovány:

- a) přímý efekt PDT na cílové buňky
- b) změny v cévním zásobení tkáně
- c) aktivace imunitního systému

Subcelulární lokalizace PS se zdá být klíčovým faktorem pro výsledné působení. Hydrofobní PS se většinou inkorporují do mitochondrií a díky inhibici enzymů v nich obsažených velmi rychle iniciují apoptózu. Pro hydrofilní PS jsou místem zásahu v buňce spíše lysozomy, kdy po ozáření dochází k uvolnění enzymatického obsahu (hydroláz).

Jestli bude preferován přímý efekt destrukce nebo vaskulární změny závisí na distribuci PS v každém kompartmentu, což je ovlivněno farmakokinetickými vlastnostmi PS a můžeme je ovlivnit podáním PS, změnou světelného intervalu nebo molekulární struktury. PDT užívající kratší světelné intervaly vede k vazokonstrikci a omezení cévního zásobení, kdežto při dlouhých intervalech je PS víceméně kumulován v cílové tkáni a většina buněk umírá přímo po ozáření^{4,6}.

PDT také velmi významně ovlivňuje imunitní systém, ve větším počtu případů dochází k jeho aktivaci a napadená tkáň uvolňuje množství cytokininů a prozánětlivých signálů. To odstartuje kaskádu procesů, do kterých je zapojena většina buněk imunitního systému, dochází k zesílení zánětlivého procesu a smrti buňky⁴.

2.4. Fotosenzitizéry

Fotosenzitizéry jsou přírodní nebo syntetické látky, jejichž základní vlastností je, že po absorpci světla o vhodné vlnové délce, jej dokáží přeměnit na energii užitečnou, v případě PDT cytotoxickou vůči cíleným buňkám. Mnoho produktů se chová jako PS, avšak velmi málo se dostane do stádia klinických zkoušek a jen zlomek je komerčně využit. Lze říct, že většina látek PS využívaných v praxi je založena na porfyrinovém cyklu.

Důležitou charakteristikou každého PS je cílená kumulace v nemocné tkáni a uvolnění produktů toxických pro nemocnou buňku a následná indukce produkce požadovaných biologických efektů. Bohužel nejrozšířenější a v praxi stále nejčastěji používaný PS - Photofrin[®] má mnoho nežádoucích vlastností a proto je stále snaha o vývoj PS, který se svými vlastnostmi blíží ideálnímu PS⁷.

2.4.1. Vlastnosti ideálního fotosenzitizéru

Nízká toxicita: PS by měl být toxický pouze po ozáření a jeho metabolické produkty musí být také toxicky neaktivní.

Dobrá selektivita: PS by se měl kumulovat ve zvýšené míře v nádorových tkáních na rozdíl od jiných tkání.

Rychlá exkrece: Zbylý PS by v krevním řečišti mohl způsobit krevní systémovou toxicitu, proto je rychlá exkrece PS žádoucím jevem.

Vhodná absorpce PS: Výhodou je vyšší absorpce v oblasti vlnových délek „terapeutického okna“ a naopak nízká absorpce v oblasti spektrálního maxima denního světla 400–600 nm z důvodu možné fotosenzitizace kůže. Proto se jako

nejvhodnější jeví absorbance v oblasti 650- 800 nm, kdy jsou penetrační schopnosti světla maximální při energii dostačující k produkci singletového kyslíku.

Chemická čistota: PS by měl být chemicky čistý a známého složení. Dnešní PS jsou již dobře charakterizované látky, na rozdíl od HpD, kde se jedná o směs mono-, di- a oligomerů derivatizovaného hematoporfyrinu.

Kvalitní fotochemické vlastnosti: Pro PS je žádoucí vysoký kvantový výtěžek tripletového stavu (Φ_T) a jeho dlouhá doba života (τ_T), umožňující následně vysokou produkci hlavního cytotoxického agens singletového kyslíku.

Vhodné fyzikálně-chemické vlastnosti: Polární, hydrofilní senzitizery mohou být aplikovány intravenózně. Hydrofobní senzitizery vyžadují aplikaci na nosičích a vykazují většinou vyšší retenci v tumorových tkáních.

Cena, dostupnost, modifikovatelnost: PS by měl být snadno dostupný, cenově přiměřený a v případě potřeby snadno modifikovatelným^{7,8}.

Jednou z obecných vlastností barviv stejně tak fotosenzitizerů je jejich vyblednutí tzv. „photobleaching“. Dle fotochemické a fotobiologické definice se jedná o ztrátu intenzity absorpce či emise způsobenou světlem. Dochází k chemickým změnám (např. fotoadici, fotocyklizaci, ireverzibilní fotoredukci, nejčastěji však oxidaci) v chromoforu⁹. Známé jsou dvě ireverzibilní chemické změny: fotomodifikace a tzv. „pravý photobleaching“.

Při fotomodifikaci dochází ke ztrátě absorpce nebo fluorescence při určité vlnové délce, ovšem chromofor zůstává zachován.

Při pravém photobleachingu už je zásah tak hluboký, že dochází k rozpadu chromoforu na malé fragmenty, bez významné absorpce ve viditelné oblasti.

Důsledkem těchto dvou jevů (více se uplatňuje pravý photobleaching) je to, že poté už PS neabsorbuje světlo a to může proniknout do hlubších vrstev. Na druhou stranu ovšem rozložený PS je již neaktivní a nemůže vykazovat žádné cytotoxické

vlastnosti. Photobleaching se může také podílet na rychlejším vylučování PS z těla díky jeho rozkladu v kůži¹⁰.

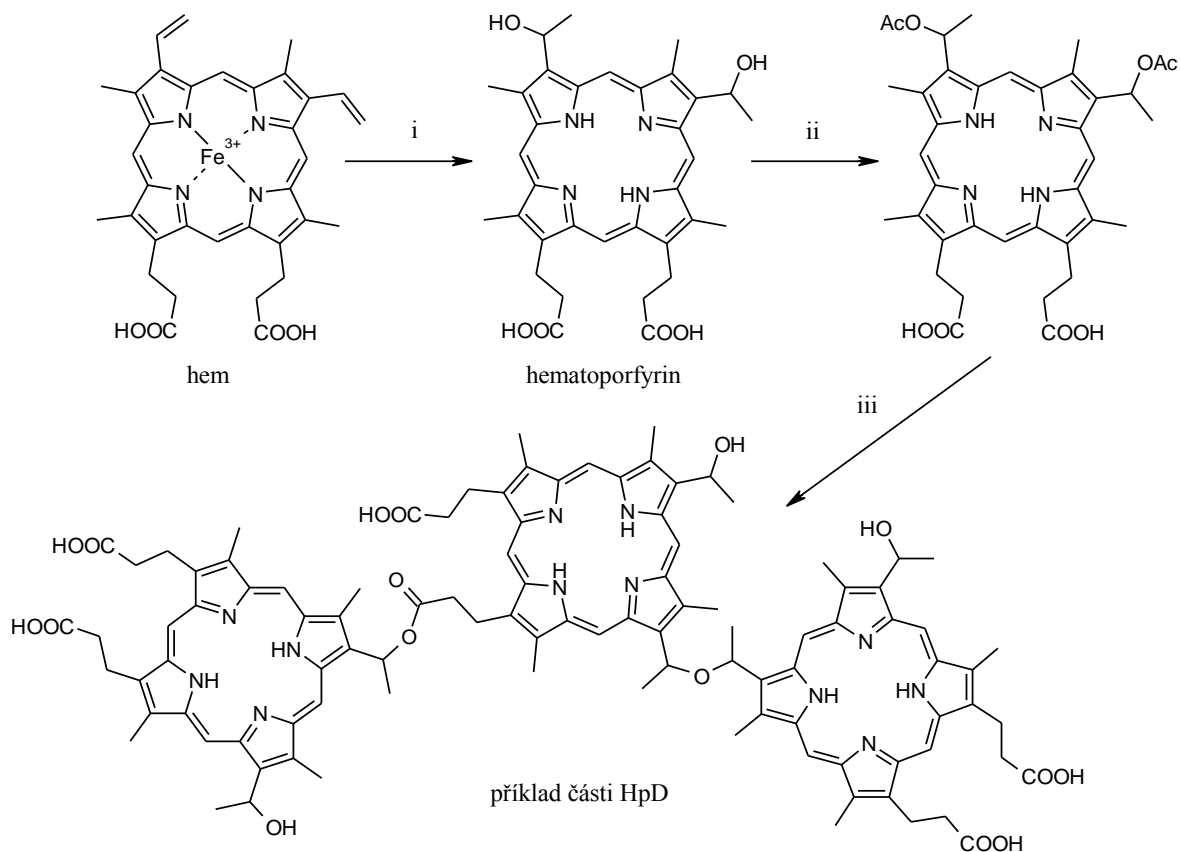
2.4.2 Přehled fotosenzitizérů

Fotosenzitizéry můžeme rozdělit do tří generací. První generaci zastupuje pouze HpD, stalé jeden s nejrozšířenějších a nejpoužívanějších PS. Má však mnoho negativních vlastností a nežádoucích účinků a proto je výzkum zaměřen na vývoj PS s lepšími vlastnostmi. Tak vznikla druhá generace zahrnující jak deriváty porfyrinu, tak látky s odlišnou strukturou. Třetí generaci tvoří deriváty porfyrinů konjugované např. s biomolekulami umožňující lepší distribuci v těle.

2.4.2.1 První generace

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

Photofrin[®] je hematoporfyrinový derivát, který byl vůbec jako první látka PDT použit v roce 1993 v Kanadě při léčbě karcinomu močového měchýře. Byl vyvinut firmou QLT Phototherapeutics (Vancouver, Canada) a jeho práva jsou od roku 2000 ve vlastnictví AxcanPharmy (Montreal, Kanada). HpD je složitá směs mono-, di- a oligomerů, jejichž jednotky jsou spojeny esterovými nebo éterovými vazbami¹¹. Vzniká chemickými reakcemi z hematoporfyrinu (viz obr. 5). Hematoporfyrin je izolován z hemu, který se působením HBr v kyselině octové zbavuje centrálního kovu. HBr se také aduje na periferní dvojně vazby, potom se ve vodném prostředí brom odštěpí a vznikne hematoporfyrin, z něhož další úpravou reakčních podmínek vzniká směs, která po vyčištění pomocí gelové chromatografie dává vzniku Photofrinu[®].



Obr. 5: Syntéza HpD. Reakční podmínky: i) HBr , k. octová, H_2O , ii) H_2SO_4 , k. octová, iii) NaOH

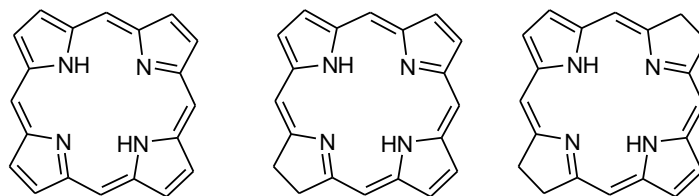
Jakožto první látka uvedena do praxe má HpD mnoho nevýhod, jmenovitě je to nízká vlnová délka vhodná pro aktivaci (630 nm) a nízký extinkční koeficient při této vlnové délce ($1170 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Z těchto údajů vyplývá, že pro účinek je zapotřebí jak vysoká dávka světla, tak i PS. Také vychytávání v cílové tkáni není optimální, jedním z častých a pro pacienta omezujícím problémem je ukládání HpD v kůži a z toho plynoucí fotosenzitivita, která může přetrvávat až 6 týdnů¹².

Klinické aplikace: Fotodynamická terapie s využitím HpD vykazuje slibné výsledky v léčbě Barretova jícnu. Jedná se o prekancerózní stav, kdy dochází k přerůstání žaludečního epitelu do distálního jícnu. HpD je aplikován injekčně a trvá 2 dny než se vytvoří optimální koncentrace v cílové tkáni¹³. Z dalších prekancerózních stavů léčených pomocí PDT lze zmínit cervikální dysplazii.

V Itálii probíhala od roku 1989 do roku 2004 studie, kde bylo zjištěno že PDT s Photofrinem[®] jako PS je efektivní při léčbě časného nebo recidivujícího stádia nemalobuněčného plicního karcinomu (odpověď na léčbu byla 72%)¹⁴.

Tento PS lze také použít při kancerózních onemocnění cervixu, jícnu, močového měchýře, žaludku a bronchialního karcinomu. V testování jsou i další aplikace v nádorových onemocněních nebo jiných nenádorových např. psoriázy⁷.

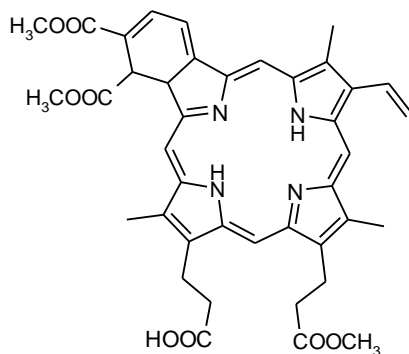
2.4.2.2 Druhá generace



Obr. 6: *porfyrin* *chlorin* *bakteriochlorin*

Do druhé generace se řadí např. látky ze skupiny porfyrinů, jim příbuzných chlorinů a bakteriochlorinů, ftalocyaninů, naftalocyaninů, porfycenů, texafyrinů a dalších. U látek druhé generace se absorpční maximum posouvá k vyšším hodnotám vlnové délky (650-800 nm). To znamená, že je lze aktivovat světlem, které proniká mnohem hlouběji do tkání⁷.

Verteporfin (BPD-MA, Visudyne™)



Obr. 7: verteporfin

Verteporfin se sestává ze směsi stejně aktivních regioizomerů BPD-MAC a BPD-MAD v poměru 1:1.

Jde o fotosenzitivní látku s optimem při vlnové délce světla 680-695 nm, při níž světlo proniká dvakrát hlouběji než při 630 nm. Optimální koncentrace verteporfinu je dosaženo přibližně po 30-150 minutách, protože je jak rychle absorbován, tak rychle vylučován. Tím klesá i fotosenzitivita kůže na sluneční záření asi na 2 dny⁷.

Klinické aplikace: Největší úspěchy dosahuje tento PS v oftalmologii, při terapii stařecké makulární degenerace (AMD) nebo rakoviny. Byl uveden na trh již roku 2000 pod obchodním názvem Visudyne™ firmou QLT PhotoTherapeutics. První příznaky počínající AMD lze zjistit u cca 15% všech osob, starších 50 let. Patogeneze AMD je dosud nejasná. Víme, že svůj podíl mají genetické faktory, kouření, hypertenze, vysoký cholesterol, zvýšené expozice světlu, dokonce i barva duhovky. Důležitou vlastností verteporfinu je, že se váže na LDL cholesterol, s nímž tvoří komplexy. Receptory pro LDL cholesterol jsou zvláště četné právě v neovaskulárním komplexu a tím je daná kumulace PS v cílové tkáni. Uplatnění fotodynamické léčby významně snižuje riziko mírné až těžké ztráty zraku v porovnání s placebem, nejde však o účinek absolutní. Dochází k zastavení vývoje onemocnění ne však k jeho úplnému vyléčení. Nevýhodou metody je, že v současném stadiu vývoje nepůsobí trvale a je ji třeba po pár měsících opakovat¹⁵.

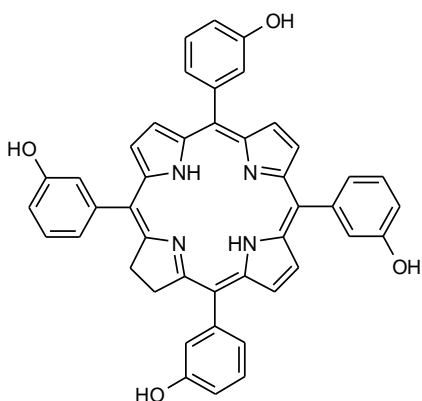
Kontraindikován je u nemocných s porfyrií nebo při přecitlivělosti na tuto látku. U dětí dosud nebylo dávkování stanoveno.

Dále byl objeven potenciál verteporfinu při terapii lokálních mykobakteriálních infekcí. Zatím byl testován pouze *in vitro* nebo *in vivo* na myších¹⁶.

Dále probíhají studie, které zkoumají možnost kombinace verteporfinu pro léčbu AMD např. s bevacizumabem¹⁷ (II. fáze testování) nebo triamcinolonem¹⁸ (III. fáze testování).

Temoporfin (*m*THPC, Foscan®)

Temoporfin (tetra(*meta*-hydroxyfenyl)chlorin, *m*THPC) patří do skupiny chlorinů.



Obr. 8: temoporfin

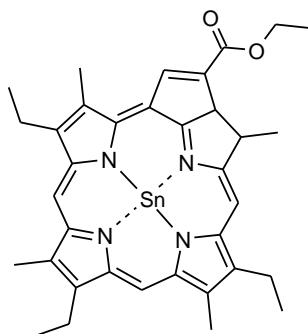
I když jeho absorpční maximum je nízké 652 nm, je to jeden z nejefektivnějších fotosenzitizérů, díky jeho extinkčnímu koeficientu, který je asi 10× vyšší než u HpD. Pro dostatečný účinek jsou potřebné nízké dávky světla (10-20 J/cm²) i PS (0.1-0.3 mg/kg)¹⁹.

Nevýhodou ovšem je poměrně malá selektivita vychytávání mezi nádorovou a zdravou tkání. Také fotosenzitivita se u pacientů vyskytuje poměrně dlouho – doba mezi parenterálním podáním a ozářením je zpravidla něco kolem 3-4 dnů²⁰, následující 2 týdny je pacient vysoce citlivý na sluneční světlo.

Klinické aplikace: Pro komerční účely byl pod názvem Foscan® uveden na trh roku 2001 firmou Biolitec Pharma (Edinburgh). Hlavní indikace Foscanu je paliativní léčba pacientů s pokročilým skvamózním karcinomem v oblasti hlavy a krku (druh nádoru, který vzniká v buňkách vystylajících ústa, nos, hrdlo nebo ucho), při kterém selhaly předchozí způsoby léčby²¹.

Méně se využívá u rakoviny bronchů, žaludku nebo jícnu. Ukázal se účinný i při Barrettově jícnu²². Dále probíhají studie léčby rakoviny prostaty, slinivky a jiných zhoubných onemocnění.

Rostaporfin (Photrex[®], Tin etiopurpurin, SnET2, Purlytin[®])



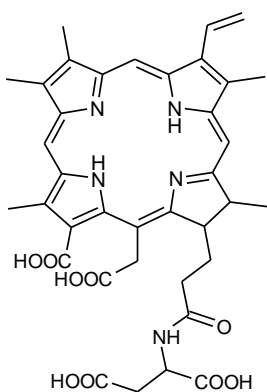
Obr. 9: SnET2

Tento PS patří do skupiny chlorinů, resp. metalochlorinů (uprostřed skeletu je vázaný kation cínu). Rostaporfin je aktivován při vlnové délce 664 nm, 24 h po aplikaci látky²³. I přes silné absorpční maximum má látka nevýhodné farmakodynamické vlastnosti podobné porfimeru: vysoké dávky světla potřebné pro terapii a kožní senzitivita trvající až 14 dní.

Pod obchodním názvem Photrex[®] zaregistrovala rostaporfin farmaceutická firma Miravant Medical Technologies (USA). Ta zkoumá využití rostaporfinu v léčbě ADM (III. fáze testování)²⁴.

Klinické aplikace: Rostaporfin se testuje jako prostředek léčby kožních nádorů, také byla ukončena druhá fáze zkoušek u Kaposiho syndromu u pacientů s AIDS. Probíhají studie zaměřené na využití rostaporfinu v terapii endometriální ablace a karcinomu prostaty²⁵.

Talaporfin (talaporfin sodium, Npe6, LS-11, MACE)



Obr. 10: talaporfin

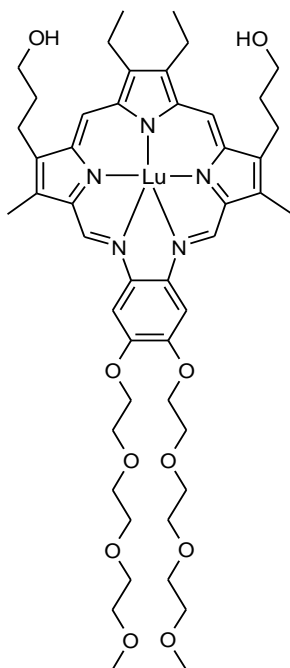
Mono-L-aspartyl chlorin e6 (Npe6) je ve vodě dobře rozpustný PS náležící do skupiny chlorinů. Absorpční maximum se pohybuje okolo 664 nm ($\epsilon_{664} = 40\,000\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Pozitivem je nízká kožní fototoxicita, dána rychlou exkrecí látky z těla, z tohoto důvodu se také cílová tkáň ozařuje 4h po aplikaci látky.

Klinické aplikace: Na trh byl uveden firmou Meiji Seika Kaisha (držitel licence, Tokyo) pro léčbu časného stádia broncho-pulmonálního karcinomu plic²⁶. Probíhají klinické studie využití talaporfinu u karcinomu jater (III. fáze testování), rektálního

karcinomu s metastázemi v játrech (III. fáze testování) a zkoumá se prospěšnost léčby u stařecké makulární degenerace (I. fáze testování)²⁷. Probíhají další testy pro léčbu pokročilých stavů rakoviny např. neoperativního maligního nádoru mozku, skvamózních nádorů (krku, prsu)²⁸.

Motexafin lutecium (LuM, Lutex, Optrin[®], Antrin[®], Xcytrin[®])

LuM je strukturou odlišný od předešlých látek, je to derivát texafyriu s charakteristickým pětiusíkatým makrocyclickým jádrem. Uprostřed makrocyklu má centrálně vázaný atom lutecia.



Obr. 11: motexafin lutecium

Je to čistý, ve vodě rozpustný PS s vysokým absorpčním maximem (732 nm). Je prokázána dobrá selektivita k nádorové tkáni. Z krevní plazmy je vylučován celkem rychle, nejvyšší koncentrace látky v cílové tkáni je po 3h, po 5h už je to jen 50 %. Díky rychlé exkreci trvá kožní fotosenzitivita 24-48 h²⁹.

Klinické aplikace: Pod komerčním názvem Antrin[®] začala firma Pharmacyclics (Sunnyvale, USA) testovat motexafin lutecium. Nyní se nachází ve druhé fázi klinického testování účinku na nemalobuněčný plicní karcinom (NSCLC). Byla ukončena také 3. fáze klinického zkoušení aplikace motexafinu lutecia u nádorů mozku, ale FDA v prosinci 2007 neschválila marketingový clearance³⁰.

Testuje se prospěšnost látky v kardiologii při terapii aterosklerózy, kdy princip účinku spočívá v kumulaci léčiva v aterosklerotických plátech, kde po ozáření dochází k eliminaci makrofágů a buněk svaloviny, které se na tvorbě aterosklerotického plátu podílejí³¹.

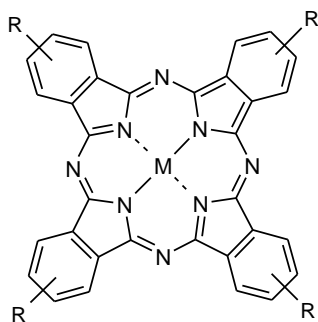
Byla ukončena I. fáze klinického zkoušení karcinomu prostaty a cervikální intraepiteální neoplazie. Zkoumá se i prospěšnost léčby u karcinomu prsu.

Photochlor (HPPH)

HPPH (2-[1-hexyloxyethyl]-2-devinyl pyropheophorbide-a) je hydrofobní, lipofilní PS patřící také do skupiny chlorinů (přesněji se jedná o derivát feoforbidu). Má lepší selektivitu v nádorové tkáni i rychlejší exkreci oproti porfimeru, tkáň se ozařuje 48h po aplikaci Photochloru ($\lambda_{\max}= 665\text{nm}$, $\epsilon_{666}= 50\,000\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)³².

Klinické aplikace: Probíhá druhá fáze klinických zkoušek photochloru na léčbu nemalobuněčného karcinomu plic. Testuje se prospěšnost (první fáze klinických zkoušek) pro léčbu nádorů krku, hlavy a kůže.

FTALOCYANINY (Pc)



Obr. 12: ftalocyaniny

Ftalocyaniny jsou syntetické porfyriny vykazující největší absorpci v dlouhovlnné oblasti viditelného spektra (670-700 nm), což je důsledkem 4 benzenových jader přikondenzovaných k porfyrizinovému cyklu, stejně jako silná absorpce při této vlnové délce ($\epsilon = 200\,000\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Uvnitř cyklu se jsou chelatovány kovy nebo polokovy (Zn, Al), díky nimž je prodloužen tripletový stav PS a tím i jeho účinnost.

Ftalocyaniny jsou většinou hydrofóbní, špatně rozpustné sloučeniny (jak ve vodě, tak v organických rozpouštědlech). Jejich rozpustnost lze zvýšit substitucí periferních cyklů sulfonovou kyselinou, karboxylovou kyselinou nebo amino skupinou. Problémem bývá separace a čistota takovýchto produktů, finální produkt je směs např. mono-, di-, tri-, tetrasulfonových derivátů³³.

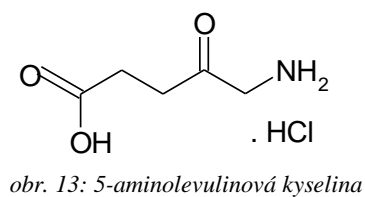
Klinické aplikace: Směs sulfonovaných derivátů je v Rusku užíván v praxi pod názvem Photosens, hlavně pro léčbu nádorových onemocnění kůže a prsu. Také byla prokázána prospěšnost Photosens v oftalmologii, probíhá druhá fáze testování jeho

využití při léčbě subretinální neovaskulární membrány, která bývá často příčinou nemoci jako stařecké makulární degenerace, myopatie a jiných³⁴.

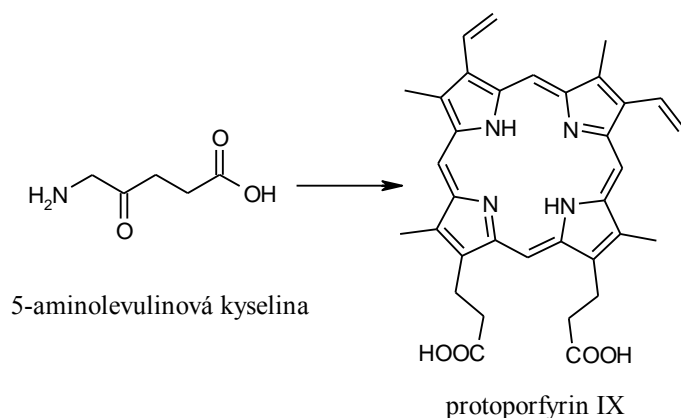
Dalším zkoušeným PS je Pc4 (křemičitý komplex ftalocyaninu), který se nachází v první fázi klinických testů (pod záštitou National Cancer Institute) účinku při léčbě maligních i nemaligních onemocnění kůže³⁵.

Přidáním dalšího benzenového jádra na periferii získáme naftalocyaniny, které absorbují při dlouhých vlnových délkách (až 770 nm). Tím je zvýšena terapeutická hloubka, lze je tedy využít i pro vysoce pigmentované nádory (melanom).

5-AMINOLEVULINOVÁ KYSELINA (ALA, Levulan[®], Metvix[®], Hexvix[®], Benzvix[®])



ALA je metabolický prekurzor v biosyntéze hemu. Prostřednictvím negativní zpětné vazby, kdy hladina hemu je zvýšená, dochází k inhibici konverze glycinu a sukcylnylCoA na ALA. Tím, že je ALA dodána exogenně, se obejde tento kontrolní mechanismus a protoporfyrin IX (PpIX), který funguje jako spolehlivý PS, je možno nadále syntetizovat. Ve zdravé tkáni vzniká z PpIX pomocí ferrochelatasy fotodynamicky neaktivní hem, kdežto ve tkáni nádorové k této inkorporaci nedochází a PpIX se tady kumuluje.



obr. 14: Syntéza PpIX z kyseliny 5-aminolevulinové

ALA má několik výhod oproti HpD: doba mezi podáním látky a ozářením se pohybuje okolo 2-4h, díky rychlé exkreci látky z těla (24h) je možno léčbu opakovat již za 48h bez narušení normální tkáně. ALA může být podána jak systémově tak topicky, úspěchy jsou zaznamenány spíše v lokální léčbě kůže.

Přestože ALA nabízí jisté výhody oproti HpD, stále je to porfyrinový derivát se svými nedostatky. Absorpční maximum se nachází při 630 nm, což nepřesahuje hloubku penetrace u HpD.

Klinické aplikace: Pod názvem Levulan[®] Kerastick[®] je firmou DUSA Pharmaceuticals (Toronto, Kanada) používán k léčbě aktinoidní keratózy³⁶.

Dále je zkoumáno využití ALA v mnoha aplikacích: léčba akné vulgaris, prekancerózy ústní dutiny, nádoru močového měchýře, cervikální dysplazii a lupénky.

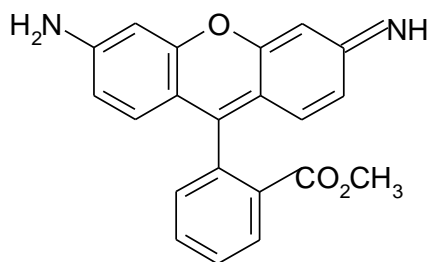
Hydrofilní povaha ALA omezuje průnik pokožkou, a proto byly do terapie uvedeny její estery, které zlepšují penetraci pokožkou a po hydrolyze uvolňují volnou kyselinu 5-aminolevulinovou. Metvix[®] (methylester ALA) je používán k léčbě karcinomu bazálních buněk kůže a aktinoidní keratózy. Zkoumá se využití u akné vulgaris, cervikální dysplazii a Bowenovy nemoci³⁷.

Hexvix[®] (hexylester ALA) je užíván k detekci rakoviny močového měchýře. V klinickém testování (II. fáze) je fotodetekce polypů a rakoviny tlustého střeva. Metvix[®] a Hexvix[®] jsou produkty firmy Photocure (Oslo, Norsko)³⁸. Benzyl ester kyseliny 5-aminolevulinové Benzvix[®] je zkoumán pro využití ve fotodiagnostice rakoviny jícnu a tlustého střeva.

DALŠÍ FOTOLENIZIZÉRY

Rhodaminy – jsou specificky vychytávány mitochondriemi a využívají se jako fluorescenční barviva³⁹. Pro zvýšení fotodynamického účinku jsou substituovány těžkými atomy. Po substituci se absorpční maximum pohybuje mezi 500 a 600 nm⁴⁰. Bromovaný analog zaznamenal úspěchy v testech autotransplantační léčby myeloidní

leukémie. Nejznámější látkou patřící do této skupiny je Rhodamin 123 (viz obr.15), testuje se jeho možné využití v terapii rakoviny prostaty⁴¹.



obr. 15: Rhodamin 123

Methylénová modř – je derivát fenothiazinu, využíván k dekontaminaci čerstvě zmrazené plazmy. Inaktivuje viry, pro člověka je však netoxická. *In vivo* je redukcí enzymy přítomných v buňkách inaktivována na fotodynamicky neaktivní leukoformu⁷.

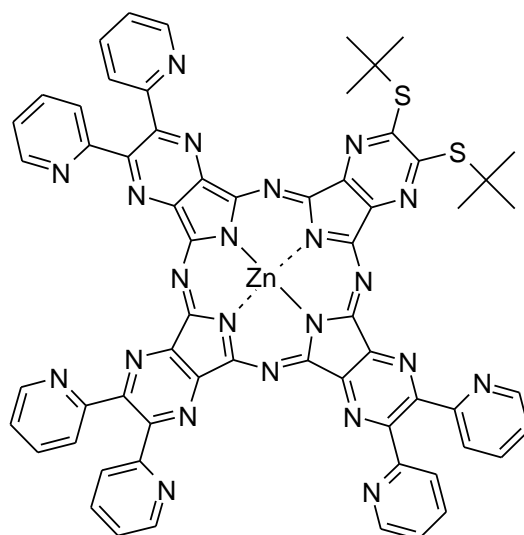
Porfyceny – mají maximum absorpce při 600-650 nm, modifikací na periferii lze dosáhnout velmi dobrých farmakokinetických vlastností. 9-acetoxy-2,7,12,17-tetrakis-(beta-methoxyethyl)-porphycene (ATMPn) patří mezi nejrychleji vychytávané PS v *in vitro* studiích. Je aplikován pouze topicky a umožňuje léčbu kožních nemocí vázaných na keratinocyty či fibroblasty⁴².

Hypericin - je látka s antibakteriálními, antivirovými a antidepresivními účinky. Zdrojem hypericinu je třezalka tečkovaná (*Hypericum perforatum*). Po požití látky a vystavení se slunečnímu záření se projeví tzv. hypericismus (kožní dráždění a zvýšená teplota). Probíhají studie využití v terapii premaligních změn a karcinomu močového měchýře⁴³.

Safyriny – byly objeveny jako náhodný produkt syntézy vitamínu B12 a patří do skupiny expandovaných porfyrinů (max absorbance okolo 675 nm). Mají dobrou selektivitu v tkáních, ovšem pomalé dosažení c_{\max} ve tkáních (několik dnů)⁴⁴.

3 Cíl práce

Cílem této diplomové práce byla syntéza nesymetrických azaftalocyaninů (AzaPc) s různým počtem pyridylových substituentů na periferii makrocyklu. Tyto pyridylové cykly je možno později kvarterizovat, čímž je lze do molekuly vnést různý počet nábojů a tím i zvýšit rozpustnost nesymetrických AzaPc ve vodě. Mým úkolem bylo statistickou kondenzací připravit ze dvou odlišných prekurzorů směs šesti různých molekul AzaPc, tyto sloučeniny izolovat, vyčistit a charakterizovat (příklad jednoho AzaPc viz obr. 16).



obr. 16: ukázka jednoho AzaPc

4 Metodická část

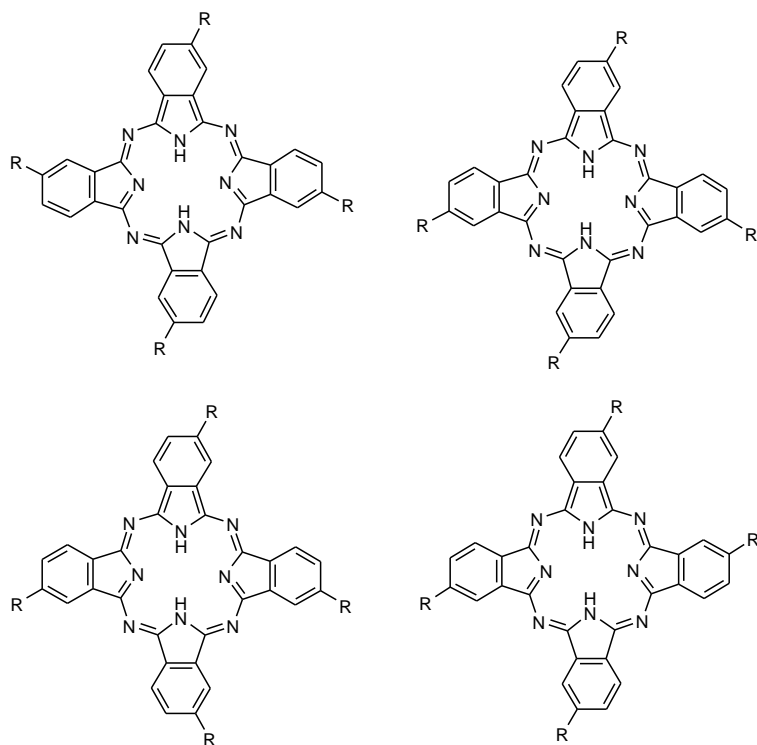
4.1 Syntéza nesymetrických ftalocyaninů (Pc)

Ftalocyaniny (phthalocyanines, Pcs) jsou aromatické makrocykly. Ve své molekule obsahují čtyři isoindolinové jednotky spojené v polohách 1 a 3 dusíkovými můstky. Díky delokalizovaným π elektronům mají tyto látky jedinečné fyzikální vlastnosti, které se využívají v mnoha oblastech. V poslední době stojí v popředí syntéza nesymetrických Pc z důvodů zlepšení fotodynamických vlastností látky: např. zlepšení rozpustnosti, posun k červené oblasti světla.

Na rozdíl od syntézy symetrických prekurzorů, kdy se cyklizace účastní pouze jedna látka, při nesymetrických syntézách spolu reagují minimálně dva prekurzory (**A** a **B**) nebo lze pro cyklizaci využít jednoho substituovaného prekurzoru, který není symetricky souměrný (např. monosubstituovaný ftalonitril).

4.1.1 Nesymetrický prekurzor

Cyklizace nesymetricky substituovaného prekurzoru vede ke směsi 4 polohových (konstitučních) izomerů, které ukazuje obr. 17. Ve většině případů vzniká směs produktů, které se často těžko charakterizují a separují na základě jejich špatné rozpustnosti, sklonu k tvorbě agregátů a velice podobným vlastnostem.

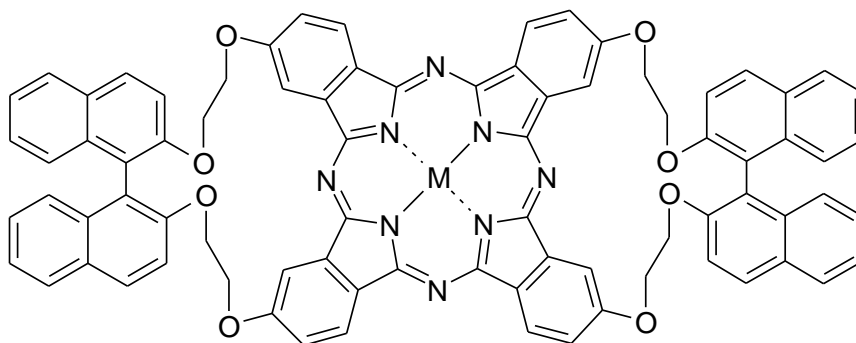


Obr. 17: možné polohové izomery

Pro vznik pouze jednoho konstitučního izomeru lze využít dvě metody selektivní syntézy:

Statistický přístup – při statistickém přístupu lze upravením reakčních podmínek např. přidáním katalyzátoru alkoholátu lithného, použitím kovového nosiče (Zn^{II} , Ni^{II} , Cu^{II}) nebo změnou teploty reakce, vyprodukovat pouze jeden z možných izomerů⁴⁵.

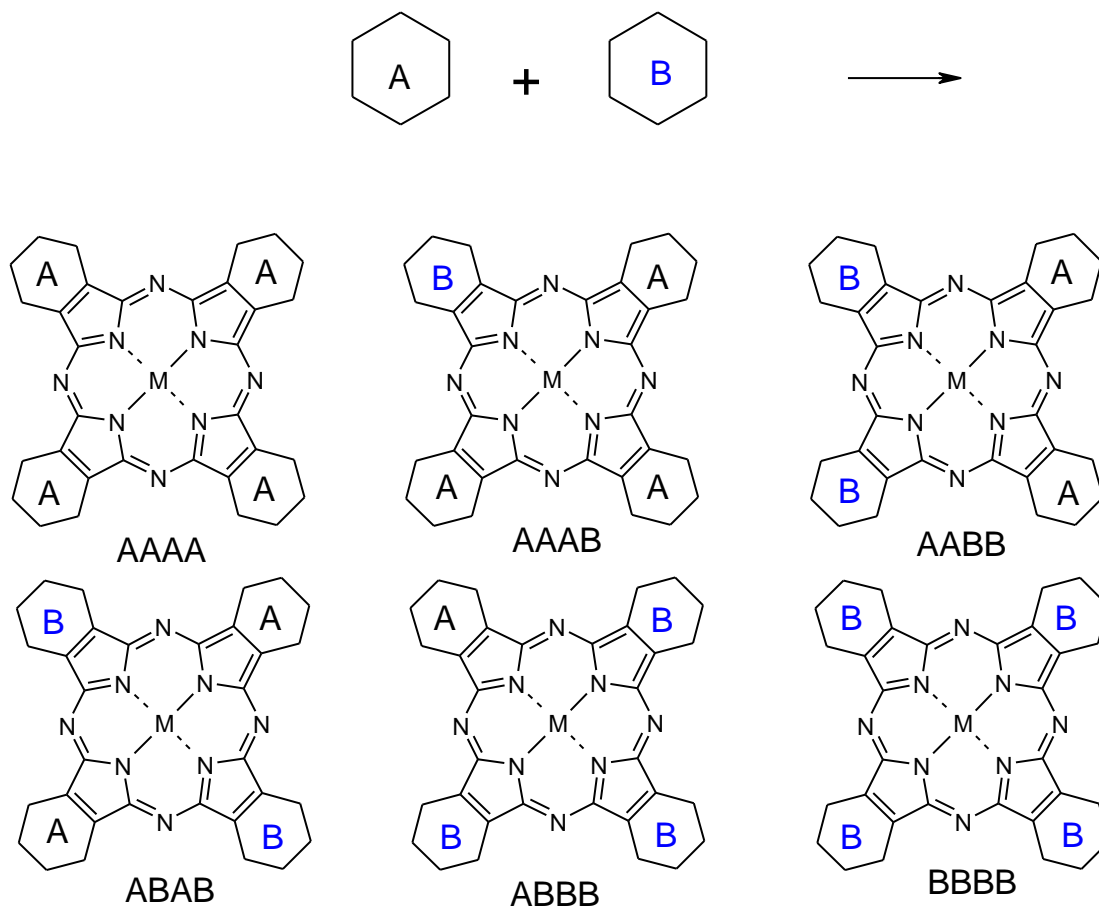
Přímý přístup – spočívá v racionální konstrukci molekuly prekurzoru, kdy jsou dvě jeho molekuly spojeny pomocí můstku tzv. „spacer“ (viz obr. 18)



obr. 18: Dimér složený ze dvou molekul ftalonitrilu

4.1.2 Dva různé prekurzory

Základní reakcí je tzv. statistická kondenzace (statistical condensation), což je neselektivní metoda, která poskytuje směs šesti produktů různě nakombinovaných prekurzorů **A** a **B**: (AAAA, AAAB, AABB, ABAB, ABBB, BBBB)⁴⁶. Vzniklá směs se dělí pomocí chromatografických metod. To bývá často problém, protože se jedná o molekuly s planárním uspořádáním, které mají tendenci k tvorbě dimérů a vyšších agregátů. Tomu se předchází zavedením objemných substituentů na periferii (*tert*-butylové skupiny, dendritické substituenty).



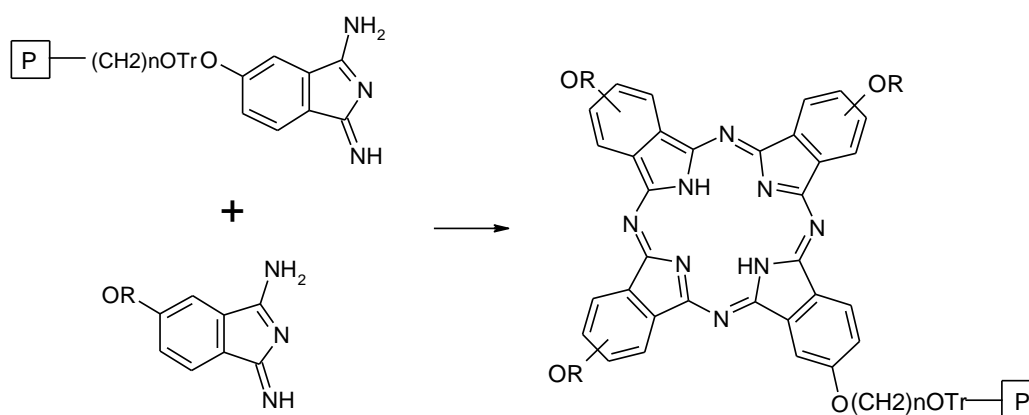
Obr. 19: 6 různých kongenerů

I když je to metoda neselektivní, lze použitím vhodného poměru množství výchozích prekurzorů výrazně posunout reakci ve prospěch požadovaného produktu např: při poměru produktů 3:1 (A:B), reakce probíhá ve prospěch A_3B , který obvykle tvoří 44 % celkového výtěžku, při poměru 9:1 sice dochází ke snížení zisku A_3B (vzniká větší množství A_4), ale už téměř nevznikají jiné produkty a lze jej snadněji separovat.

Kromě využití vhodného poměru produktů, je třeba zmínit další metody, které nám umožňují dominantní syntézu požadované látky ve směsi.

❖ Metoda s využitím pevné fáze (Polymeric Support Method)

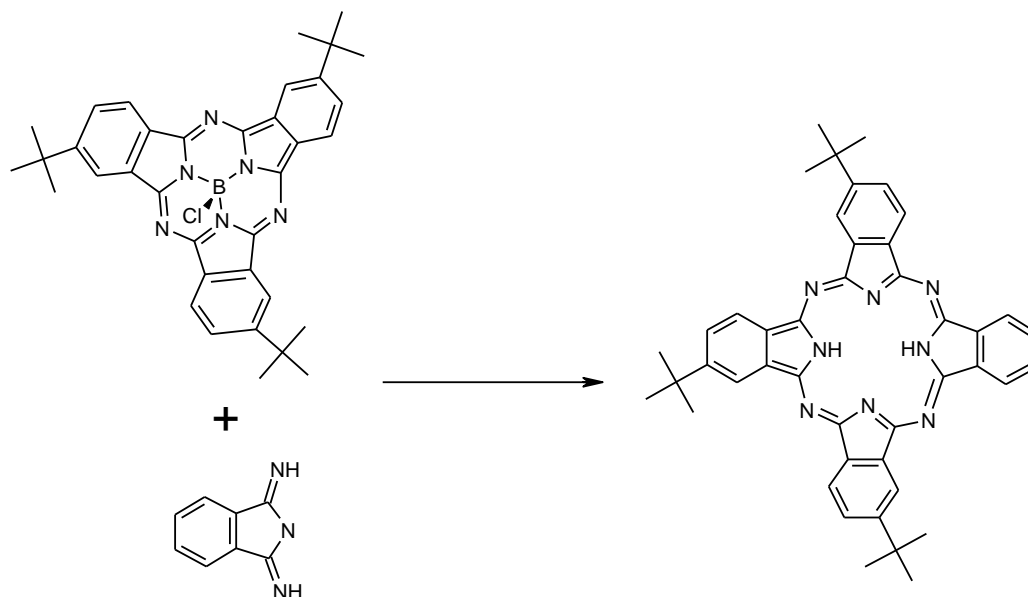
Metoda byla objevena Leznoffem⁴⁷. Princip spočívá v navázání vhodně substituovaného prekurzoru B na polymerní pevnou fázi. K tomuto pevně vázanému prekurzoru je přidán volný prekurzor A, tím získáme A₃B ftalocyanin navázaný na pevnou fázi. Ten je následně z polymeru odštěpen. Podmínkou pro úspěch reakce je vhodná funkční skupina k navázání na pevnou fázi a snadné odštěpení z pevné fáze.



Obr. 20: Syntéza Pc s využitím pevné fáze

❖ Subftalocyaninová metoda (The Subphthalocyanine Approach)

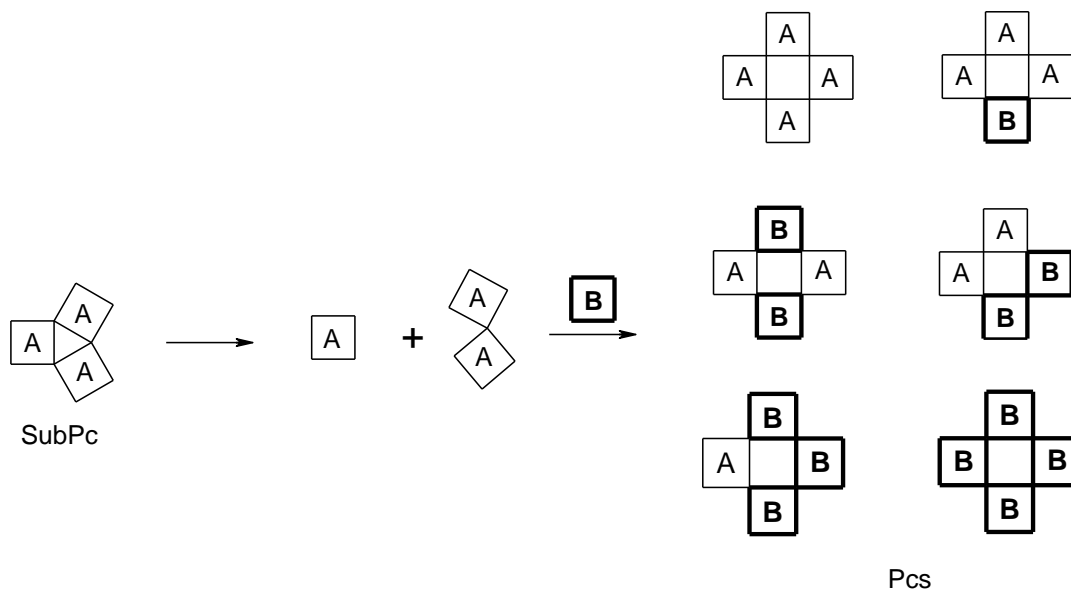
Je další metoda přípravy A₃B, objevenou Kobayashim a kol.⁴⁸. Je založena na rozšíření kruhu subftalocyaninu (SubPc) jeho reakcí se sukcinimidem nebo derivátem diiminoisoindolinu (viz obr. 21). Tato reakce je vysoce selektivní a umožnila přípravu Pcs, které byly dříve nedosažitelné⁴⁹.



Obr. 21: Expanze SubPc kruhu

Výsledek celé reakce závisí především na reakčních podmínkách a na charakteru výchozích prekurzorů. Tento mechanismus důkladně prozkoumali T. Torres a kol.⁵⁰ a zjistili, že reakce probíhá nejlépe reaguje-li derivát diiminoisoindolinu v 6 - 9-ti násobném nadbytku oproti roztoku SubPc ve směsi DMSO/1-chlornaftalen nebo dichlorbenzenu (1:4 až 4:1) nebo (dimethylamino)etanolu za stálého míchání při 80-100 °C po dobu 5-12 h. Výtěžek se pak pohybuje mezi 3 - 90%.

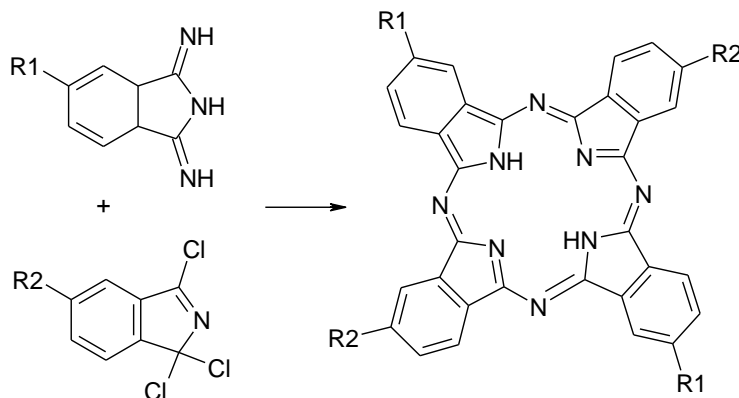
Přestože se jedná o selektivní metodu, můžou zde vzniknout vedlejší produkty, díky částečné nebo úplné fragmentaci subftalocyaninového kruhu. Statická kondenzace těchto fragmentů poskytuje 6 možných derivátů Pc (viz obr. 22).



Obr. 22: Fragmentace SubPc kruhu

❖ Cross condensation

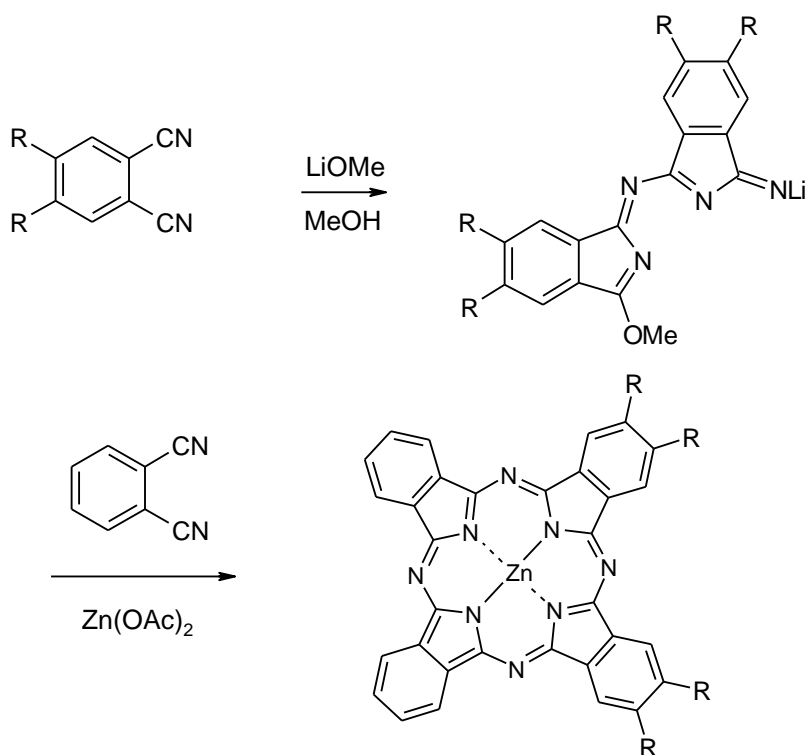
Toto je cílená metoda k získání produktu typu ABAB. Při reakci se používá ekvivalentní množství prekurzorů 1,3-diiminoisoindolinu a 1,1,3-trichlorisoindolu, reakce probíhá za mírných podmínek v přítomnosti báze a redukčního činidla (viz obr. 23).



Obr. 23: cross condensation

❖ 'Half-Pc' intermediate method

Tato metoda byla popsána Leznoffem a kol. pro přípravu produktů typu AABB⁵¹. Využívá se meziprojektu tzv. polovičního ftalocyninu (z angl. „half-Pc“), který je následně podroben reakci s odlišně substituovaným ftalonitrilem za velmi mírných podmínek. Aby byl meziprodukt stabilní, musí být ftalonitril substituován pouze silně elektronegativní skupinou. Leznoff použil 4,5-bis(3,3-dimethyl-1-butynyl)ftalonitril v reakci s methanolátem lithným v prostředí methanolu.



Obr. 24: Použití half-Pc intermediátu

Další varianta jak získat pouze izomer AABB je metoda, kdy použijeme 2 stejné jednotky spojené "spacerem" (viz. "přímý přístup").

5 Experimentální část

Seznam použitých chemikálií

2-methyl-2-propanthiol, >98 %, Fluka

N,N-dimethylformamid, extra suchý, voda < 50 ppm, Acros Organics

2,3-diaminomaleonitril, 98 %, Aldrich

dioxan, čistý, absolutní, >99 %, Fluka

2,2'-pyridyl, 97 %, Aldrich

octan zinečnatý, bezvodý, Lachema

oxalyl chlorid, >96 %, Fluka

Materiál a přístroje

Merck Kieselgel 60 (0,040–0,063 mm) pro sloupcovou chromatografii

TLC – Kieselgel – Silicagel Merck 60 F₂₅₄

bodotávek Electrothermal IA9200 Series Digital Melting point Apparatus
(Electrothermal Engineering Ltd., Southend-on-Sea, Essex, Great Britain)

IR-Spectrometer Nicolet Impact 400

¹H and ¹³C NMR spektra Varian Mercury-Vx BB 300 (299,95 MHz, 1H; 75,43 MHz, 13C)

MALDI-TOF Voyager-DE STR mass spectrometer (Applied Biosystems, Framingham, MA, USA)

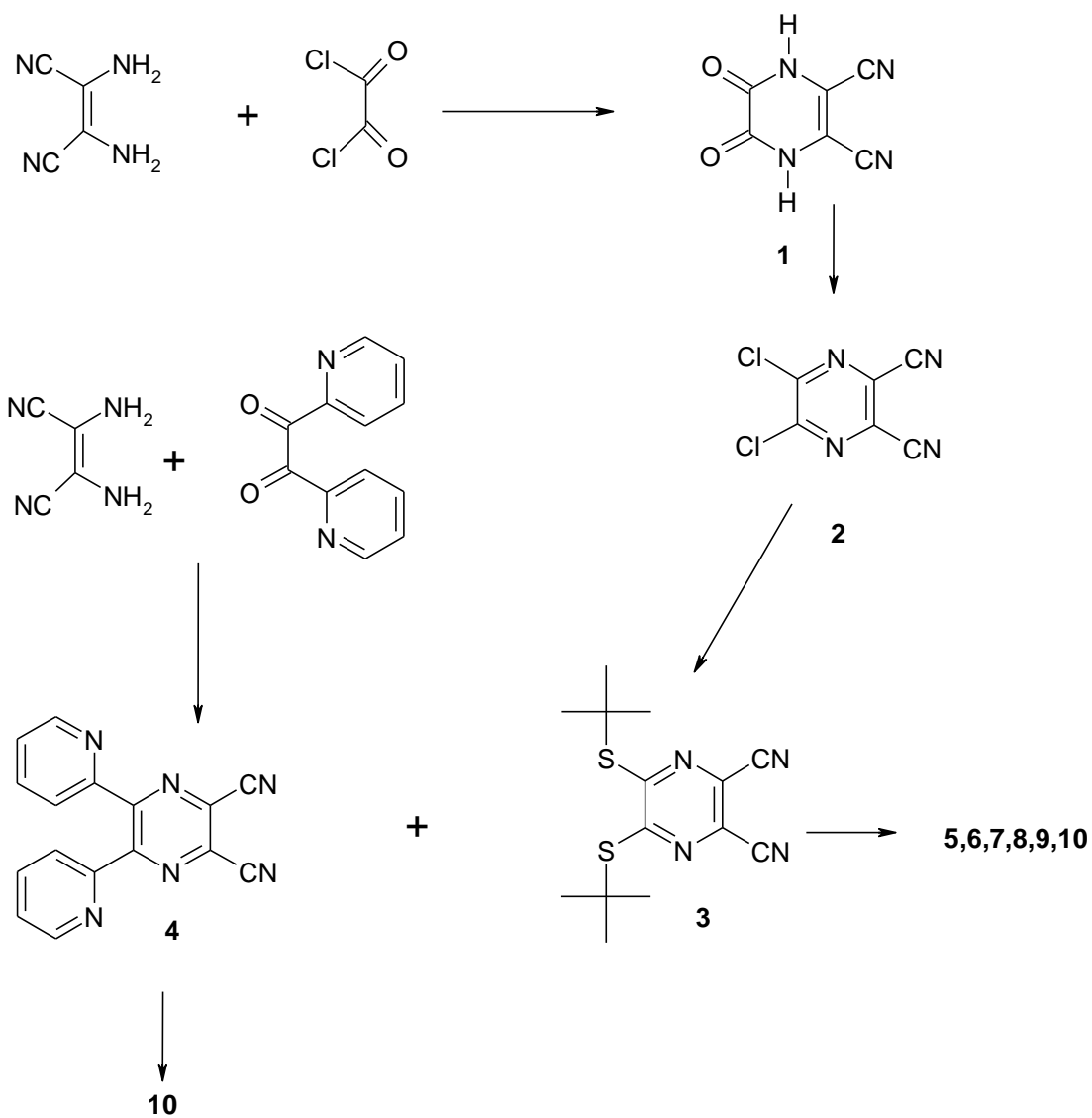
Flash chromatograf FlashMasterPersonal, Argonaut

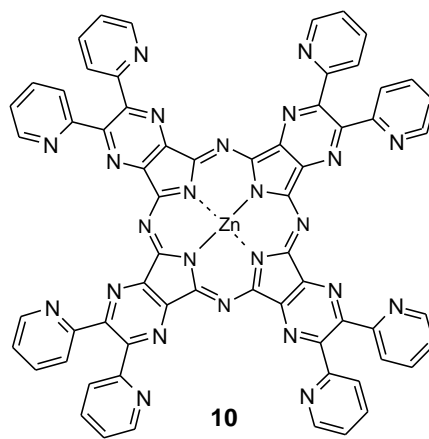
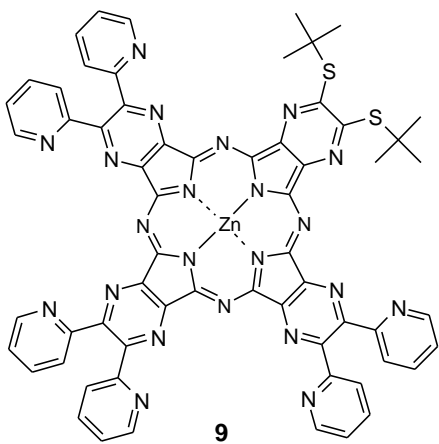
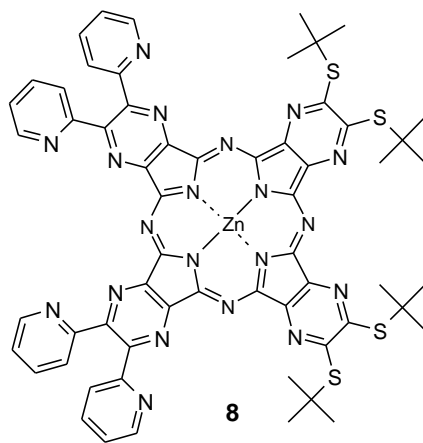
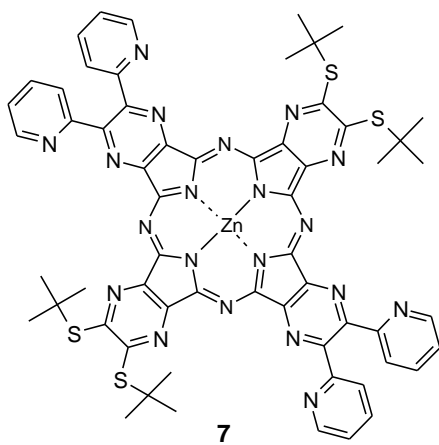
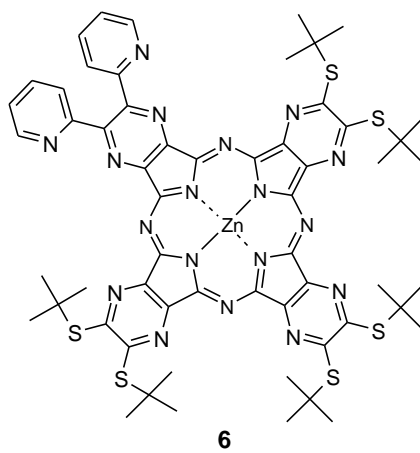
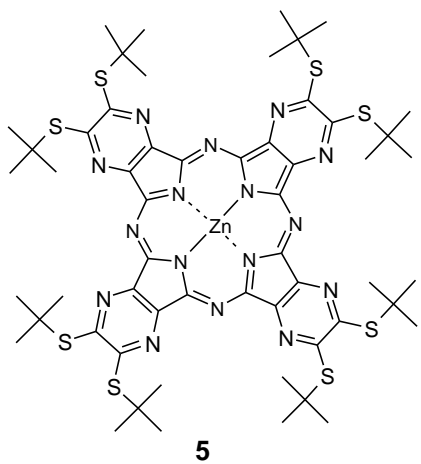
Látky připravené dříve

Látka (**5**) - Kostka et al.⁵².

Látka (**10**) - Eva H. Mørkved z NTNU Trondheim, Norsko⁵³.

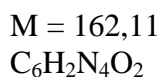
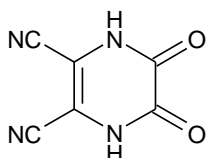
5.1 Schéma prováděných reakcí





5.2 Příprava prekurzorů

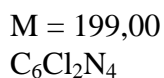
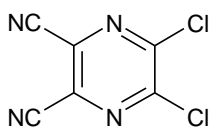
5.2.1 Příprava 5,6-dioxo-1,4,5,6-tetrahydropyrazin-2,3-dikarbonitrilu (1)



Oxalylchlorid (20 ml, 233 mmol) jsem rozpustila v bezvodém dioxanu (200 ml) a velmi pomalu přikapávala suspenzi diaminomaleonitrilu (10 g, 93 mmol) v bezvodém dioxanu (400 ml). Doba přikapávání činila 3 hod, přičemž jsem postupně zvyšovala teplotu až na 50 °C. Po smísení obou reaktantů jsem směs míchala další 3 hodiny při teplotě 50 °C. Po krátkém vychladnutí, jsem obsah baňky zahustila na rotační vakuové odparce a odfiltrovala. Produkt jsem přečistila krystalizací z vody s aktivním uhlím a vysušila. Výtěžek 7,21 g nažloutlých krystalů (tj. 41 % teoretického výtěžku). Látka nebyla dále čištěna a byla použita přímo do další reakce.

T.t. 245-278 °C za rozkladu (lit.⁵⁴ 240-280 °C).

5.2.2 Příprava 5,6-dichlorpyrazin-2,3-dikarbonitrilu (2)



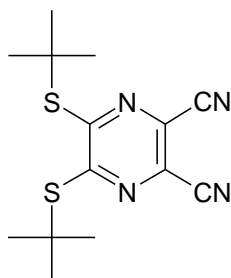
5,6-dioxo-1,4,5,6-tetrahydropyrazin-2,3-dikarbonitril (1) (7,21 g, 57 mmol) jsem pomalu za stálého míchání sypala do směsi bezvodého dioxanu (300 ml) s thionylchloridem (17 ml, 303 mmol). Po dobu jedné hodiny jsem směs zahřívala při

teplotě 60 °C pod zpětným chladičem opatřeným sušicí rourkou. K suspenzi jsem poté přidala dimethylformamid (5 ml) a vzniklou tmavou směs jsem zahřívala dalších 90 minut. Poté jsem odpařila rozpouštědlo na vakuové rotační odparce. Produkt jsem dále dvakrát extrahovala do horkého toluenu (300 ml). Toluenu jsem odpařila, vzniklý produkt překrytalizovala z chloroformu a získané krystaly vysušila. Odpařila jsem rozpouštědlo matečného louhu a směs (krystaly i zbytky z matečného louhu zvláště) rozdělila pomocí flash chromatografie se směsí toluenu a chloroformu (1:1) jako mobilní fází. Frakce s čistým produktem jsem odpařila na vakuové rotační odparce. Získala jsem 4,2 g drobných nažloutlých krystalů (tj. 47 % teoretického výtěžku).

T.t. 180,2 °C (lit.⁵⁴ 179-180).

¹³C NMR (CD₃COCD₃) δ (ppm) 113,1; 131,2; 152,2.

5.2.3 Příprava 5,6-bis(*tert*-butylsulfanyl)pyrazin-2,3-dikarbonitrilu (3)



M=306,45
C₁₄H₁₈N₄S₂

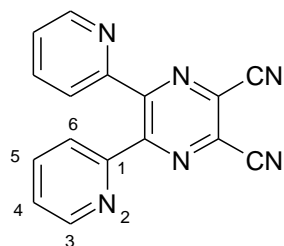
K 34,5 ml vodného roztoku hydroxidu sodného (1 mol/l) jsem za stálého míchání přilévala 4,0 ml 2,2-dimethyl-propan-1-thiolu (35,5 mmol) a půl hodiny nechala reagovat při pokojové teplotě. Poté jsem k tomuto roztoku pomalu přidala roztok 5,6-dichlorpyrazin-2,3-dikarbonitrilu (**2**) (3,0 g, 10 mmol) v tetrahydrofuranu (80 ml). Reakční směs jsem nechala míchat dalších 30 minut. Pomocí dělicí baňky jsem oddělila vodnou a organickou fázi. Z organické fáze jsem za sníženého tlaku odpařila rozpouštědlo a získané krystaly jsem přečistila na flash chromatografu za použití toluenu jako mobilní fáze. Z produktu jsem za sníženého tlaku odpařila rozpouštědlo. Výtěžek 4,23 g žlutých krystalů (tj. 91 % teoretického výtěžku).

T. t.: 161-162 °C (lit.⁵²161-162 °C)

¹³C NMR (CDCl₃) δ (ppm) 29,6; 52,3; 113,8; 125,0; 161,0

¹H NMR (CDCl₃) δ (ppm) 1,64 (s, 9H, CH₃)

5.2.4 Příprava 5,6-dipyridin-2-yl-pyrazin-2,3-dikarbonitrilu (4)



M=248,28

C₁₆H₈N₆

2,2'-pyridil (2,12 g, 10 mmol) a diaminomaleonitril (1,08 g, 10 mmol) jsem rozpustila v acetonitrilu (40 ml) a nechala vařit při teplotě 100 °C pod zpětným chladičem po dobu 3 hodin. Průběh reakce jsem sledovala pomocí tenkovrstvé chromatografie s mobilní fází chloroform/aceton 15:1. Roztok jsem přefiltrovala, sraženinu promyla acetonitrilem a za sníženého tlaku jsem odpařila rozpouštědlo. Produkt jsem přečistila pomocí sloupcové chromatografie za použití chloroformu/acetonu 15:1. Získala jsem 1,74 g bílých krystalků (tj. 60 % teoretického výtěžku).

T. t.: 174,5-175,5 °C (lit.⁵⁵ 174-176)

¹³C NMR (CDCl₃) δ (ppm) 112,9; 124,6; 124,7; 130,1; 137,1; 148,8; 153,8; 154,8.

¹H NMR (CDCl₃) δ (ppm) 7,31 (ddd; 2H; $J_1=7$ Hz; $J_2=5$ Hz; $J_3=1$ Hz; pyridyl H-5); 7,89 (td; 2H; $J_1=8$ Hz; $J_2=2$ Hz; pyridyl H-4); 8,05 (d; 2H; $J=8$ Hz; pyridyl H-3); 8,31 (d; 2H; $J=5$ Hz; pyridyl H-6).

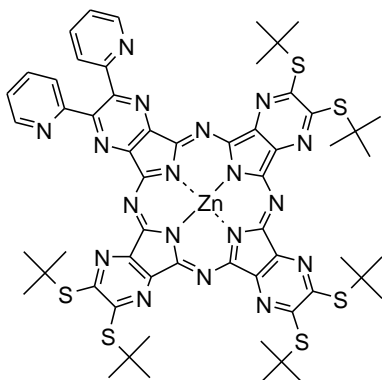
5.3 Syntéza asymetrických AzaPc – obecný postup

Směs 0,613 g (2 mmol) (3) a 0,569 g (2 mmol) (4) a 2,5 g (14 mmol) bezvodého octanu zinečnatého jsem rozpustila v bezvodém DMF (20 ml) a vložila do olejové lázně předem vyhřáté na 160°C. Za stálého míchání při konstantní teplotě, už bylo po 10 minutách možno pozorovat zezelenání roztoku. Reakci jsem nechala probíhat za stejných podmínek ještě dvě hodiny.

Poté jsem roztok vlila do směsi methanolu a vody (1:1), roztok zfiltrovala, sraženinu produktu důkladně promyla destilovanou vodou a methanolem a vysušila.

Směs šesti AzaPc jsem dělila pomocí sloupcové chromatografie za použití mobilní fáze CHF/pyridin/THF 10:0,15:0,6. Jako první se vymýval AzaPc (5), následně jsem změnila mobilní fázi na CHF/pyridin 16:1 a získala jsem AzaPc (6). Po výměně mobilní fáze na CHF/pyridin 6:1 se eluovala společně směs izomeru (7) a (8) a následně AzaPc (9). AzaPc (10) jsem ze směsi neizolovala, byl identifikován pouze pomocí tenkovrstevné chromatografie.

5.3.1 [2,3,9,10,16,17-Hexakis(*tert*-butylsulfanyl)-23,24-bis(pyridin-2-yl)-1,4,8,11,15,18,22,25-(oktaaza)ftalocyaninato] zinečnatý komplex (6)



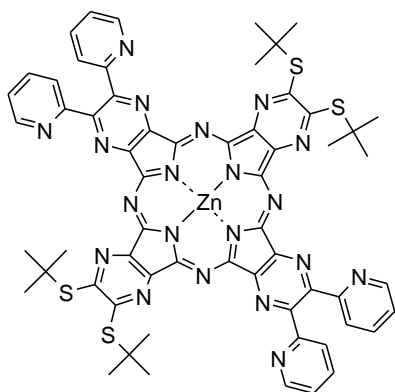
M = 1271,03
C₅₈H₆₄N₁₈S₆Zn

Tato frakce byla izolována pouze v minimálním množství. Část čistého produktu byla následně vyizolována z TLC. Jako soustava byla použita mobilní fáze toulén/pyridin v poměru 7:1, retenční faktor (R_f) byl 0,23. Z desky byla látka extrahována do pyridínu. Totožnost byla potvrzena pomocí hmotnostního spektrometru.

MALDI-TOF m/z 1267 [M+H]⁺; 1211 [M-56+H]⁺.

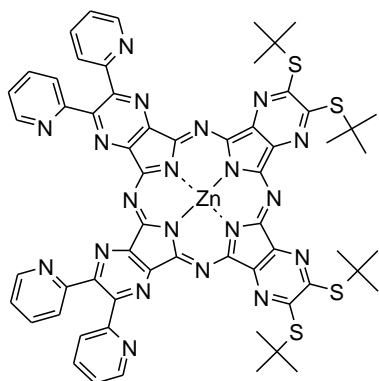
UV-vis (pyridin) λ (nm) 657; 596; 385.

5.3.2 2,3,16,17-Tetrakis(*tert*-butylsulfanyl)-9,10,23,24-terakis(pyridin-2-yl)-1,4,8,11,15,18,22,25-(oktaaza)ftalocyaninato] zinečnatý komplex (7)



M = 1248,86
C₆₀H₅₄N₂₀S₄Zn

2,3,9,10-Tetrakis(*tert*-butylsulfanyl)-16,17,23,24-terakis(pyridin-2-yl)-1,4,8,11,15,18,22,25-(oktaaza) ftalocyaninato] zinečnatý komplex (8)



M = 1248,86
C₆₀H₅₄N₂₀S₄Zn

Obě sloučeniny byly izolovány ze směsi společně. Pro sloupcovou chromatografii byla použita mobilní fáze CHF/pyridin 10:1, poté následovala další sloupcová chromatografie izolované frakce s mobilní fází CHF/pyridin 6:1. Získaný AzaPc jsem přefiltrovala a odpařila rozpouštědlo. Dále jsem produkt promyla methanolem, a zfiltrovala. Sraženinu jsem rozpustila v pyridinu, zfiltrovala a odpařila rozpouštědlo. Výtěžek byl 5 mg (0,4 %).

MALDI-TOF m/z 1245 $[M+H]^+$; 1189 $[M-56+H]^+$.

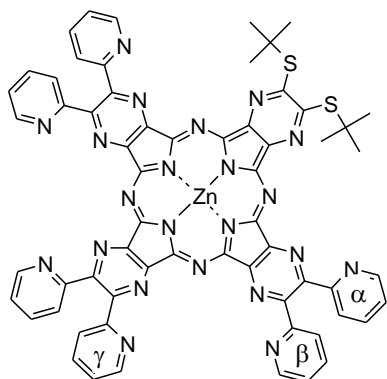
UV-vis (pyridin) λ (nm) 658; 596; 383

IR (KBr) ν (cm^{-1}) 3065; 2965; 2922; 2864; 1508; 1361; 1252; 1142; 1106; 1049; 980; 961.

^{13}C NMR ($\text{C}_6\text{D}_5\text{N}$) δ (ppm) 30,72; 30,79; 51,24; 51,34; aromatické signály nedetekovatelné.

^1H NMR ($\text{C}_6\text{D}_5\text{N}$) δ (ppm) 8,94 (d; 2H; $J=7$ Hz; pyridyl H-3); 8,67-8,62 (m; 2H; pyridyl H-3); 8,58 (d; 4H; $J=5$ Hz; pyridyl H-6); 8,15 (td; 4H; $J_1=8$ Hz; $J_2=1$ Hz; pyridyl H-4); 7,38 (dd; 2H; $J_1=7$ Hz; $J_2=5$ Hz; pyridyl H-5); 7,30-7,21 (m; 2H; pyridyl H-5); 2,27 (s; 18H; CH_3); 2,03 (s; 18H; CH_3).

5.3.3 2,3-Bis(*tert*-butylsulfanyl)-9,10,16,17,23,24-hexakis(pyridin-2-yl)-1,4,8,11,15,18,22,25-(oktaaza)ftalocyaninato] zinečnatý komplex (9)



M = 1226,69
C₆₂H₄₄N₂₂S₂Zn

Tento AzaPc jsem přečistila po izolaci ze směsi (viz obecný postup) pomocí sloupcové chromatografie za použití mobilní fáze CHF/pyridin 6:1. Získaný AzaPc jsem přefiltrovala a odpařila rozpouštědlo. Poté promyla methanolem stejně jako u předchozí látky. Sraženinu jsem rozpustila v chloroformu, zfiltrovala a odpařila rozpouštědlo. Výtěžek byl 8 mg (0,65 %).

MALDI-TOF m/z 1223 [M+H]⁺; 1167 [M-56+H]⁺.

UV-vis (pyridin) λ (nm) 657; 595; 378

¹³C NMR (C₆D₅N) δ (ppm) 30,72; 51,19; 125,30; 125,46; 125,58; 136,70; 136,76; 137,17; 145,75; 148,89; 149,11; 151,70; 151,72; 151,99; 152,79; 153,63; 154,52; 154,58; 154,62; 158,53; 159,20; 159,58.

¹H NMR (C₆D₅N) δ (ppm) 8,97 (d; 2H; J=8 Hz; pyridyl H-3 γ); 8,68-8,62 (m; 4H; pyridyl H-3 α,β); 8,59 (d; 2H; J=4 Hz; pyridyl H-6 γ); 8,35-8,21 (m; 4H; pyridyl H-6 α,β); 8,16 (td; 2H; J₁=8 Hz; J₂=1 Hz; pyridyl H-4 α); 7,73-7,61 (m; 4H; pyridyl H-4 α,β); 7,40 (ddd; 2H; J₁=8 Hz; J₂=5 Hz; J₃=1 Hz; pyridyl H-5 γ); 7,33-7,23 (m; 4H; pyridyl H-5 α,β); 2,08 (s; 18H; CH₃).

6 Diskuze

Jako výchozí látky pro syntézu prekurzorů jsem použila diaminomaleonitril a oxalylechlorid. Jejich reakcí jsem připravila 5,6-dioxo-1,4,5,6-tetrahydropyrazin-2,3-dikarbonitril, který se podařil připravit v poměrně dobrém výtežku (41 %). Tuto látku jsem nechala reagovat s thionylchloridem za vzniku 5,6-dichlorpyrazin-2,3-dikarbonitrilu (**1**). Reakce proběhla bez problémů, opět s dobrým výtěžkem. Příprava této látky už byla podrobně popsána v jiných pracích⁵⁴.

5,6-dichlorpyrazin-2,3-dikarbonitril jsem podrobila reakci se směsí 2-methylpropanthiolu a hydroxidu sodného za vzniku 5,6-bis(*terc*-butylsulfanyl)pyrazin-2,3-dikarbonitrilu (**3**) jako prvního prekurzoru. Druhý prekurzor 5,6-di(pyridin-2-yl)pyrazin-2,3-dikarbonitril (**4**) jsem připravila reakcí pyridilu a diaminomaleonitrilu dle literatury⁵⁵ s modifikací čištění pomocí sloupcové chromatografie. Při přípravě tohoto prekurzoru nenastaly také žádné větší potíže.

Statistickou cyklizací prekurzorů (**3**) a (**4**) vznikla směs šesti různých AzaPc. Cyklizaci jsem zkoušela ve dvou různých prostředích – DMAE a DMF. Cyklizace proběhla v obou případech úspěšně, avšak při použití DMAE bylo ve směsi dost nežádoucích nečistot, pravděpodobně způsobené nukleofilní substitucí *terc*-butylsulfanylových substituentů za dimethylaminoethoxy substituenty. Proto se jako vhodnější prostředí pro reakci ukázal DMF. Na to jak cyklizace proběhla hladce, následoval problém s rozpustností směsi. Směs se ukázala jako nerozpustná v běžných rozpouštědlech, pouze těžce rozpustná v CHF. Po přidání THF se rozpustnost mírně zvýšila. Nerozpustnosti směsi v methanolu bylo později využito k předběžnému přečištění produktů.

Jednotlivé látky (**5**) – (**9**) jsem získala dělením směsi pomocí sloupcové chromatografie. Jako první v čele se pohyboval produkt (**5**), který jsem dále nečistila, pouze byla potvrzena jeho totožnost porovnáním s příslušným standardem připraveným v laboratoři na TLC, stejně jako produkt (**10**), který byl získán dříve od dr. Mørkved z Trondheimu. Produkty (**6**)-(9) byly postupně izolovány, ovšem pouze s minimálním výtěžkem, příčinou mohl být nejspíš záchyt AzaPc na koloně v důsledku agregace kvůli nahrazení objemných substituentů (*terc*-butyl) na periférii pyridyly. Látka (**6**) byla vyizolována po sloupcové chromatografii ve velice malém

množství neumožňujícím další purifikaci pomocí sloupcové chromatografie. Proto byla tato látka vyčištěna v minimálním množství pomocí TLC a charakterizována pouze hmotnostní spektrometrií a UV-vis spektry. Látky **(7)** a **(8)** vykazovali naprosto shodné R_f hodnoty a ani na TLC nebyl poznat nějaký náznak separace. To že se jedná o směs obou izomerů bylo možné poznat z komplikovaného ¹H NMR spektra.

Problém nastal opět s rozpustností AzaPc se dvěma substitovanými pyridyly **(7)**, **(8)**, zkoušela jsem ho rozpustit v různých rozpouštědlech (CHF, aceton, THF), ale nakonec se ukázalo, že produkt je rozpustný pouze v pyridinu. Překvapivě lepší rozpustnost v chloformu vykazoval produkt **(9)**.

Izolované látky byly dále použity na katedře k dalším testům – měření produkce singletového kyslíku a fluorescence.

7 Závěr

V rámci mé diplomové práce byly připraveny tyto prekurzory AzaPc:

- 5,6-bis(*terc*-butylsulfanyl)pyrazin-2,3-dikarbonitril (3)
- 5,6-dipyridin-2-yl-pyrazin-2,3-dikarbonitril (4)

Cyklizací těchto prekurzorů jsem připravila tyto AzaPc se Zn jako centrálním kovem:

V minimálním množství:

- [2,3,9,10,16,17-Hexakis(*terc*-butylsulfanyl)-23,24-bis(pyridin-2-yl)-1,4,8,11,15,18,22,25-(oktaaza)ftalocyaninato] zinečnatý komplex (6)
- 2,3-Bis(*terc*-butylsulfanyl)-9,10,16,17,23,24-hexakis(pyridin-2-yl)-1,4,8,11,15,18,22,25-(oktaaza)ftalocyaninato] zinečnatý komplex (9)

směs:

- 2,3,16,17-Tetrakis(*terc*-butylsulfanyl)-9,10,23,24-terakis(pyridin-2-yl)-1,4,8,11,15,18,22,25-(oktaaza)ftalocyaninato] zinečnatý komplex (7) a

2,3,9,10-Tetrakis(*terc*-butylsulfanyl)-16,17,23,24-terakis(pyridin-2-yl)-1,4,8,11,15,18,22,25-(oktaaza)ftalocyaninato] zinečnatý komplex (8)

8 Použitá literatura

- ¹ Castano A. P., Demidova T. N., Hamblin M. R. (2004). *Photodiagn. Photodyn. Therapy*. **1**, 279-293.
- ² Brown S. B., Brown E. A., Walker I. (2004). *Lancet Oncol.* **5**, 497-508.
- ³ Lang K., Mosinger J. Wágnerová M. (2006). *Chem. Listy* **100**, 169-177.
- ⁴ Zimčík P., Miletín M. (2004). *Čes. Slov. Farm.* **53**, 219-224.
- ⁵ National Cancer Institute [online] (2008). Dostupné z: www.cancer.gov
- ⁶ Chen B., Pogue B. W., Hoopes P. J., Hasan T. (2006). *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* **16**, 279-305.
- ⁷ Zimčík, P., Miletín, M. (2004). *Čes. Slov. Farm.* **53**, 271-279.
- ⁸ Allison R. R., Downie G. H., Cuenca R., Hu Xin-Hua, Childs JH. C., Sabata C. H. (2004). *Photodiagn. Photodyn. Therapy* **1**, 27-42.
- ⁹ Bonnet R., Martínez G. (2001). *Tetrahedron* **57**, 9513-9547.
- ¹⁰ Boyle D. G., Potter W. R. (1987). *J. Photochem. Photobiol. B, Biol.* **46**, 997-1001.
- ¹¹ Marcus S. L., McIntyre W. R. (2002). *Expert Opin Emerg Drugs* **7**, 321-334.
- ¹² Sharman W. M., Allen C. M., van Lier J. E. (1999). *Drug Discov. Today* **4**, 507-517.
- ¹³ Levy J. G. (1994). *Semin. Oncol.*, 4-10.
- ¹⁴ Corti L., Toniolo L., Boso C., Colaut F., Fiore D., Muzzio P-C., Koukourakis M.I., Mozzaratto R., Pignataro M., Loreggian L., Sotti G. (2007). *Lasers Surg Med.* **39**, 394-402.
- ¹⁵ Guyer R., Lecturer S. (2002). *Aust Prescr* **25**, 116-119.
- ¹⁶ O'Riordan K., Sharlin D. S., Gross J., Chang S., Errabelli D., Akilov O. E., Kosaka S., Nau G. J., Hasan T. (2006). *Antimicrob Agents Chemother.* **50**, 1828-1864.
- ¹⁷ ClinicalTrials gov [online] (2008) [cit. 2008-02-14]. Dostupné z: <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00359164?term=Verteporfin&rank=7>
- ¹⁸ ClinicalTrials gov [online] (2008) [cit. 2008-02-16]. Dostupné z: <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00242580?term=verteporfin&rank=2>
- ¹⁹ Chen J. Y., Mak N. K., Yow C. M. N., Fung M.C. (2000). *Photochem. Photobiol* **10**, 89.
- ²⁰ Glanzmann T., Forrer M., Blant S. A., Woodtli A., Grosjean P., Braichotte D., van den Bergh H., Monnier P., Wagnères G. (2000). *J. Photochem. Photobiol. B, Biol.* **57**, 22-32.
- ²¹ European medicines agency [online] (2008) [cit. 2008-02-16]. Dostupné z: <http://www.emea.europa.eu/humandocs/PDFs/EPAR/foscan/273801cs1.pdf>

-
- ²² Lovat L. B., Jamieson N. F., Novelli M. R., Mosse C. A., Selvasekar C., Mackenzie G. D., Thorpe S. M., Bown S. G. (2005). *Gastrointest. Endosc.* **62**, 617-623.
- ²³ Hunt D. W. (2002). *IDrugs* **5**, 180-186.
- ²⁴ ClinicalTrials.gov [online] (2008) [cit. 2008-02-24]. <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00157976>
- ²⁵ Selman S. H., Albrecht D., Keck R. W., Brennan P., Kondo S. (2001). *J. Urol.* **165**, 1795-1801.
- ²⁶ Light Sciences Corporation [online] (2008) [cit. 2008-02-25]. Dostupné z: <http://www.lightsciences.com/>
- ²⁷ ClinicalTrials.gov [online] (2008) [cit. 2008-02-24]. Dostupné z: <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00102115?term=talaporfin&rank=3>
- ²⁸ Megerian C. A., Zaidi S. I., Sprecher R. C., Setrakian S., Stepnick D. W., Oleinick N.L., Mukhtar A. (1993). *Laryngoscope* **105**, 967-975.
- ²⁹ Young S. W., Woodburn K. W., Wright M., Mody T. D., Fan Q., Sessler J. Q., Don W. C., Miller R. A. (1996). *Photochem. Photobiol* **63**, 892-897.
- ³⁰ Pharmacyclics, Inc. [online] (2008) [cit. 2008-02-26]. Dostupné z: <http://www.pharmacyclics.com>.
- ³¹ Chou T. M., Woodburn K. W., Cheong W. F., Lacy S. A., Sudhur K., Adekman D. C., Wahr D. (2002). *Catheter Cardiovasc Interv* **57**, 387-94.
- ³² Furukawa K., Yamamoto H., Crean D. H., Kato H., Mang T. S. (1996). *Lasers Surg Med.* **18**, 157-166.
- ³³ Faculty of Biological sciences [online] (2008) [cit. 2008-02-28]. Dostupné z: <http://www.bmb.leeds.ac.uk/pdt/individualPs.htm>
- ³⁴ Avetisov S. E., Budzinskaia M. V., Likhvantesava V. G., Gurova I. V., Loschenov V. B., Schevcik S. A., Kuz'min S. V., Vorozhtsov G. N. (2005). *Vestn Oftalmol.* **121**, 6-9.
- ³⁵ ClinicalTrials.gov [online] (2008) [cit. 2008-02-29]. Dostupné z: <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00103246?term=phthalocyanines&rank=1>
- ³⁶ DUSA Pharmaceuticals, Inc. [online] (2008) [cit. 2008-03-1]. Dostupné z: <http://www.dusapharma.com/levulan-photodynamic-therapy.html>
- ³⁷ Lehmann P. (2007). *Br. J. Dermatol.* **156**, 793-801
- ³⁸ PhotoCure ASA [online] (2006) [cit. 2006-08-06]. Dostupné z: <http://www.photocure.com>
- ³⁹ Udomsakdi C., Eaves C. J., Sutherland H. J., Lansdorp P. M. (1991). *Exp. Hematol.* **19**, 338-342.
- ⁴⁰ Pal P., Zeng H., Durocher G., Girard D., Li T., Gupta A. K., Giasson R., Blanchard L., Gaboury L., Balassy A. (1996). *Photochem. Photobiol.* **63**, 161-168.
- ⁴¹ Brasseur N., Menard I., Forget A., el Jastimi R., Hamel R., Molfino N. A., van Lier J. E. (2000) *Photochem. Photobiol.* **72**, 780-787.

-
- ⁴² Fickweiler S., Abels C., Karrer S., Baumler W., Landthaler M., Hofstadter F., Szeimies R.M. (1999) *J. Photochem. Photobiol. B, Biol* **48**, 27-35.
- ⁴³ Xiao Z., Brown K., Tulip J., Moore R. B. (2003). *J. Urol.* **169**, 352-356.
- ⁴⁴ Wang Z., Lecane P. S., Thiemann P., Fan Q., Cortez C., Ma X., Tonev D., Miles D., Naumovski L., Miller R. A., Magda D., Cho D. G., Sessler J. L., Pike B. L., Yeligar S.M., Karaman M.W., Hacia J.G. (2007). *Mol. Cancer*, **6**:9.
- ⁴⁵ Rager C., Schmid G., Hanack M. (1999). *Chem. Eur J.* **5**, 280-288.
- ⁴⁶ Maizlish V. E., Kulinich V. P., Shaposhnikov G. P. (2004) *Russ. J. Gen. Chem.* **74**, 1801-1817.
- ⁴⁷ Leznoff C. C., Hall T. W. (1982) *Tetrahedron Lett.* **23**, 3023-3026.
- ⁴⁸ Kobayashi N., Kondo R., Nakajima S.-I., Osa T. (1990) *J. Am. Chem. Soc.* **112**, 9640-9641.
- ⁴⁹ Torre G. de la, Claessens Ch. G., Torres T. (2000) *Eur. J. Org. Chem.* **16**, 2821-2831.
- ⁵⁰ Kobayash N., Kondo R., Nakajima S.-I., Osa T. (1990) *J. Am. Chem. Soc.* **112**, 9640-9641.
- ⁵¹ Nolan K. J. M., Hu M., Leznoff C. C. (1997). *Synlett*, 593 – 594.
- ⁵² Kostka M., Zimčik P., Miletín M., Klemra P., Kopecký K., Musil Z. (2006). *J. Photochem. Photobiol. A* **178**, 16-25.
- ⁵³ Mørkved E. H., Afseth N. K., Zimčik P. (2007). *J. Porphyrins Phthalocyanines* **11**, 130-138.
- ⁵⁴ Mørkved E. H., Holmaas L. T., Kjösen H., Hvistendahl G. (1996). *Acta Chemica Scandinavica* **50**, 1153-1156.
- ⁵⁵ Mørkved E. H., Ossletten H., Kjösen H. (2000). *J. Prakt. Chem.* **342**, 83-86.