

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



DIPLOMOVÁ PRÁCE

Syntéza nesymetrických derivátů azaftalocyaninů V.



Hradec Králové, 2008

Marcela Nejedlá

Poděkování

Děkuji PharmDr. Petru Zimčikov Ph.D., mému trpělivému školiteli.

Prohlášení

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

Dne:

Podpis:

Abstrakt

Název práce: Syntéza nesymetrických derivátů azaftalocyaninů V.

Autor: Marcela Nejedlá

Cílem mé diplomové práce byla syntéza nesymetrických derivátů azaftalocyaninů (Aza-Pc), které nesou periferní substituenty karboxylovou či hydroxylovou skupinu. Úkolem byla příprava vhodných prekurzorů pro syntézu AzaPc, a dále statistickou kondenzací připravit ze dvou odlišných prekurzorů požadovaný zinečnatý a hořečnatý komplex, vyizolovat, vyčistit a charakterizovat jej. V rámci práce se podařilo připravit prekurzor kyselinu 6-(3-*terc*-butylsulfanyl-5,6-dikyanpyrazin-2-ylamino)hexanovou. Cyklizací prekurzorů připravit Aza-Pc: 3-karboxy[2',3'-b]chinoxalino-11,12,18,19,25,26-hexakis(*terc*-butylsulfanyl)tripyrazino[g,l,q]porfyrázinato zinečnatý komplex; 3-karboxy[2',3'-b]chinoxalino-11,12,18,19,25,26-hexakis(*terc*-butylsulfanyl)tripyrazino[g,l,q]porfyrázinato hořečnatý komplex. Modifikace postupu přípravy výchozí látky 5,6-dioxo-1,4,5,6-tetrahydropyrazin-2,3-dikarbonitrilu snížením reakční teploty se neosvědčila.

Abstract

Title of diploma thesis: Synthesis of unsymmetrical derivatives of azaphthalocyanines V.

Author: Marcela Nejedlá

The aim of diploma thesis was synthesis of unsymmetrical derivatives of azaphthalocyanines (Aza-Pc) with carboxy or hydroxy group, and the preparation of suitable precursors of Aza-Pc. Required zinc and magnesium complexes were synthesized using statistical condensation of two different precursors. The desired complex was isolated from the mixture, purified and characterized. The preparation of the precursor 6-(3-*tert*-butylsulfanyl-5,6-dicyanopyrazine-2-ylamino)hexanoic acid was successful. The cyclization of two precursors yielded the following Aza-Pc: 3-carboxy[2',3'-b]quinoxalino-11,12,18,19,25,26-hexakis(*tert*-butylsulfanyl)tripyrzino[g,l,q]porphyrzinato zinc (II); 3-carboxy[2',3'-b]quinoxalino-11,12,18,19,25,26-hexakis(*tert*-butylsulfanyl)tripyrzino[g,l,q]porphyrzinato magnesium (II). The modification of the preparation of precursor 5,6-dioxo-1,4,5,6-tetrahydropyrazine-2,3-dicarbonitrile by decreasing the reaction temperature has shown to be unsuitable.

Obsah

1. Seznam zkratk	8
2. Teoretická část	9
2.1. Úvod.....	9
2.2. Princip PDT	9
2.3. Historický pohled.....	10
2.4. Mechanismus PDT.....	13
2.4.1. Fotoproces typu I.....	14
2.4.2. Fotoproces typu II.....	15
2.5. Biologická odpověď	16
2.6. Fotosensitizéry	17
2.6.1. Fotosensitizéry 1. generace	17
2.6.2. Fotosensitizéry 2. generace	18
2.6.3. Fotosensitizéry 3. generace	19
2.6.4. Používané fotosensitizéry.....	19
2.6.5. Vlastnosti ideálního PS	21
2.7. Věkem podmíněná makulární degenerace	24
2.8. Průnik světla skrz tkáň	26
2.8.1. Zdroje záření používané pro PDT	28
3. Cíl práce	29
4. Metodická část	30
4.1. Syntéza derivátů pyrazinu.....	30
4.2. Substituční reakce pyrazinů	30
4.2.1. Nukleofilní substituce typu aminodehalogenace.....	31
4.2.2. Nukleofilní substituce typu alkyl(aryl)sulfanyldehalogenace	32
4.3. Selektivní syntéza nesymetricky substituovaných ftalocyaninů..	33
4.3.1. Syntéza A ₃ B ftalocyaninů	34
4.3.2. Syntéza A ₂ B ₂ ftalocyaninů	37
4.3.3. Syntéza ABAB ftalocyaninů	37
4.3.4. Syntéza AABB ftalocyaninů	38
5. Experimentální část	39
5.1. Schéma prováděných reakcí	40
5.2. Příprava prekurzorů AzaPc	43
5.2.1. Příprava 5,6-dioxo-1,4,5,6-tetrahydropyrazin-2,3-dikarbonitrilu(1).....	43
5.2.2. Příprava 5,6-dichlorpyrazin-2,3-dikarbonitrilu (2).....	44
5.2.3. Příprava 6-(3-terc-butylsulfanyl-5,6-dikyanpyrazin-2-ylamino)hexanové kyseliny) (3)	45

5.2.4. Příprava 5,6-bis(hydroxyethylsulfanyl)pyrazin-2,3-dikarbonitrilu(4).....	46
5.3. Příprava nesymetrických derivátů AzaPc.....	47
5.3.1. Izolace [9,10,16,17,23,24-hexakis(terc-butylsulfanyl)-2-(2-karboxyethylsulfanyl)-3-methyl-1,4,8,11,15,18,22,25-oktaazaftalocyaninato] zinečnatého komplexu	47
5.3.2. Příprava [9,10,16,17,23,24-hexakis(terc-butylsulfanyl)-2,3-bis(2-karboxyethylsulfanyl)-1,4,8,11,15,18,22,25-oktaazaftalocyaninato] zinečnatého komplexu (5)	48
5.3.3. Příprava [9,10,16,17,23,24-hexakis(terc-butylsulfanyl)-2,3-bis(2-karboxyethylsulfanyl)-1,4,8,11,15,18,22,25-oktaazaftalocyaninato] hořečnatého komplexu (6).....	49
5.3.4. Příprava 3-karboxy[2',3'-b]chinoxalino-11,12,18,19,25,26-hexakis(terc-butylsulfanyl)tripyrazino[g,l,q]porfyrizinato hořečnatého komplexu (7).....	50
5.3.5. Příprava 3-karboxy[2',3'-b]chinoxalino-11,12,18,19,25,26-hexakis(terc-butylsulfanyl)tripyrazino[g,l,q]porfyrizinato zinečnatého komplexu (8).....	52
6. Diskuse.....	54
7. Závěr	57
8. Literatura.....	58

1. Seznam zkratk

ALA	aminolevulinová kyselina
AMD	„age-related macular degeneration“, věkem podmíněná makulární degenerace
AzaPc	azaftalocyanin
DMF	dimethylformamid
DMSO	dimethylsulfoxid
HpD	„hematoporphyrine derivate“
ISC	„intersystem crossing“, inter-systémová přeměna
Pc	ftalocyaniny
PDT	„photodynamic therapy“, fotodynamická terapie
PS	fotosenzitizér
ROS	reaktivní formy kyslíku
SubPc	subftalocyaniny
THF	tetrahydrofuran
DEA	diethylamin
TFA	kyselina trifluoroctová

2. Teoretická část

2.1. Úvod

Fotodynamická terapie (photodynamic therapy – PDT), je neinvazivní metodou léčby nejrůznějších typů rakoviny a některých benigních procesů. Nabízí selektivní odstranění patologické tkáně bez poškození okolních zdravých buněk. Ve fotodynamické terapii je společně využíváno působení světla (viditelného či blízkého infračerveného), kyslíku a fotosensitizeru (PS)^{1,2,3,4}.

PDT je komplexní technologií, která závisí na chemických a fotochemických vlastnostech PS, dávkování PS, vehikulu pro PS, časovém intervalu světla, vlnové délce, dávce energie, vlastnostech světla, a na okysličení cílené oblasti.

Nenádorové aplikace PDT zahrnují oční lékařství, kardiovaskulární systém, imunologii, léčbu infekcí, fotodetekci⁵⁶

2.2. Princip PDT

Patologická tkáň s akumulovaným fotosensitizerem (PS) je ozářena světlem s vlnovou délkou 600–900 nm. Po ozáření přenáší excitovaný PS absorbovanou energii na volně rozpuštěný kyslík v tkáních za vzniku singletového kyslíku $^1\text{O}_2$. PS se přenesením energie vrací do základního stavu a děj se může opakovat, pokud trvá světelná excitace a je přítomen kyslík. Oxidativní atak cytotoxického $^1\text{O}_2$ a volných radikálů vede k buněčnému poškození a následně k destrukci rakovinných buněk (dochází též k likvidaci nemocných buněk naprogramovanou smrtí, tzv. apoptózou). Na retenci PS v tumorech se podílí vedle jejich zvýšené afinity k rychle rostoucím tkáním řada faktorů, včetně odlišné morfologie a metabolismu tumorů⁷.

Léčebný efekt PDT je závislý současně na hloubce průniku záření do tkání, přítomnosti dostatečného množství kyslíku a na místní koncentraci podaného PS. Nadbytečná energie po ozáření PS, která není předána kyslíku, se z PS uvolní. Pokud ozáříme takto ošetřené ložisko ultrafialovými paprsky, můžeme jeho fluorescenci, vzniklou na podkladě krátkodobého uvolňování absorbované energie, využít k diagnostickým účelům – lokalizaci maligního bujení (nádoru, metastáz). Dalším využitím fluorescenční zobrazovací techniky je v její schopnosti zlepšit dosimetrii.

Fluorescenčním měřením se stanoví aktuální množství dávky PS v pacientově lézi před nastavením vhodných světelných parametrů.

PDT je předmětem studia na řadě špičkových pracovišť ve světě^{8,9,10}.

2.3. Historický pohled

O léčbě, využívající světla a světlem aktivované sloučeniny, jsou zmínky až do starověku, a byla využívána v širokém spektru nemocí^{11,12,13}. Zajímavým poznatkem byla aplikace mastí na kožní nádory, které byly pak vystavené slunečním paprskům. Počátky moderní fototerapie spadají do devadesátých let 19. století, kdy Niels Finsen (dánský lékař), úspěšně léčil kožní TBC zářením z obloukové uhlíkové lampy, imitující sluneční spektrum. Byl oceněn roku 1903 Nobelovou cenou. Také, že světelné záření úspěšně pomáhá např. v léčbě křivice a novorozenecké hyperbilirubinemie. V roce 1900 publikoval Tappeiner zkušenosti s užitím roztoku akridinu usmrcujícím nálevníky jen za přítomnosti záření (ve tmě byl akridin neúčinný). Proto předpokládal, že bude možné použít některé fluoreskující látky k léčbě pacientů s kožními chorobami. Spolu s Jesionkem zveřejnili zprávu o svých pokusech s léčbou spinaliomu, bazaliomu a kožní TBC lokálně aplikovaným eosinem a následným ozářením, a uvažovali o možnosti využití této léčby u dalších kožních chorob. V roce 1904 dokázali Tappeiner a Jodelbauer, že k dosažení léčebného efektu akridinu je nutná přítomnost kyslíku. Tappeiner pak začal pro ošetření afekcí fotoaktivní látkou s následným ozařováním za přítomnosti kyslíku užívat pojem „fotodynamický efekt“. Fotosenzibilizaci ale popsali již v roce 1874 Schulz a Baumstark u onemocnění, které nazvali pemphigus leprosus. Šlo o tehdy ještě nediagnostikovanou kongenitální porfyrii.

Fotosenzibilizaci hematoporfyrinem prokázal pokusem na sobě Meyer-Betz, když si i. v. aplikoval hematoporfyrin a následně se vystavil působení slunečních paprsků. Došlo u něj k fotosenzibilizaci, otoku celého těla a šokové reakci, která ho stála málem život^{8,9,14}.

Průběhem fotodynamických reakcí se zabýval na počátku 20. století Oskar Raab na kulturách prvoků rodu *Paramecium*. Kombinace akridinu a světla měla na protozoa letální efekt¹⁵.

V roce 1911 Hausmann zjistil, že hematoporfyrin v kombinaci se světlem zabíjí prvoky rodu *Paramecium* a červené krvinky¹⁶.

Syntézou mnohem účinnějších hematoporfyrinových derivátů (HpD, Photofrin®) se zabýval v polovině 50. let minulého století Richard Lipson se svými spolupracovníky. Pokoušeli se zlepšit jejich schopnost kumulace v nádorové tkáni. První testování na lidech zrealizoval Lipson až roku 1972, kdy vyléčil pacienta s metastází na hrudníku. V 70. letech provedl Dougherty poměrně úspěšnou preklinickou studii s 25 pacienty. Ze 113 primárních i sekundárních nádorů kůže se u 111 případů docílilo částečné nebo úplné nekrózy nádorových buněk, pouze dvě ložiska se ukázala být k léčbě rezistentní. Tím také dokázal, že HpD a světlo z červené oblasti světelného spektra mohou selektivně zničit nádorové buňky bez poškození zdravé tkáně¹⁶.

Problémy s čistotou HpD, jejich absorpční vlnová délka a opožděná fototoxicita vedly v 80. letech 20. století k hledání nových sloučenin s lepšími vlastnostmi¹⁷.

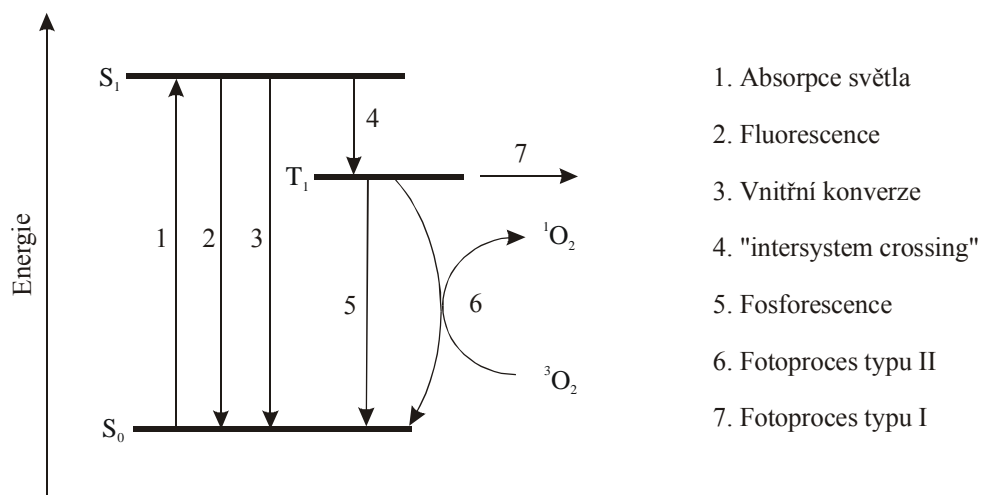
Shrnutí

- Starověk – Řecko (Herodotus – otec „heliotherapie“), Egypt -psoraleny (vitiligo), Čína, Indie
- 19./20. stol. – Niels Finsen, 1903 udělena Nobelova cena za léčbu kožní tuberkulózy
- 1900 – Oskar Raab – cytotoxický efekt kombinace akridinu a světla = smrt prvoků rodu *Paramecium*
- 1903 – H.von Tappeiner a A.Jesionek – topická aplikace eosinu a bílého světla = léčba kožních nádorů, „fotodynamický efekt“
N. Finsen – Nobelova cena za fototerapii
- 1913 – F.Meyer-Betz – první „testy“ na člověku, použití porfyrinů (hematoporfyrin)
- 1955 – S.Schwartz – objev HpD, acetylací a redukcí hematoporfyrinu
- 1960 – Richard Lipson a E. J. Baldes – fotodetekce nádorů pomocí HpD a jeho akumulace v nádorech
- 1975 – T.J. Dougherty a spol. – úspěšná léčba kožních nádorů na pacientech
- 80. léta – další studie s HpD

- 1993 - QLT Phototherapeutics (Vancouver, Kanada) – Registrován porfimer sodný pod komerčním názvem Photofrin[®] a zaveden do klinické praxe k léčbě rakoviny (nádory močového měchýře)
- 1999 QLT Phototherapeutics – Registrován verteporfin pod názvem Visudyne[®] a zaveden do klinické praxe k léčbě AMD
- 2000 DUSA Pharmaceuticals, Inc. – Registrován aminolevulinát pod názvem Levulan[®]
- 2001 Biolitec pharma, Ltd. – Registrován temoporfin pod názvem Foscan[®]
- 2001 Photocure, ASA –Registrován methylaminolevulinát pod názvem Metvix[®]
- 2004 Photocure, ASA – Registrován hexylaminolevulinát pod názvem Hexvix[®]
- 2005 Meiji Seika Kaisha, Ltd. – Registrován talaporfin pod názvem Laserphyrin[®]
- 20./21. století – nové fotosensitizéry, nové aplikace i mimo nádory

2.4. Mechanismus PDT

Princip probíhajícího fotofyzikálního procesu, který je podstatou PDT, vysvětluje modifikovaný Jablonského diagram (Obr.1).



Obr. 1: Modifikovaný Jablonského diagram

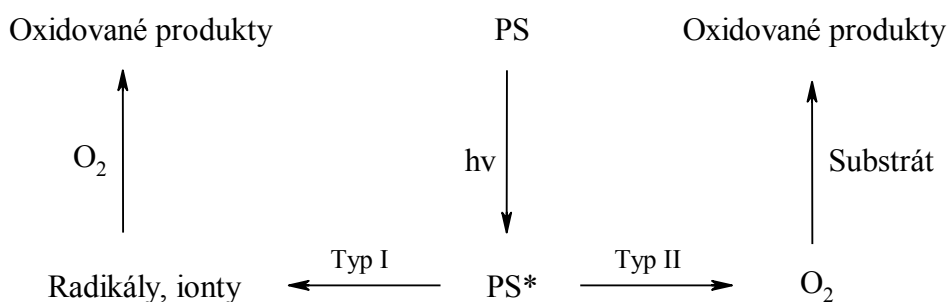
Popisuje chování typického fotosenzitizéru. Po absorpci světelného kvanta se PS transformuje ze základního singletového stavu (S_0) do excitovaného singletového stavu (S_1)¹⁸. Tento stav trvá příliš krátce (v jednotkách nanosekund) na to, aby umožnil efektivní interakci s okolním prostředím a vzhledem k tomu se předpokládá, že zanedbatelně ovlivňuje fotodynamickou aktivitu PS. Z této energetické hladiny se PS může uvolnit několika způsoby¹⁹ zahrnujícími procesy jak radiační (fluorescence), tak neradiační (vnitřní konverze a tzv. „intersystem crossing“, ISC, cesta 4 na obr.1).

Při vnitřní konverzi dochází ke srážkám s molekulami rozpouštědla a k uvolnění energie ve formě tepla. Někteří autoři považují tento proces také za důležitý při vlastním účinku na buňky²⁰.

ISC má zvláštní význam pro PDT. Je to spinem „nepovolený“ proces a vyžaduje inverzi spinu, čímž přeměňuje fotosenzitizér do tripletového stavu (T_1). Každá taková „nepovolená“ cesta je méně pravděpodobná než cesta „povolená“, ale dobrý fotosenzitizér se přeměňuje „nepovolenou“ ISC cestou s vysokou pravděpodobností. Molekula pak může relaxovat z tripletového stavu několika způsoby: může ztratit energii tzv. triplet-singlet emisí fotonu známou jako fosforescence (cesta 5) a bez

vyzařování spinovou výměnou s jinou molekulou v tripletovém stavu²¹ – tzv. „zhášením“ excitovaného tripletového stavu.

„Zhášecí“ mechanismus T₁ stavu fotosensitizeru může být rozlišen dle převažující cesty na fotoproces typu I a typu II²² (Obr.2). Oba fotoprocesy se objevují současně a poměr mezi nimi je silně ovlivněn použitým PS, substrátem a koncentrací kyslíku. Všeobecně se přijímá, že fotoproces typu II, při němž vzniká singletový kyslík, je zejména odpovědný za vlastní fotodynamický účinek²³.

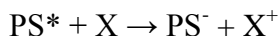


Obr.2

2.4.1. Fotoproces typu I

PS reaguje přímo se substrátem, rozpouštědlem nebo jiným PS. Dochází k přenosu protonu nebo elektronu na radikálovou formu iontu. Tyto radikály jsou velmi reaktivní a mohou dále reagovat s molekulárním kyslíkem a vytvořit reaktivní formy kyslíku (ROS) nebo způsobit neopravitelné poškození. Tyto reakce způsobují oxidativní poškození a mohou eventuálně vést k cytotoxickému efektu pozorovaném v průběhu PDT^{24,25}

K tomuto procesu dochází především za snížené koncentrace kyslíku. Při úplné anoxii reaguje excitovaný (PS*) přímo s okolním biologickým substrátem (X).



PS⁻ může dále za hypoxie reagovat s kyslíkem za produkce superoxid anion radikálu (O₂^{·-}), který poskytuje reaktivní hydroxidový radikál (HO·) a právě ten se dále významně účastní oxidačních procesů. Případně dochází přenosem elektronu již v prvním kroku k tvorbě radikálů z biologického substrátu (X·), nebo okolního rozpouštědla. Tyto pak mohou reagovat přímo s kyslíkem a poskytovat například superoxid anion radikál nebo přímo zafixují změnu v biologické molekule její oxidací (XO). Samotný superoxid nemá příliš velkou oxidační aktivitu, ale vzájemnou reakcí

(dismutací) mezi molekulami vznikají peroxid vodíku a kyslík. V biologických systémech pak často probíhá tzv. Fentonova reakce, která zahrnuje přeměnu H_2O_2 na hydroxylový radikál ($HO\cdot$) a hydroxylový iont (HO^-). Tato reakce je katalyzována kovovými ionty (např. Fe^{3+}), ty jsou pomocí superoxidu jakožto donoru elektronu redukovány a následně schopny štěpit vazbu O-O v peroxidu vodíku.

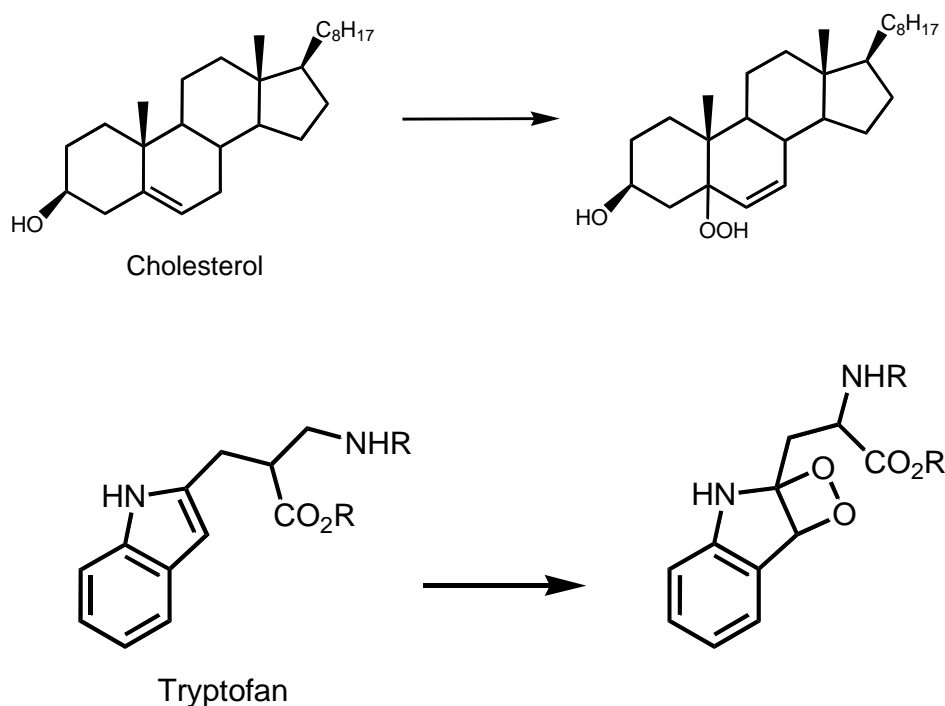
Tento vysoce reaktivní hydroxylový radikál podobně jako peroxid vodíku velice snadno prostupuje buněčnými membránami. Způsobuje další oxidativní změny a spolu s organickými substráty dává vznik dalším reaktivním radikálům, jako např. peroxidovému radikálu ($ROO\cdot$), který může dále napadat jiný organický substrát. Tento následný řetězec reakcí vysvětluje, proč hydroxidový radikál způsobuje tak rozsáhlé poškození^{24,25}.

2.4.2. Fotoproces typu II

Tento fotoproces převažuje hlavně při vyšších koncentracích kyslíku ve tkáni. Jedná se o přenos energie z tripletového stavu PS na základní stav molekulárního kyslíku, což vede k vytvoření excitovaného stavu kyslíku známého jako singletový kyslík (1O_2). Vzniku této formy kyslíku předchází inverze spinu jednoho z jeho vnějších elektronů. Díky své vysoké reaktivitě může singletový kyslík reagovat s velkým množstvím biologických substrátů, způsobovat oxidativní poškození a buněčnou smrt²⁶.

Doba života 1O_2 je různá a liší se v závislosti na prostředí ve kterém se nachází. Předpokládá se však, že není schopen penetrovat hlouběji do tkání než jen přibližně na šířku buněčné membrány. Tím je v podstatě zaručena destrukce výhradně buněk obsahujících PS. Současně s tím lze, díky selektivní kumulaci v nádorové tkáni a následnému ozáření, umožnit poměrně přesně lokalizovaný zásah.

Singletový kyslík reaguje s biologickým materiálem oxidací nebo cykloadicí (Obr.3). Terčem jsou především molekuly obsažené v membránách, cholesterol, nenasycené mastné kyseliny, dále DNA a aminokyseliny, např. cystein, methionin, tyrozin, histidin a tryptofan. Po poškození reaktivním kyslíkem přestávají plnit své biologické funkce a dochází k celkovému ireversibilnímu poškození buňky, popř. až k její smrti²⁶. Z důvodu velké reaktivity a krátkého poločasu singletového kyslíku a hydroxyldových radikálů jsou zasaženy pouze molekuly a struktury v místě jejich vznikutí. Poločas singletového kyslíku v biologickém systému je < 40 ns, a proto akční rádius je v řádu 20 nm²⁷.



Obr. 3: Příklad oxidace cholesterolu singletovým kyslíkem a cykloadice singletového kyslíku na aminokyselinu tryptofan

2.5. Biologická odpověď

Na zničení nádoru se podílí přímá destrukce jednotlivých buněk, které akumulovaly dostatečné množství PS a byly ozářeny dostatečným množstvím světla potřebného k produkci reaktivní formy singletového kyslíku². Tato přímá buněčná destrukce je doprovázena poškozením cév nádoru, a tím je významně omezena výživa tumoru (cévní uzávěr může ovlivnit množství kyslíku). Navíc může PDT aktivovat imunitní systém k ataku na tumorové tkáně⁷, díky cytokinům a dalším mediátorům zánětu uvolněným z napadených buněk². Tato myšlenka by se mohla využít pro tvorbu PDT vakcíny²⁸.

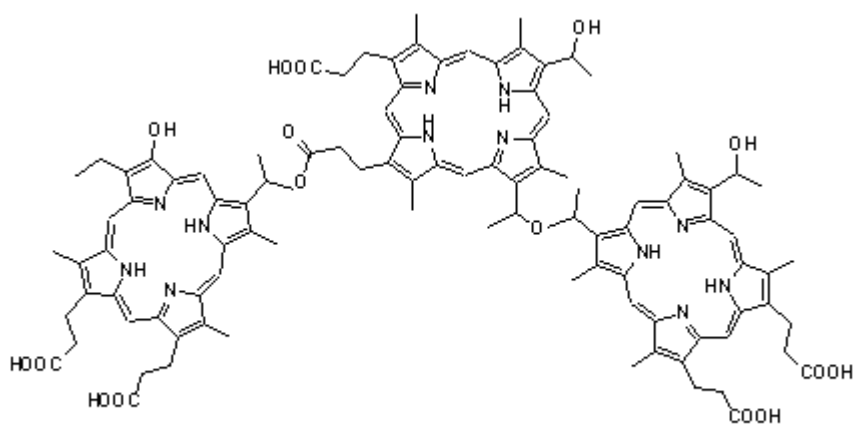
Obecně se dá říct, že hydrofobní PS působí spíše přímým efektem na buňky, kdežto hydrofilní PS spíše poškozuje cévy a brání tak přísunu živin². Jednotlivé složky ovšem nelze od sebe navzájem oddělovat a výsledek je vždy kombinací všech faktorů, jejichž vliv se mění v závislosti na použitém PS, typu nádoru a způsobu ozáření²⁹.

2.6. Fotosensitizéry

V současnosti známé fotosensitizéry lze rozdělit do tří generací. První generaci tvoří pravděpodobně pouze HpD a vyznačuje se některými nevýhodnými vlastnostmi, kvůli nimž byly připraveny látky druhé generace. Kromě látek odvozených od porfyrinů sem patří látky jiných chemických struktur. Třetí generaci tvoří PS generace druhé spojené s některými biomolekulami, umožňujícími tak cílenější biodistribuci v těle³⁰.

2.6.1. Fotosensitizéry 1. generace

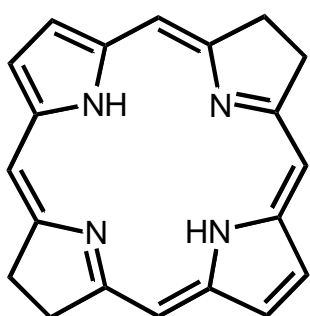
Tyto PS mají pro aplikační použití některé nevýhody. Mezi nevýhodné vlastnosti patří zejména jak velmi nízká vlnová délka vhodná pro aktivaci (630 nm), tak i nízký extinkční koeficient při této vlnové délce ($1170 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), takže je zapotřebí docela vysoká dávka PS a zároveň i vysoká dávka světla. Dalšími problémy jsou neznalost detailní chemické struktury (vícesložkové preparáty) a vedlejší účinek aplikace preparátu, způsobující senzibilizaci pokožky pacienta, který musí být chráněn po řadu dní před denním světlem. Příkladem nejrozšířenějšího PS 1. generace v klinické praxi je porfimer sodný^{31,32} - první oficiálně schválený PS pro PDT. Je to nejasně definovaná směs hematoporfyrinu (HpD) (1-hydroxyethyl)vinyaldeuteroporfyrinu, protoporfyrinu a složité dimerní a oligomerní frakce³³.



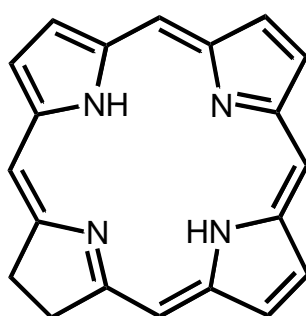
Obr.4: Příklad části porfimeru

2.6.2. Fotosensitizéry 2. generace

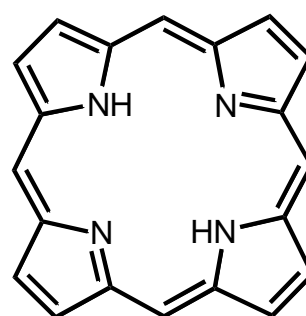
Od 90. let jsou předmětem vědeckého zájmu PS 2. generace, které jsou již dobře definovanými chemickými individui. Vykazují vyšší retenci v tumorové tkáni a absorpci světla při delších vlnových délkách než HpD, absorpční maximum je v oblasti 650 až 800 nm a fotochemický proces má vysoký kvantový výtěžek³². Řadí se sem např. látky ze skupiny porfyrinů (Obr.5), jim příbuzných chlorinů (Obr.6) a bakteriochlorinů (Obr. 7), ftalocyaninů (Obr. 8), naftalocyaninů (Obr. 9), porfycenů (Obr. 10), texafyrinů (Obr. 11) a dalších (Obr.12)³⁴.



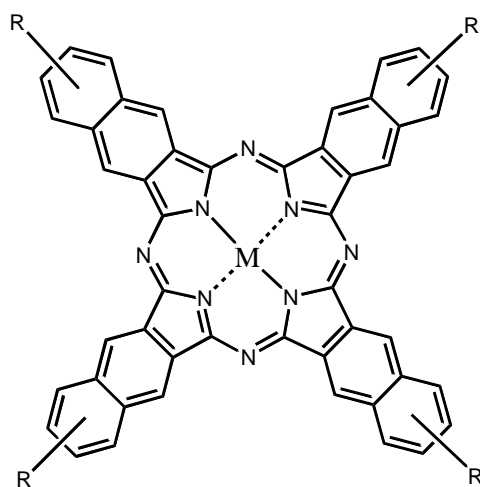
Obr.5: porfyrin



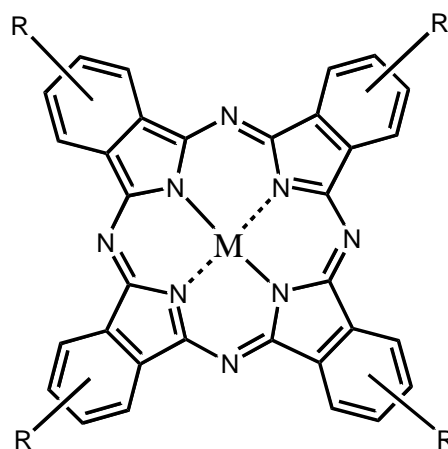
Obr.6: chlorin



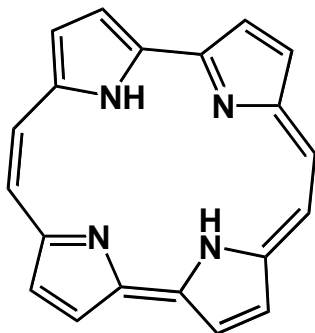
Obr.7: bakteriochlorin



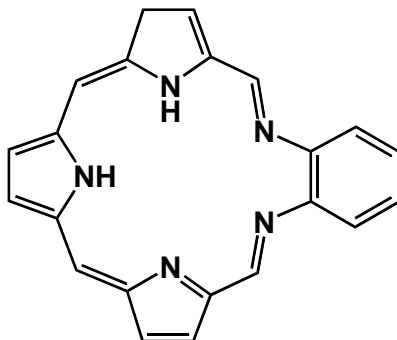
Obr.8: ftalocyanin



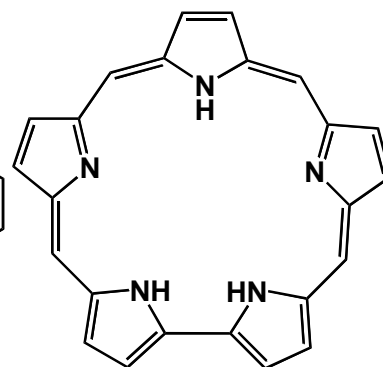
Obr.9: naftalocyanin



Obr. 10: porfycen



Obr. 11: texafyrin



Obr.12: sapphyrin

2.6.3. Fotosensitizéry 3. generace

Jako látky třetí generace se označují konjugáty PS s různými biomolekulami. Mezi látkami tvořícími fotosensitivní část konjugátů zaujímají vedoucí postavení porfyriny, zřejmě z důvodu snadné přípravy. Ve farmakokinetice konjugátu dominuje afinita porfyrinové části k sérovým proteinům. Afinita biomolekul k receptorům na povrchu buňky je vyjádřena méně. Porfyriny se konjugují zejména s protilátkami, steroidy, dále se sacharidy a polynukleotidy²¹.

2.6.4. Používané fotosensitizéry

Většina PS je odvozena od tetrapyrrolového aromatického jádra, jež můžeme najít v mnoha přirozeně se vyskytujících barvách jako hem, chlorofyl a bakteriochlorofyl (z nich se PS připravují částečnou syntézou). Tetrapyrroly mají obvykle relativně velké absorpční pásmo v rozsahu 400 nm, známé jako Skřetův pás a řadu postupně se zmenšujících pásem nazývaných Q-pásma v oblasti nad 600 nm.

Přirozeně se vyskytující porfyriny (obr.5) jsou plně konjugované tetrapyrroly a liší s v počtu a typu postraních skupin zejména v karboxylových skupinách. Porfyriny mají maximální vlnovou délku absorpce v oblasti 630 nm. Chloriny (obr.6) jsou tetrapyrroly s redukcí dvojně vazby v jednom pyrrolovém kruhu. To znamená, že maximální vlnová délka absorpce se posouvá do oblasti 650-690 nm a vzrůstá intenzita absorpce při této vlnové délce. Oba tyto faktory jsou velice žádoucí v PDT.

Bakteriochloriny (obr.7) mají dva kruhy s redukovanou dvojnou vazbou, a to vede k posunu absorpčního pásma dokonce ještě dál, do červené části spektra, a roste dále na intenzitě. Bakteriochloriny se mohou ukázat jako efektivnější PS než chloriny, ale je jen pár kandidátů na PS a jsou při uchovávání nestabilní.

Je řada klasických chemických derivátů obecně získaných z přirozeně se vyskytujících porfyrinů, chlorinů a zahrnují takové struktury jako purpuriny, feoforbidy, pyrofeoforbidy, feofytiny a forbiny.

Druhou široce studovanou třídou PS jsou ftalocyaniny (PC), a v menší míře jejich obdoba naftalocyaniny³⁵. S posunutou maximální vlnovou délkou absorpce směrem k červené části spektra (670-700 nm) a zesílenou absorpcí při této vlnové délce (ϵ až $200\,000\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$) jsou PC velice perspektivní. Důležité pro PDT účinek je přítomnost chelátovaných centrálních kovů a polokovů. Některé prodlužují trvání tripletového stavu PS, a tím i zvyšují účinnost v PDT (např. Zn, Al, Si). Přítomnost čtyř přikondenzovaných benzenových jader (či hůře naftalenových) zapříčiňuje špatnou rozpustnost a agregační problémy. Rozpustnost ve vodě se daří dosáhnout například sulfonací, vzniká ovšem velice špatně separovatelná směs sulfonovaných produktů. Při sledování vlivu počtu sulfonových skupin, bylo zjištěno, že asymetrická substituce dvěma sulfonovými skupiny je nejúčinnější³⁶. Ovšem i směs derivátů se využívá.

Další třída potenciálních PS zahrnuje také úplně syntetické, v přírodě se nevyskytující, systémy konjugovaných pyrrolových jader. Např. texafyriny³⁷, porfyceny³⁸, sapfyriny³⁹.

Poslední třída studovaných barviv jako PS není odvozena od tetrapyrrolického jádra. Barviva se vyskytují volně v přírodě, či se synteticky vyrábí⁴⁰. Tyto sloučeniny nabývají na významu v souvislosti se stále častějším výskytem bakteriálních kmenů resistantních k antibiotikům. Fotodynamická inaktivace bakterií, virů, kvasinek a prvoků (photodynamic antimicrobial chemotherapy, PACT) je založena na stejném principu jako PDT³³. Vlastnost PS způsobující fotoinaktivaci *in vitro* i *in vivo* se souhrnně označuje jako fototoxicita nebo fotocytotoxicita. Zatímco při PDT se používají téměř výhradně porfyrinoidní PS, pro fotodynamickou dezinfekci se používají i fenothiazinová barviva (methylenová modř), aminoakridinová barviva a xanthenová barviva (bengálská červeň). Fenothiazinová a akridinová barviva nabízejí výhodu

dvojího účinku – jako konvenční dezinfekční činidla a jako fotodynamické PS se širokým spektrem antibakteriální a antivirové aktivity. Zatím je nejvíce používána methylenová modř, která má delší tradici různých lékařských aplikací. Nové PS odvozené od fenothiazinového skeletu vykazují vysokou antimikrobiální aktivitu^{41,42, 43}. Našly uplatnění v zubním lékařství při léčbě paradentózy³³.

2.6.5. Vlastnosti ideálního PS

Chemická čistota

PS by měl být chemicky čistý a známého složení, což je problém u HpD. U novějších PS se jedná již o dobře charakterizované látky (snad s výjimkou některých sulfonovaných ftalocyaninů).

Minimální toxicita ve tmě

PS by měl být toxický pouze po ozáření světlem vlnové délky vhodné pro jeho aktivaci. Bez této aktivace jsou jakékoliv jeho biologické účinky nežádoucí.

Dobré spektrální vlastnosti

Živé tkáně jsou pro elektromagnetické záření prostupné pouze v omezené míře, přičemž hloubka prostupnosti se zvyšuje se zvyšující se vlnovou délkou. Proto je potřebná silná absorpce s vysokými extinkčními koeficienty v oblasti 650 až 800 nm, kde penetrační schopnosti světla jsou maximální a energie je stále dostačující pro účinnou produkci singletového kyslíku⁴⁴. PS by měli pohlcovat světlo v červené oblasti nebo vzdálené červené oblasti za účelem dobrého průniku světla tkání. Světlo o kratší vlnové délce má menší penetraci a pravděpodobněji vede k větší citlivosti kůže na světlo ($\lambda < 600$ nm). Absorpční pásma o delší vlnové délce ($\lambda > 800$ nm) způsobí, že fotony nemají dostatečnou energii pro tripletový stav PS a ke změně základního stavu kyslíku na singletový. PS by měly mít relativně vysoké extinkční koeficienty ($\epsilon > 20\,000\text{--}30\,000\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$) ke zmenšení dávky PS potřebné k dosažení efektu³⁵.

Selektivní kumulace

PS by měl vykazovat výrazně zvýšenou kumulaci v nádorové tkáni oproti jiným tkáním. Selektivní cíl, jako například mitochondriální membrána, povede k naprogramované smrti-apoptóze.

Rychlá exkrece zbylého PS (méně než jeden den) z krevního řečiště je žádoucí, aby nedocházelo k možné systémové toxicitě.

Kvalitní fotochemické vlastnosti

Pro PS je žádoucí vysoký kvantový výtěžek triplexového stavu (Φ_T) a jeho dlouhá doba života (τ_T), umožňující následně vysokou produkci cytotoxického agens singletového kyslíku⁴⁴.

Další výhody

Krátký interval mezi aplikací injekce a osvětlením je žádoucí pro compliance pacienta, ekonomicky výhodný.

PS by neměl nadměrně agregovat v biologickém prostředí, protože to snižuje jeho fotochemickou efektivitu. Dále stabilní složení PS, skladovatelnost, rozpustnost ve vodě či v neškodném vodném prostředí³⁵.

Bezbolestná terapie - PS je aplikován ambulantně, a bolestivá léčba by mohla ohrozit toto podání

Cena, dostupnost, modifikovatelnost - Nezanedbatelnými vlastnosti PS je také jejich cena, snadná dostupnost výchozích látek a případná jednoduchá modifikace pro zlepšení farmakokinetických vlastností.

Důležitou vlastností je rovněž polarita PS. Polární, hydrofilní fotosenzitizéry mohou být aplikovány intravenózně přímo po rozpuštění ve vodě. Hydrofobní PS vyžadují aplikaci na nosičích³³.

Příklady PS

Tyto sloučeniny byly již schváleny pro léčebné účely nebo jsou v různém stupni klinických testů³³.

Lék	Léčivá látka	Výrobce	Léčené nemoci	Aktivační λ (nm)
Photofrin [®]	porfimer sodný	Axcan Pharma	Rakovina jícnu, kůže, plic, krve; Barretův jícen; Karcinom děložního krčku; Kolorrektální tumor	630 nm
Visudyne [®]	verteporfin (benzoporfyrinový derivát)	Novartis Pharmaceuticals	AMD; NMSC; Patologická myopie	690 nm
Foscan [®]	Temoporfin	Biolitec Pharma Ltd	NMSC hlavy a krku (zmírnění příznaků)	652 nm
Antrin [®] Lutex [®]	motexafin lutecium	Pharmacylics	Tumor prostaty, hlavy, děložního krčku	732 nm
Purlytin [®]	Rostaporfin	Miravant Medical Technologies	Kožní metastázy; Rakovina prsu, prostaty; Bazocelulární karcinom; Kaposiho sarkom; AMD	664 nm
LS11, Laserphyrin [®]	talaporfin sodný	Light Sciences	Solidní tumory různého původu; AMD	664 nm
Photochlor [®]	HPPH	RPCI	Bazocelulární karcinom	665 nm

Photosens [®]	sulfonovaný hlinitý ftalocyanin	General Physics Institute	Kožní a podkožní léze různých solidních nádorů	670 nm
Pc4 [®]	křemičitý ftalocyanin	-----	Solidní tumory různého původu	670 nm
Levulan [®]	5-aminolevulinová kyselina (ALA)	DUSA Pharmaceuticals	Zhoubná onemocnění kůže; Bazocelulární karcinom; Bowenova nemoc	632 nm
Metvix [®]	ALA-methylester	Photocure ASA Galderma	Prekancerózní kožní léze	632 nm
Hexvix [®]	ALA-hexylester	Photocure ASA	Detekce rakoviny krve	632 nm
Benzvix [®]	ALA-benzylester	Photocure ASA	Detekce rakoviny krve	632 nm

AMD - Age-related macular degeneration (věkem podmíněná makulární degenerace)

NMSC - Non-melanoma skin cancer (nemelanomatozní rakovina kůže)

RPCI - Roswell Park Cancer Institute

HPPH - Hexyl-ether derivát pyrofeoforbidu-a

2.7. Věkem podmíněná makulární degenerace

Věkem podmíněná makulární degenerace (dříve nazývaná senilní makulární degenerací, VPMD) je oční onemocnění, které je v rozvinutých zemích nejčastější příčinou praktické slepoty lidí starších 55 let. Postihuje centrální část oční sítnice, kterou nazýváme žlutá skvrna neboli macula lutea, zkráceně makula. VPMD má dvě formy, suchou (atrofickou) a vlhkou (exsudativní). Suchá forma VPMD je přítomna u 90 % případů VPMD, ale pouze u 10 % nemocných působí závažnější ztrátu zraku. Suchá forma VPMD spočívá v atrofii (zániku) pigmentových i světločivných buněk sítnice (tyčinek a čípků) s následným vznikem výpadu zorného pole, které postupují

relativně pomalu. Vlhká forma se vyskytuje u 10% pacientů s VPMD, ale u 90 % nemocných působí závažnou ztrátu zraku. Je charakterizována prorůstáním novotvořených cév ze spodních vrstev pod sítnicí, spojeným s jejich prosakováním s následným otokem sítnice, jejím centrálním odchlípením a nezřídka krvácením pod sítnicí. Průběh onemocnění je rychlý až dramatický a vede k praktické slepotě během několika měsíců. Novotvořené cévy vytvářejí pod sítnicí membránovitý útvar, nazývaný choroidální neovaskularizací (CNV). Tato CNV je odpovědná za prosakování tekutiny či krve. Později je proces ukončen vznikem vazivové jizvy až koláčovitého útvaru, podobného nádoru, zrak je zhoršen na praktickou slepotu. V některých případech může nastat i masivní krvácení pod sítnicí i do sklivce, působící úplnou slepotu. VPMD vzniká zpravidla asymetricky v jednom oku, druhé oko bývá postiženo v průběhu dalších let s mírou rizika, narůstající každým rokem o 10 %. Po pěti letech je tedy druhé oko postiženo u poloviny nemocných a po deseti letech je oboustranné postižení jisté.

Podstatou VPMD je zřejmě poškozený gen, který řídí metabolismus sítnice a chrání ji před poškozením. Dalšími vlivy, podporujícími vznik VPMD, jsou kouření, strava chudá na ochranné prvky a ultrafialové světlo. Jelikož klíčovou součástí vývoje vlhké formy VPMD je novotvorba cév, nové výzkumy se zaměřují na potlačení růstu nových cév a na zánik již existujících patologických cév. Optimální lék proti choroidální neovaskularizaci by byl takový, který by potlačil růst patologických cév, stimuloval zánik existujících neovaskularizací, odstranil otok sítnice a krvácení snížením cévního prosakování, bránil jizvení a odchlípení sítnice, a navíc by byl snadno aplikovatelný.

Na rozdíl od situace před několika lety, kdy proti vlhké formě VPMD neexistovala účinná léčba, v posledních letech máme k dispozici léčebné postupy (mezi ně patří PDT), kterými lze postup choroby zpomalit či zcela zastavit a odvrátit tak praktickou slepotu.

PDT spočívá v nitrožilním podání barviva na bázi porfyrinu, který se vychytá v novotvořených cévách, a následně aplikaci laseru. V důsledku sražení krve v cévách je navozen uzávěr novotvořených cév, vedoucí k zastavení progresu CNV a k ústupu prosakování. Jelikož většinou dochází k opětovnému otevření cév a k obnovení prosakování, aplikace fotodynamické terapie se opakuje po třech měsících, průměrný počet aplikací je šest. Nejužívanějším porfyrinem pro fotodynamickou léčbu je verteporfin.

PDT má i nežádoucí účinky v podobě postupné atrofie makuly. Nežádoucím účinkům léčby se snaží čelit kombinovaná léčba, při níž se PDT doplňuje nitrooční injekcí steroidního hormonu (ovšem jedná se o experimentální postup). Obecně je terapie úspěšnější u časných stádií menších CNV s lepším vizem, s menším prosakováním a s menším poškozením buněk sítnice⁴⁵.

2.8. Průnik světla skrz tkáň

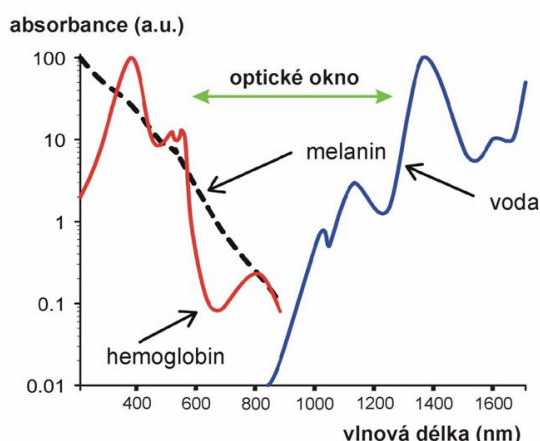
Současně s pokroky v oblasti chemie se vyvíjí nové světelné zdroje; lasery, světelné diody, širokopásmové světlo⁴⁶. Pokroky ve tkáňové optice přinesly obrovské zlepšení v léčbě. Předpovědí a naplánováním distribuce světla v cílené tkáni se optimalizoval klinický výsledek. Zjistilo se, že různé tkáně mají velmi odlišné optické vlastnosti, a dokonce stejný typ tkáně se značně liší mezi jedinci⁴⁷.

Světlo je buď rozptýlené či absorbované po průniku do tkáně. Rozsah obou procesů závisí na typu tkáně a vlnové délce světla. Rozptyl světla je způsobený průnikem záření skrze zakalené prostředí a způsobuje ztrátu jeho směru. Rozptyl je obecně nejdůležitějším faktorem, limitujícím průnik světla do většiny tkání, absorpce je většinou méně důležitá. Absorpce je velkou měrou zapříčiněna endogenními tkáňovými chromofory jako je hemoglobin, myoglobin a cytochromy a závisí na jejich koncentraci v dané tkáni. Třetím parametrem nezbytným k stanovení optických vlastností tkání je anizotropie. Ta měří směr rozptylu světla.

Kombinace absorpce nižší vlnové délky tkáňovými chromofory (oxy a deoxyhemoglobin, melanin) spolu s redukováným světelným rozptylem v delších vlnových délkách a absorpce vody ve vlnových délkách nad 1300 nm vedla ke konceptu "optického okna" (Obr.12). V rámci PDT je průměrná „efektivní hloubka penetrace“ (= intenzita snižená na 37%) 1-3 mm při 630 nm.

Pro léčebné účely pomocí PS se využívá vlnové délky v rozsahu 650-700 nm, kde je penetrace přibližně dvojnásobná^{48,49}. Rostoucí hloubka průniku při delší vlnové délce je významným stimulem pro rozvoj PS s těmito absorpčními vlastnostmi. Do této kategorie PS spadají naftalocyaniny (776 nm)⁵⁰ a bakteriochloriny (780 nm)⁵¹.

Absorpce světla samotnými PS může omezit průnik světla tkání. Tento fenomén má termín „self shielding“ (samostínění) a je obzvláště výrazný u PS, které absorbují výrazně při dané léčebné vlnové délce⁵².



Obr.12: Optické okno

Mnoho PS má sklon k světelné sebedestrukci, tento proces je nazývaný tzv. „photobleaching“⁵³ neboli vyblednutí. Je to jedna z obecných vlastností PS. PS různých chemických struktur mají i odlišné míry photobleachingu. V některých případech (obzvláště protoporphyrin IX) je první produkt photobleachingu dokonce lepší než výchozí PS⁵⁰.

Ve fotobiologii a fotochemii je photobleaching definován jako ztráta intenzity absorpce či emise způsobené světlem. U barviv dochází působením světla k chemickým změnám (ať už fotoadici, fotocyklizací, ireverzibilní fotoredukci nebo nejčastěji oxidací)⁴⁴, v jejichž důsledku dochází k narušení chromoforu. Jsou známy dva typy ireverzibilních chemických změn, fotomodifikace a tzv. „pravý photobleaching“.

Při fotomodifikaci dochází ke ztrátě absorpce nebo fluorescence při určité vlnové délce, avšak chromofor zůstává zachován v modifikované formě.

Při pravém photobleachingu je chemický zásah hluboký a chromofor se rozpadá na malé fragmenty, jež nemají významnější absorpci ve viditelné oblasti.

Důsledkem pro PDT (dochází většinou k pravému photobleachingu) je to, že PS už poté neabsorbuje světlo, kterému je tak umožněno proniknout do hlubších vrstev. Na druhou stranu ovšem rozložený PS je již neaktivní a nemůže vykazovat žádné cytotoxické vlastnosti⁵⁴. Hlavním výsledkem je tedy, že může být docíleno větší šíře nekrózy nádoru při zachování zdravé tkáně. Photobleaching se může také podílet na rychlejším vyloučení PS z těla díky jeho rozkladu v kůži⁴⁷.

2.8.1. Zdroje záření používané pro PDT

Světelným zdrojem bývají lasery, ale používají se i jiné zdroje např. LED diody. V případě vnitřních nádorů je nutno vést světlo k tumorové tkáni optickými vlákny⁷.

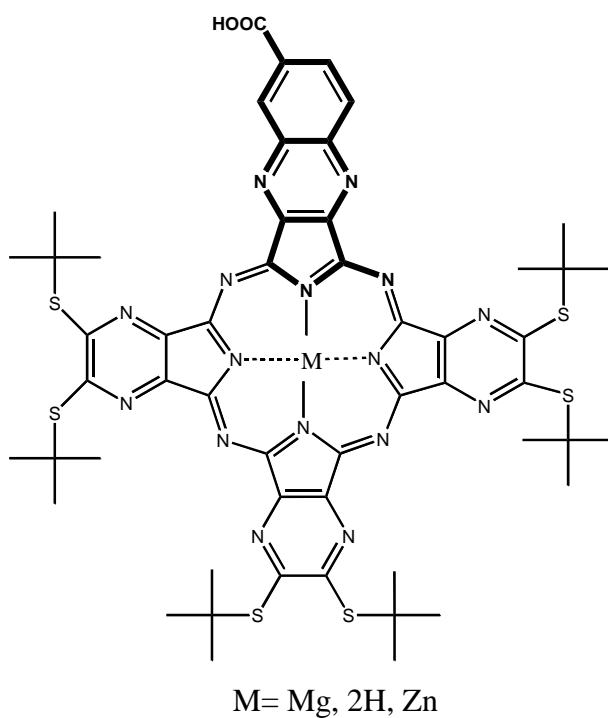
Hloubka průniku laserového světla závisí na jeho vlnové délce, na tom, zda laser pracuje v pulsním režimu a jaký je jeho výkon, ale také na technické konstrukci přístroje a na způsobu práce s laserem. Důležitým prvkem je zde také kompresivní odstranění krve z cílové tkáně, protože hemoglobin v krvi je velkou měrou odpovědný za absorpci.

Pokud jde o průnik světla, neexistuje zde žádná přesná hranice. Čím hlouběji od povrchu světlo proniká, tím více se zeslabuje. Existuje zde však hranice, za kterou je intenzita světla už tak nízká, že nelze pozorovat jeho žádnou biologickou účinnost. Tuto hranici, za níž přestává účinnost, nazýváme největší aktivní hloubkou. Stojí za zmínku, že laserové světlo může dokonce proniknout i kostí (stejně jako proniká svalovou tkání). Tuková tkáň je propustnější než tkáň svalová (vysoký obsah hemoglobinu). Terapeutické lasery vždy vyzařují červené (PDT) nebo infračervené světlo⁵⁵.

3. Cíl práce

Cílem této práce byla syntéza nesymetrických derivátů azaftalocyaninů (AzaPc) s periferními substituenty karboxylovou či hydroxylovou skupinou. Nově připravené AzaPc by mohly být použity jako část potenciálních fotosensitizerů třetí generace s vylepšenou biodistribucí.

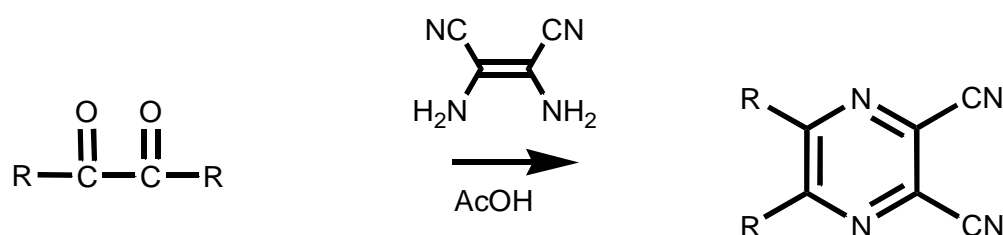
Mým úkolem bylo připravit vhodné prekurzory pro syntézu AzaPc, dále statistickou kondenzací připravit ze dvou odlišných prekurzorů požadovaný AzaPc (příklad viz struktura dole), vyizolovat, vyčistit a charakterizovat jej.



4. Metodická část

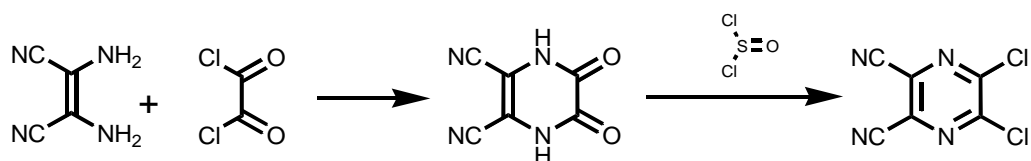
4.1. Syntéza derivátů pyrazinu

Mezi nejpoužívanější prekurzory v syntéze AzaPc patří různé deriváty pyrazin-2,3-dikarbonitrilů. Jejich přípravu lze provádět např. reakcí substituovaného diketonu s přebytkem diaminomaleonitrilu v prostředí ledové kyseliny octové. Výťažnost reakce se pohybuje okolo 85 % (Obr. 13)⁵⁶.



Obr. 13

Pokud připravujeme derivát pyrazin-2,3-dikarbonitrilu z diaminomaleonitrilu a oxalylchloridu v prostředí dioxanu, získáme 5,6-dioxo-1,4,5,6-tetrahydropyrazin-2,3-dikarbonitril, který lze převést působením thionylchloridu na reaktivní 5,6-dichlorpyrazin-2,3-dikarbonitril (Obr. 14)⁵⁷.



Obr. 14

4.2. Substituční reakce pyrazinů

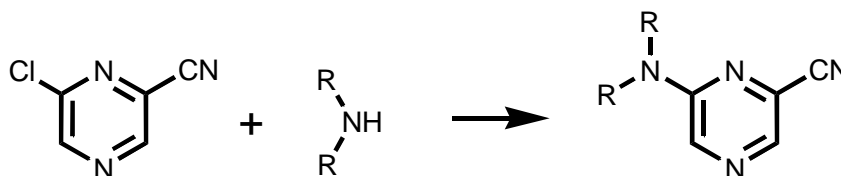
Pyrazin, podobně jako ostatní diaziny, nepodléhá snadno elektrofilním substitucím. Přímý elektrofilní atak je ztížen indukčním efektem dusíkových atomů pyrazinu a tedy existencí rezonančních struktur, které jsou příčinou kladného náboje na atomech uhlíku heterocyklu. Výhodnější jsou z tohoto důvodu substituce nukleofilní⁵⁸.

Důležitou skupinu sloučenin v chemii derivátů pyrazinu představují halogenpyraziny, protože mohou díky snadné výměně atomu halogenu za nukleofil poskytovat řadu jinak nedostupných derivátů.

Výměna halogenu v halogenpyrazin za aminoskupinu, resp. za sulfanyl-, alkylsulfanyl- či arylsulfanyl skupinu vyžaduje obecně tvrdé reakční podmínky. Reakci značnou měrou usnadňuje přítomnost elektronegativních skupin (např. $-\text{NO}_2$, $-\text{CN}$, $-\text{CONH}_2$, $-\text{COOH}$), zejména v polohách *ortho* a *para*. Snadnost substituce halogenu vzrůstá dále s počtem těchto aktivizujících skupin⁵⁹.

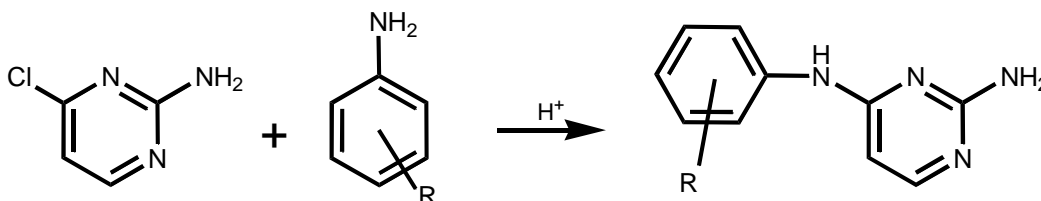
4.2.1. Nukleofilní substituce typu aminodehalogenace

Výše zmíněné obecné zákonitosti hrají vedle sníženého aromatického charakteru pyrazinového jádra důležitou úlohu v případě nukleofilní substituce na pyrazinovém jádře. Velmi dobře probíhá např. reakce 6-chlorpyrazin-2-karbonitrilu (Obr.15) s přebytkem alifatického nebo heterocyklického aminu, kterou použil pro přípravu 6-aminopyrazin-2,3-dikarbonitrilů Foks⁶⁰. Haider a kol.⁶¹ prováděl obdobnou reakci rovněž v nevodném prostředí, avšak s uhlíčanem draselným pro vycytání vznikající kyseliny chlorovodíkové.



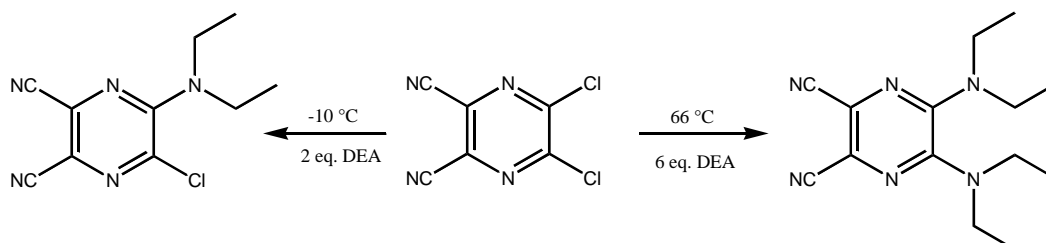
Obr. 15

Při syntéze arylaminoderivátů dusíkatých šestičlenných heterocyklů lze využít nukleofilní substituci v provedení podle Bankse⁶². Přípravu těchto látek prováděl Banks ve vodném prostředí při kyselém pH (Obr. 16). Kyselina chlorovodíková zde vystupuje jako katalyzátor.



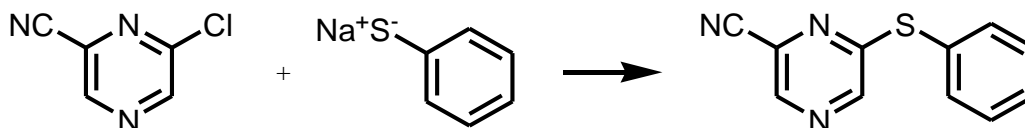
Obr. 16

V případě použití 5,6-dichlor-2,3-pyrazindikarbonitrilu jsou uhlíkové atomy nesoucí atomy chloru již dostatečně elektrondeficitní a nukleofilní substituce na nich probíhá i bez katalýzy kyselým prostředím. Příprava aminoderivátů probíhá velice rychle a takřka kvantitativně a reakci do prvního stupně je třeba provádět za chlazení⁶³.



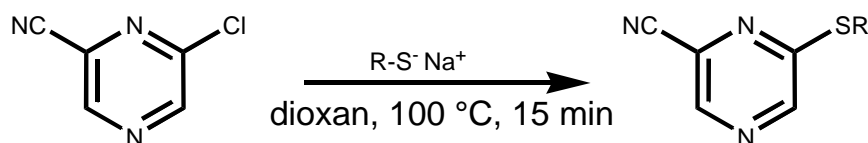
4.2.2. Nukleofilní substituce typu alkyl(aryl)sulfanyldehalogenace

Pro syntézu alkylsulfanyl- či arylsulfanylpyrazinů se často využívá reakce halogenovaného derivátu pyrazinu s příslušným alkyl- či arylthiolátem. Reakce většinou vyžaduje dlouhodobé zahřívání, často v autoklávu. Takto připravil Asai⁶⁴ z thiofenolu a 6-chlorpyrazin-2-karbonitrilu v prostředí ethanolátu sodného 5-fenylsulfanylpyrazin-2-karbonitril (Obr. 17).



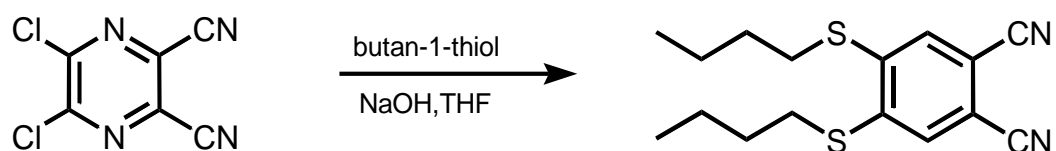
Obr. 17

Foks a spol.⁶⁵ získali řadu alkylsulfanyl- a arylsulfanylderivátů pyrazinkarbonitrilu reakcí 6-chlorpyrazin-2-karbonitrilu s příslušným alkyl- resp. arylthiolátem sodným v prostředí dioxanu za normálního tlaku (Obr. 18). Z těchto sloučenin pak syntetizovali celou řadu na jádře substituovaných funkčních derivátů pyrazinkarboxylové kyseliny.



Obr. 18

Další možností je reakce 5,6-dichlor-pyrazin-2,3-karbonitrilu s butan-1-thiolem v prostředí THF a za přítomnosti NaOH (Obr. 19) a nebo v přítomnosti pyridinu. Reakce s pyridinem trvá přibližně 12 hodin⁶⁶. Naproti tomu reakce za přítomnosti vodného NaOH probíhá velmi rychle (i za běžného tlaku a při běžné teplotě) a je hotová téměř ihned⁶⁷.

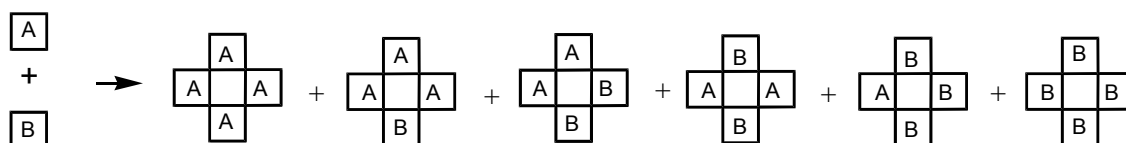


Obr. 19

4.3. Selektivní syntéza nesymetricky substituovaných ftalocyaninů

Vědci pracující v oblasti chemie ftalocyaninů (Pc) se po mnoho let snaží vyvinout selektivní metody syntézy nesymetricky substituovaných ftalocyaninů, protože vykazují často lepší fyzikální vlastnosti. Specifické postupy jsou využity v závislosti na typu produktu, který chceme získat⁶⁸.

Když je příprava nesymetricky substituovaných Pc provedena smíšenou kondenzací dvou různých ftalonitrilů A a B, získá se směs šesti různých sloučenin (AAAA, AAAB, AABB, ABAB, ABBA, BBBB).

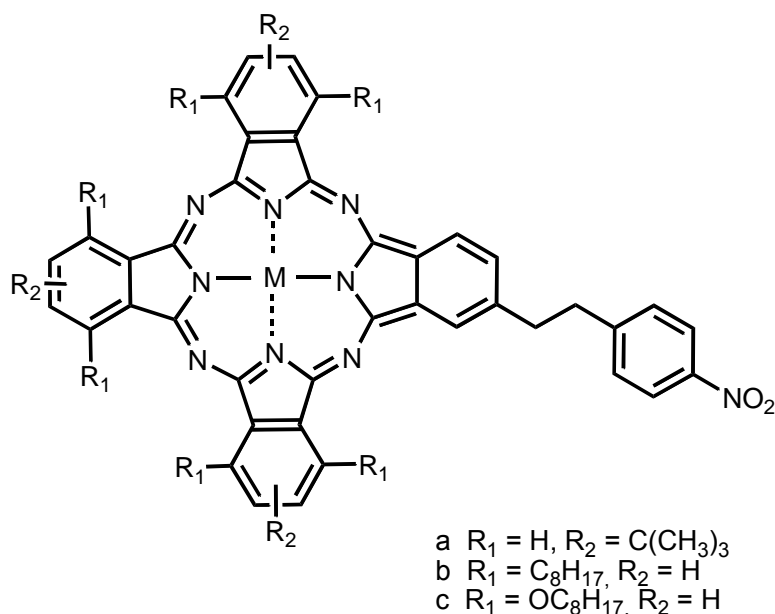


Požadovaný Pc musí být izolován prostřednictvím chromatografických technik. Tyto neselektivní metody obvykle vedou k velmi nízkým výtěžkům požadovaného nesymetrického Pc, a proto se mnohé pokusy snaží řešit tento problém⁶⁸.

4.3.1. Syntéza A₃B ftalocyaninů

Statistická kondenzace

Nejjednodušším postupem přípravy Pc nesoucího různé substituenty je smíšená kondenzace dvou různě substituovaných prekurzorů A a B. V zásadě jde o neselektivní metodu, která poskytuje směs šesti sloučenin (AAAA, AAAB, AABB, ABAB, ABBB, BBBB), což vyžaduje použití chromatografických technik k izolaci požadovaných makrocyclů. Takto vzniklou směs je často obtížné separovat v důsledku tendence Pc molekul k agregaci. I když použitím této metody není dosaženo selektivity, některé postupy se zaměřily na zvýšení výtěžku požadované sloučeniny⁶⁸. Statistická kondenzace je zpravidla užitá pro přípravu Pc obsahujících jednu odlišnou a tři identické isoindolové podjednotky (A₃B)⁶⁹(obr.20).



Obr.20

Aby reakce vedla k vytvoření A₃B derivátů je zapotřebí vhodný stechiometrický poměr použitých reaktantů A a B. Statistická úvaha předpokládá, že reakce dvou různých derivátů ftalonitrilu stejné reaktivity v poměru 3:1 poskytne směs produktů v následujícím procentuálním zastoupení: A₄ (33 %), A₃B (44 %), další kondenzační produkty (23 %). Běžně se používá molární poměr 3:1, který vede k požadované sloučenině získané ve výtěžcích pohybujících se v rozmezí 10-20 %⁶⁹.

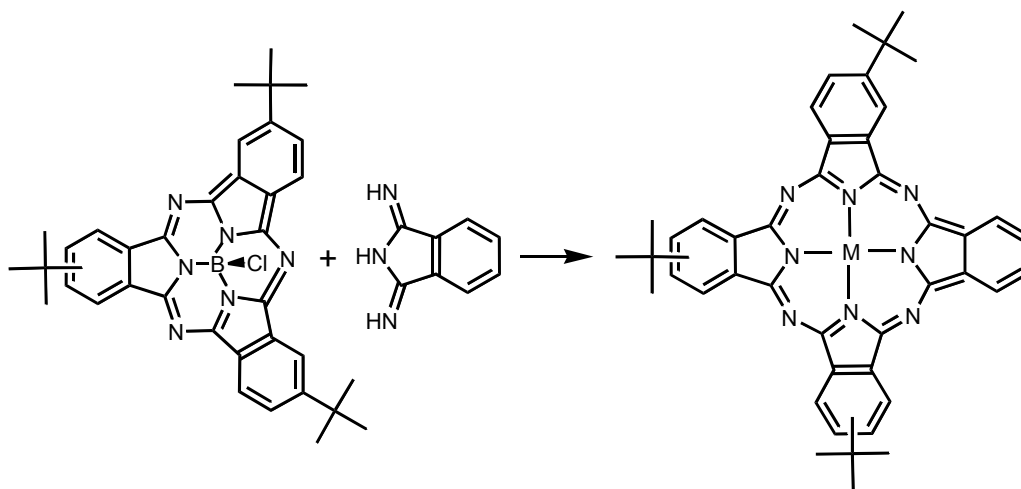
Je výhodnější použít ftalonitrily s různými charakteristikami rozpustnosti, což usnadňuje oddělení nesymetrických Pc díky odlišným chromatografickým vlastnostem

a mj. i odlišné rozpustnosti sloučenin ve výsledné statistické směsi. Vazba *tert*-butylových skupin nebo uhlovodíkového řetězce v poloze 3 a 6 jedné z výchozích látek (obvykle té v nadbytku) (obr.20) usnadňuje izolaci A₃B produktu. Tyto substituenty činí Pc také dobře rozpustným a zabraňují agregaci makrocyclů^{70,71,72}.

Lze využít také stechiometrického poměru 9:1. Výsledkem je pak směs prakticky pouze dvou látek A₄ a A₃B, které lze snadněji separovat, ovšem za cenu, že jsou sníženy výtěžky produktu A₃B na úkor A₄⁷³. Tento poměr může být výhodný v případě vyšší reaktivity B než A^{74,75}.

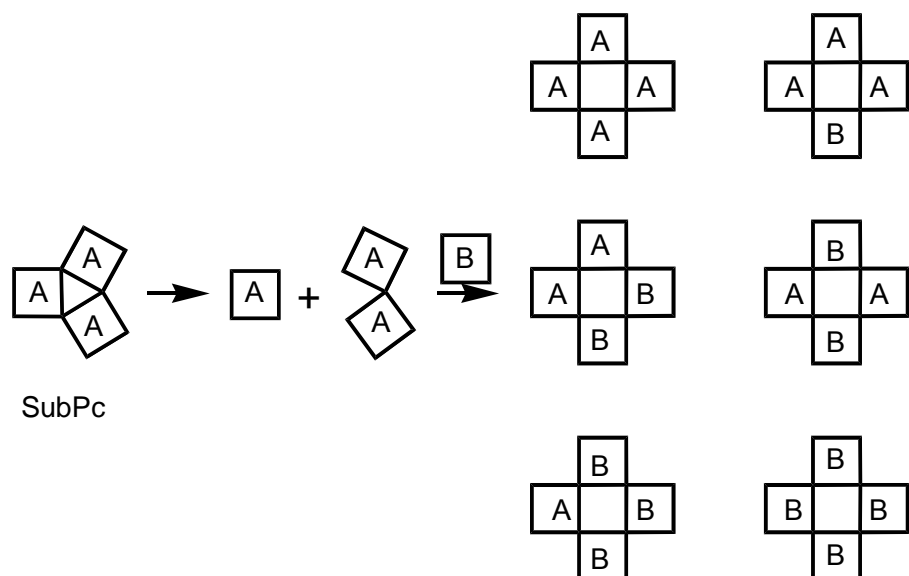
Subftalocyaninový postup

Originální metoda pro selektivní syntézu nesymetricky substituovaných Pc typu A₃B byla vyvinuta v 80. letech 20. stol. Kobayashim a kol.⁷⁶. Dochází k rozšíření kruhu subftalocyaninu (SubPc) působením sukcinimidu nebo diiminoisindolinového derivátu (obr.21). Výsledky této selektivní metody, dovolující syntézu dříve nedostupných ftalocyaninů, závisí na reakčních podmínkách a vlastnostech výchozího materiálu.



Obr.21: Expanze SubPc kruhu

V roce 1995 bylo navrženo⁷⁷, že reakce bude probíhat částečnou a nebo úplnou fragmentací subftalocyaninového kruhu s následným uzavřením fragmentů do kruhu. To ovšem vede nakonec také ke směsi všech možných ftalocyaninů obsahujících všechny kombinace diiminoisindolových jednotek přítomných jako výchozích látek (obr.22) a ztrácí se tak selektivita reakce.



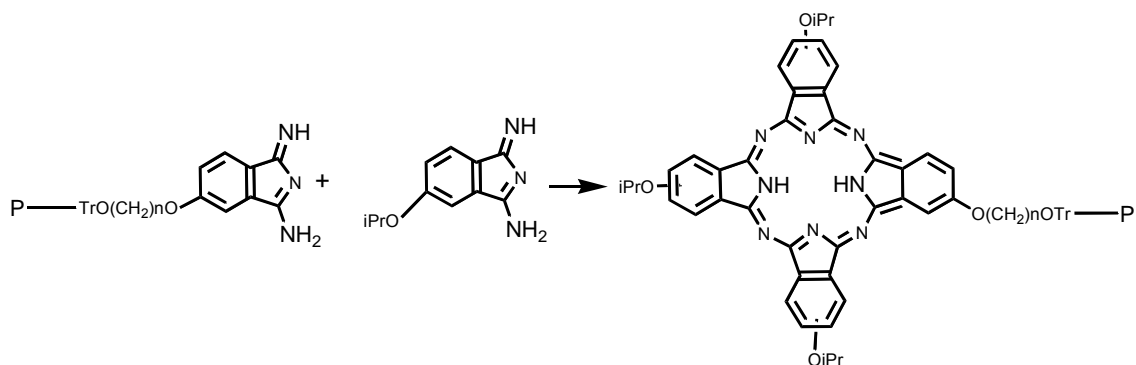
Obr.22: Fragmentace SubPc kruhu

Tato metoda byla provedena Wöhrlm a jeho spolupracovníky. Bylo prokázáno, že SubPcs mohou reagovat s méně reaktivními ftalonitrilovými deriváty v přítomnosti silnější báze jako je např. DBU. Tento způsob vede k dobrým výtěžkům A_3B ftalocyaninů⁷⁸.

Při srovnávání výtěžků stejných A_3B nesymetricky substituovaných Pcs získaných rozšířením kruhu a získaných statistickou kondenzací se zdá, že první metoda je účinnější. I přesto výtěžky obou metod jsou dosti nízké (<15 %)⁷⁹.

Metoda s využitím pevné fáze

Tento postup vyvinutý především Leznoffem je vícefázová syntéza. Tato metoda zahrnuje vazbu vhodně substituovaného ftalonitrilu (B) na polymerní nosič. Tento nerozpustný polymer-prekurzor může být pak dále podroben chemickému působení dalšího odlišně substituovaného volného ftalonitrilu (A), což dává vzniknout polymer- A_3B ftalocyaninu (obr.23). Ten může být jednoduše oddělen od A_4 makrocyklu, který může být vymyt. Důležité je, aby Pc A_4 byl dobře rozpustný a tudíž snadno odstranitelný promýváním pevné fáze. Poté je žádaný A_3B Pc uvolněn z vazby na polymer⁸⁰. Tato metoda je omezena použitím jen funkčních skupin ftalonitrilů schopných se navázat a následovně odtrhnout z polymerního nosiče. Nicméně díky expanzi technologie polymerních nosičů a jejich široké dostupnosti je tato metoda slibnou cestou k selektivní syntéze nesymetricky substituovaných A_3B Pcs⁸¹. Otázkou zůstává dále cena polymerních nosičů a tím i provádění syntéz ve větším množství.



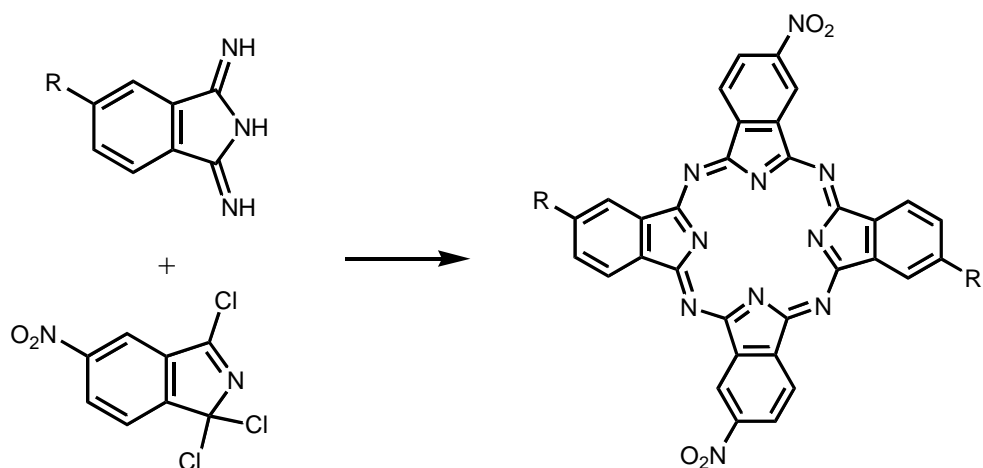
Obr.23: Syntéza Pc vázaného na polymer

4.3.2. Syntéza A₂B₂ ftalocyaninů

A₂B₂ deriváty jsou zřídka izolovány ze statistické směsi. Jsou složeny ze směsi dvou isomerů – ABAB a AABB, které vykazují podobné charakteristiky rozpustnosti a jsou často eluovány ve stejné frakci. I když v některých případech se dají i tyto izomery od sebe oddělit^{82,83}. Během posledních desetiletí se vyvíjí specifické metody pro přímou syntézu pouze jednoho ze dvou makrocyclů⁶⁸.

4.3.3. Syntéza ABAB ftalocyaninů

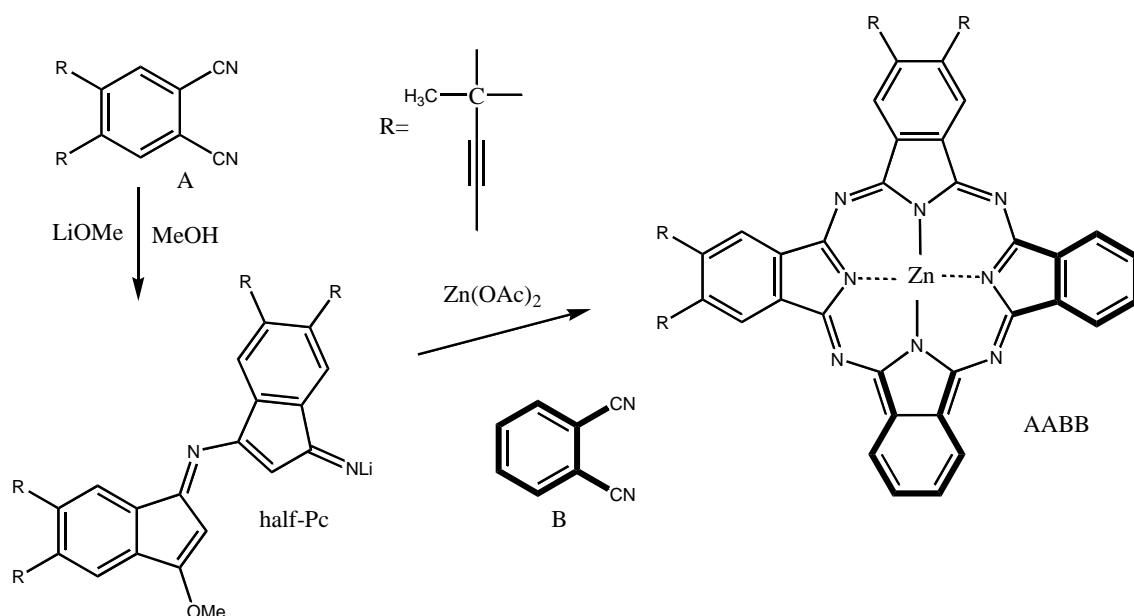
Dalším postupem použitelným k získání nesymetrických Pc je tzv. „cross coupling“ (obr. 24), což je záměrná syntéza při níž vzniká téměř pouze produkt typu ABAB (vedlejším produktem je AAAB). V tomto případě se využívá reakce substituovaného 1,3,3-trichlorisoindolu s 1,3-diiminoisoindolinem⁸⁴. Tato syntéza probíhá za velmi mírných podmínek za přítomnosti báze a redukčního činidla, přičemž výtěžek bývá poměrně vysoký (až 50 %)⁸⁵. Dalším příkladem je reakce 1,3-diiminoisoindolinu a 1*H*-isoindol-1,3(2*H*)-dithionu v molárním poměru 1:1⁸⁶, ale v tomto případě byl výsledný produkt znečištěný stopami všech ostatních ftalocyaninů.



Obr.24: Cross coupling

4.3.4. Syntéza AABB ftalocyaninů

K získání AABB izomeru (podle Leznoffa⁸⁶) se používá tzv. "half-Pc" intermediát (obr.25). Tento reaktant následně kondenzuje s "klasickým" ftalonitrilem za velmi mírných podmínek. Nevýhodou tohoto přístupu je fakt, že stabilní a izolovatelný "half-Pc" intermediát musí být substituován pouze silně elektronegativní skupinou. Další varianta jak získat pouze izomer AABB je metoda, kdy použijeme 2 stejné jednotky (např. AA) spojené "spacerem"⁸⁷.



Obr.25: Použití half-Pc intermediátu

5. Experimentální část

Teploty tání byly stanoveny na digitálním přístroji pro stanovování teplot tání Electrothermal IA9200 a nejsou korigovány.

Průběh reakcí a čistota produktů a meziproduktů byly kontrolovány tenkovrstvou chromatografií na deskách Merck Silikagel 60 F254 s detekcí UV světlem vlnové délky 254 nm a 366 nm. Vytvářecí soustavy jsou uvedeny u jednotlivých příprav. Sloupcová chromatografie byla prováděna na silikagelu Merck 60 (40-63 μm).

NMR spektra byla naměřena na přístroji Varian Mercury VxBB 300. Měření bylo prováděno při frekvenci 299,95 MHz (^1H NMR a 75,43 MHz ^{13}C NMR). Posuny jsou vztaženy k vnitřnímu standardu Si (CH_3)₄.

Spektra ve viditelné oblasti byly měřeny na přístroji Shimadzu UV 240 1 PC: UV-VIS recording spectrophotometer.

Infračervená spektra (IČ) byla měřena IČ spektrofotometrem Nicolet Impact 400 IR-Spectrometer (USA).

MALDI-TOF hmotnostní spektra byla naměřena v pozitivním módu na hmotnostním spektrometru Voyager-DE STR (Applied Biosystems, Framingham, MA, USA).

Látky připravené již dříve na Katedře farmaceutické chemie a kontroly léčiv dle publikovaných postupů:

kyselina 6-(3-chlor-5,6-dikyanpyrazin-2-ylamino)hexanová⁸⁸;

kyselina 6-(3-*terc*-butylsulfanyl-5,6-dikyanpyrazin-2-ylamino)hexanová⁸⁹;

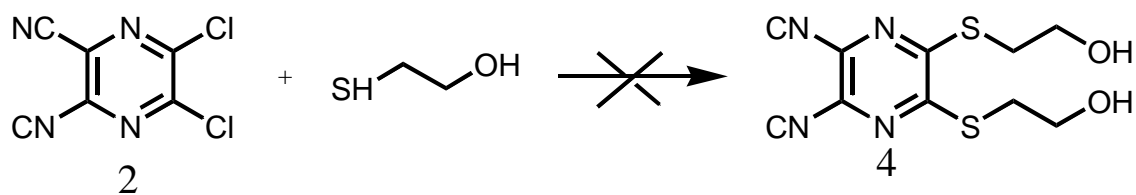
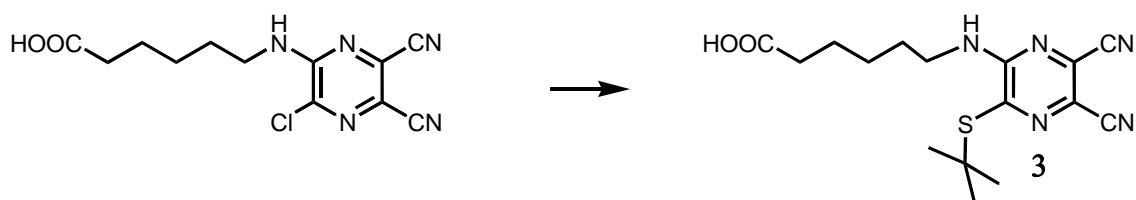
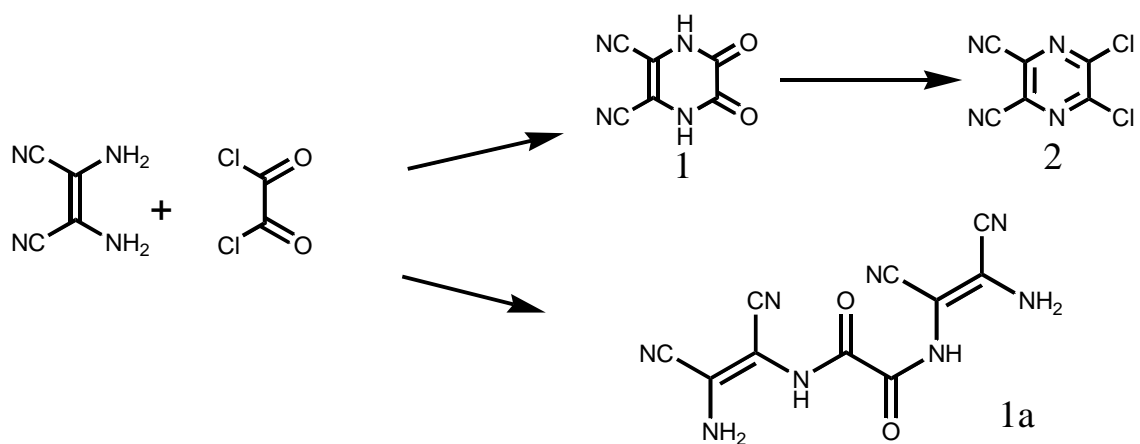
[9,10,16,17,23,24-hexakis(*terc*-butylsulfanyl)-2-(2-karboxyethylsulfanyl)-3-methyl-1,4,8,11,15,18,22,25 oktaazaftalocyaninato] zinečnatý komplex⁹⁰;

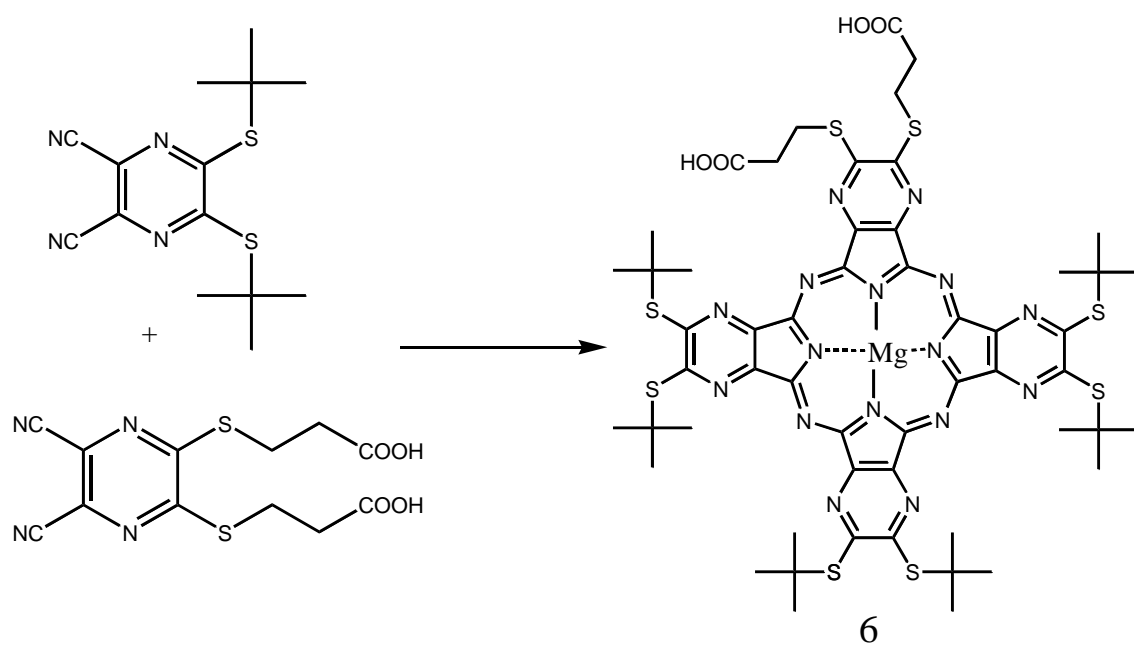
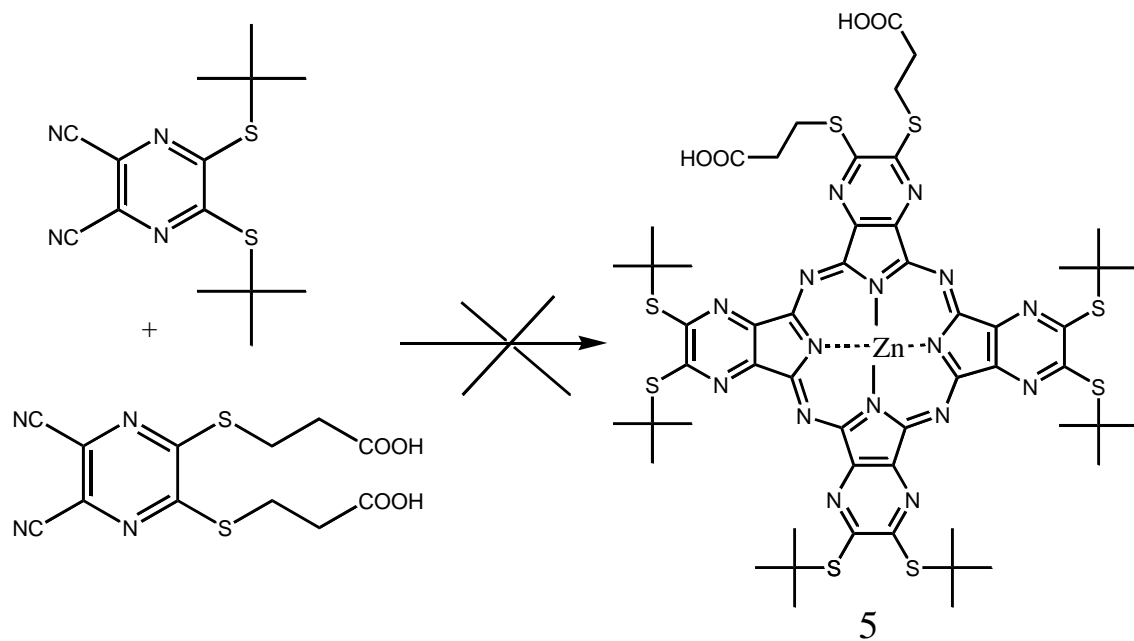
5,6-bis(2-karboxyethylsulfanyl)pyrazin-2,3-dikarbonitril⁹¹;

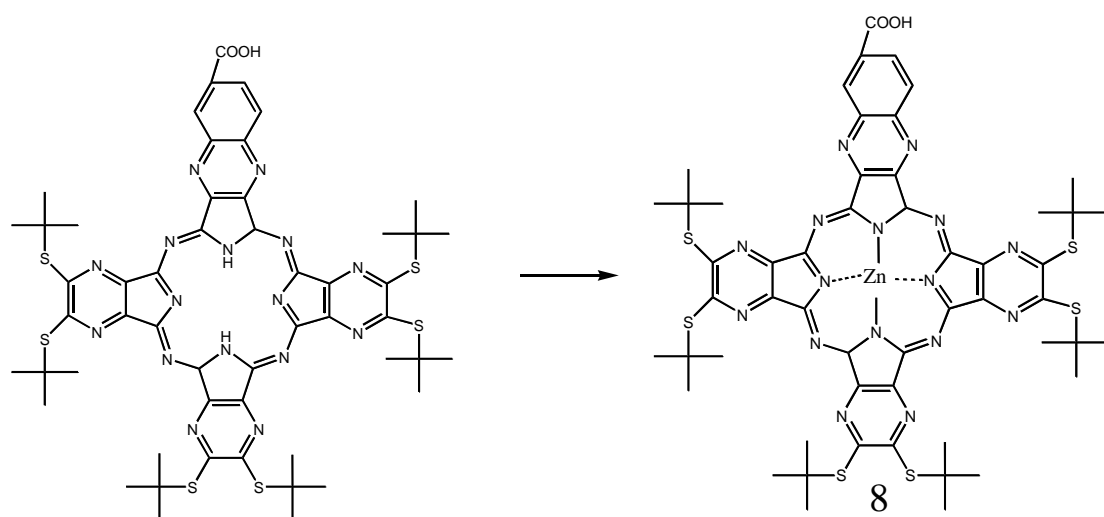
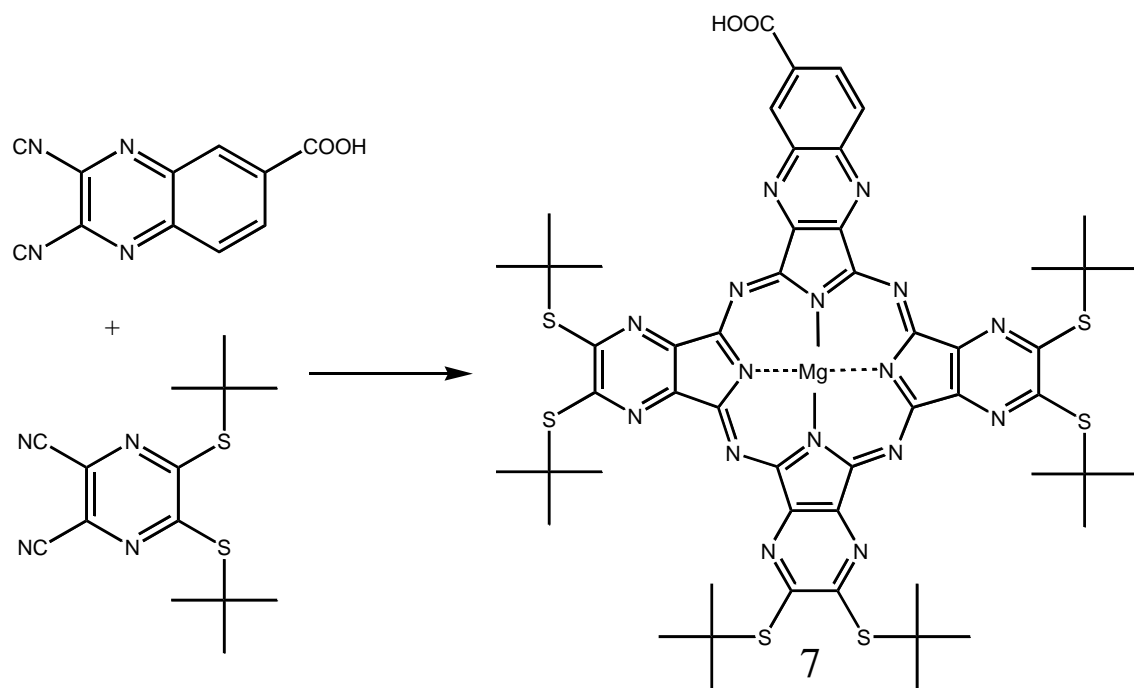
kyselina 2,3-dikyanochinoxalin-6-karboxylová⁹²

5,6-bis(*terc*-butylsulfanyl)pyrazin-2,3-dikarbonitril⁹³.

5.1. Schéma prováděných reakcí

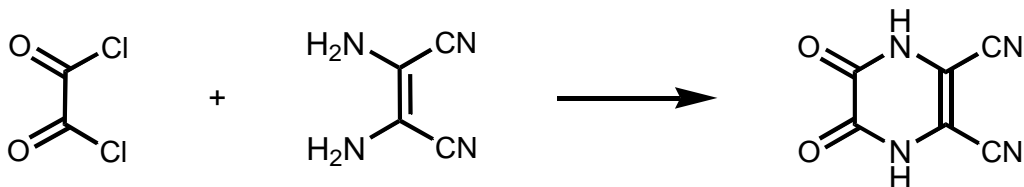






5.2. Příprava prekurzorů AzaPc

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 hodiny, teplotu jsem nezvyšovala. Po smísení obou reaktantů jsem směs míchala další 3 hodiny při pokojové teplotě. Pak jsem obsah baňky zahustila na rotační vakuové odparce a odfiltrovala. Následně jsem provedla překrystalování produktu z vody (cca 200 ml). I po zahřátí zůstávalo ve vodném roztoku velká spousta nerozpuštěné světlé látky, kterou jsem odfiltrovala. Z vodného roztoku poté vykryštoval produkt. Nerozpuštěná látka na filtru byla promyta vodou, ethanolem, acetonem a vysušena. Po NMR analýze byla identifikována jako produkt **1a**.

Látka **1**:

Sumární vzorec: C₆H₂O₂N₄

Výtěžek: 4,42 g (29 %)

Popis: nažloutlé drobné krystalky

Molekulová hmotnost: 162,0

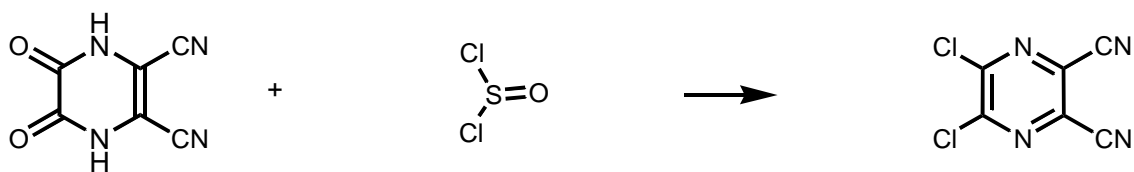
Látka **1a**: *N,N'*-bis[(*Z*)-3-amino(dinitril)but-2-en-2-yl]oxamid

¹³C NMR (DMSO-*d*₆) δ (ppm): 87,4; 113,8; 117,0; 128,3; 157,8.

¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ (ppm): 7,50 (s; 4H; NH₂); 10,10 (s; 2H; NH).

(NMR spektra odpovídají posunům publikovaným v literatuře pro tuto látku⁵⁷)

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



5,6-dioxo-1,4,5,6-tetrahydropyrazin-2,3-dikarbonitril (**1**) (4,42 g, 27 mmol) jsem pomalu sypala do směsi bezvodého dioxanu (200 ml) s thionylchloridem (11 ml, 151 mmol) a důkladně rozmíchala. Po dobu jedné hodiny jsem směs zahřívala při teplotě 60 °C pod zpětným chladičem opatřeným sušící rourkou. K suspenzi jsem přidala dimethylformamid (4 ml) a vzniklou tmavou směs jsem zahřívala dalších 90 minut. Poté jsem odpařila rozpouštědlo na vakuové rotační odparce. Vzniklý tmavý roztok jsem zbavila rozpouštědla na vakuové odparce a zbytek třikrát extrahovala 100 ml horkého toluenu. Toluenu jsem odpařila za sníženého tlaku a produkt jsem pětkrát překrystalizovala z chloroformu.

Výtěžek: 3,51 g (65 %)

Sumární vzorec: C₆H₂Cl₂N₄

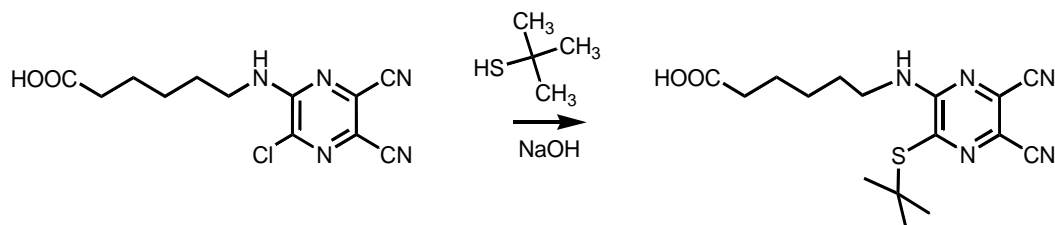
Popis: nažloutlé drobné krystalky

Molekulová hmotnost: 199,0

T. t.: 180-181 °C (lit.⁹⁴ 179-180 °C; lit.⁹⁵ 188-190 °C).

¹³C NMR (aceton-*d*₆) δ (ppm): 113,1; 131,2; 152,2.

5.2.3. Příprava 6-(3-*tert*-butylsulfanyl-5,6-dikyanpyrazin-2-ylamino)hexanové kyseliny) (3)



2,2-dimethylpropan-1-thiol (0,34 ml, 3 mmol) jsem nakapala do roztoku NaOH ($c = 1,0 \text{ M}$; $f = 1,0442$; 2,87 ml). Po 30 minutách míchání za laboratorní teploty jsem ke směsi přidala kyselinu 6-(3-chlor-5,6-dikyanpyrazin-2-ylamino)hexanovou (0,294 g; 1 mmol) rozpuštěnou v tetrahydrofuranu a míchala při pokojové teplotě. Průběh reakce jsem kontrolovala na TLC benzin:ethyl-acetát:kyselina octová (8:3:1). Reakce byla ukončena po 3 hodinách. Pak jsem přidala 1,5 ml ledové kyseliny octové, směs jsem odpařila, rozpustila v chloroformu a vytřepala s vodou. Organická fáze byla vysušena Na_2SO_4 . Organickou fází jsem pak přefiltrovala přes skládaný filtr a ten promyla chloroformem. Pak fází odpařila. Nakonec jsem provedla sloupcovou chromatografii na silikagelu, přičemž jsem použila mobilní fází benzin:ethyl-acetát:kyselina octová (8:3:1).

Výtěžek: 0,313 g (90 %)

Sumární vzorec: $\text{C}_{16}\text{H}_{21}\text{N}_5\text{O}_2\text{S}$

Popis: nažloutlé krystalky

Molekulová hmotnost: 347,4

T.t.: 116-119, (lit.⁹⁶ 117-119 °C).

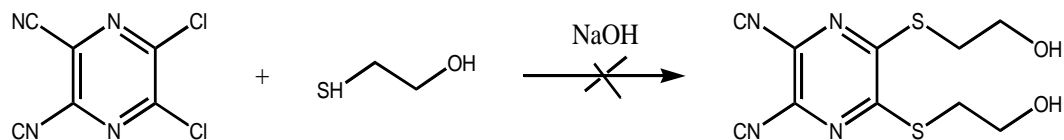
^{13}C NMR (DMSO- d_6) δ (ppm): 174,7; 150,6; 148,9; 127,1; 116,9; 115,8; 115,2; 50,9; 41,2; 33,7; 29,7; 27,7; 26,0; 24,3.

^1H NMR (DMSO- d_6) δ (ppm): 11,98 (s; 1H; COOH); 7,96 (t; 1H; $J=5,8 \text{ Hz}$;

NH); 3,44-3,23 (m; 2H; N- CH_2); 2,18 (t; 2H; $J=7,5 \text{ Hz}$; CH_2 -COOH); 1,59 (s; 9H; CH_3); 1,56-1,41 (m; 4H; CH_2); 1,32-1,17 (m; 2H; CH_2).

IČ (KBr) ν (cm^{-1}): 3375; 3338; 2970; 2934; 2229 (CN); 1705 (CO); 1565.

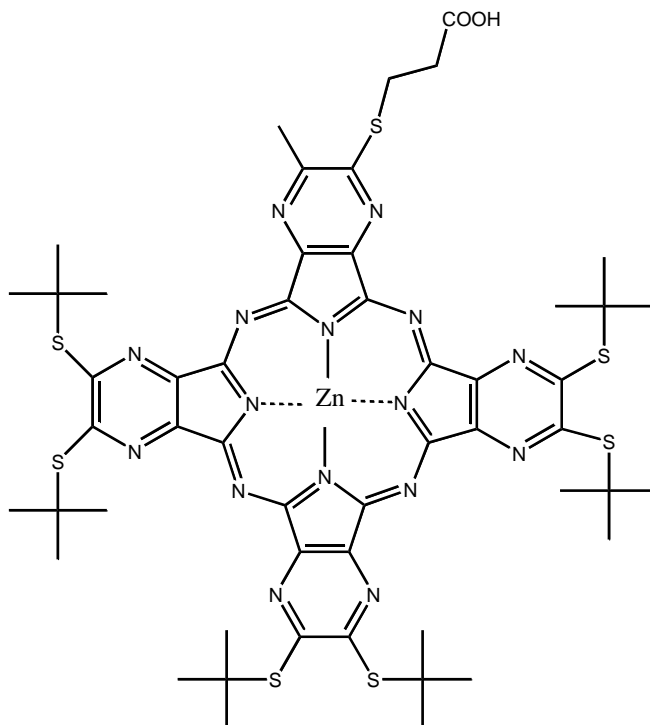
5.2.4. Příprava 5,6-bis(hydroxyethylsulfanyl)pyrazin-2,3-dikarbonitrilu (4)



2-Sulfanylethanol (1,1 mmol, 76,7 μ l) jsem smíchala s NaOH (1,0 M; $f = 1,051$; 2,1 ml). Do směsi jsem přidala 5,6-dichlorpyrazin-2,3-dikarbonitril (2) (0,5 mmol; 100 mg) předem rozpuštěný v THF. Reakce proběhla rychle. Provedla jsem detekci na TLC s mobilní fází ethyl-acetát:methanol (5:1). Detekce byla nejasná kvůli vzniklým směsím. Přidala jsem znovu směs NaOH a 2-sulfanylethanolu, ale nic se nezměnilo. Směs byla příliš komplikovaná na detekci. Ani další eluční směsi benzin:ethyl-acetát:octová kyselina (6:3:1; 5:5:1); aceton; ethyl-acetát:methanol (5:1), ethyl-acetát:octová kyselina (9:1) neumožnily rozhodnout co se v reakci děje. Reakce byla ukončena kvůli komplikovanosti vznikající směsi.

5.3. Příprava nesymetrických derivátů AzaPc

5.3.1. Izolace [9,10,16,17,23,24-hexakis(*tert*-butylsulfanyl)-2-(2-karboxyethylsulfanyl)-3-methyl-1,4,8,11,15,18,22,25-oktaazaftalocyaninato] zinečnatého komplexu



Reakce byla předem provedena na katedře farmaceutické chemie a kontroly léčiv. Mým úkolem bylo vzniklý produkt přechromatografii. Jako mobilní fáze v první koloně byl použit chloroform:aceton:methanol (15:1:1). Po izolaci požadované frakce jsem s ní provedla další dvě sloupcové chromatografie s mobilními fázemi v druhé koloně chloroform:aceton:methanol (30:1:1) a v třetí koloně chloroform:THF (2:1).

Výsledný přečištěný produkt je dobře rozpustný v chloroformu, acetonu, THF. Nerozpustný ve vodě, benzínu.

Výtěžek: 17 mg

Molekulová hmotnost: 1290,35

Sumární vzorec: C₅₆H₇₄N₁₆O₂S₇Zn

IČ (KBr) ν (cm^{-1}): 2961, 2919, 2861 (alkyl CH), 1711(C=O), 1522, 1455, 1363, 1258, 1233, 1145.

^1H NMR (pyridin- d_5) δ (ppm): 4,42 (t; 2H; $J=6,8$ Hz; S-CH₂); 3,77 (t; 2H; $J=6,7$ Hz; CH₂-COO); 2,99 (s; 3H; CH₃); 2,40-2,11 (m; 54H; SCCH₃).

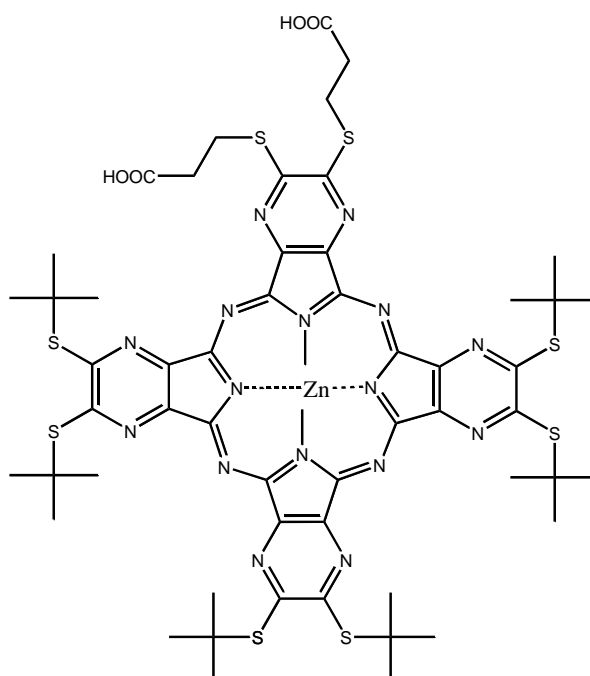
^{13}C NMR (pyridin- d_5) δ (ppm): 174,76; 159,54; 158,94; 158,89; 158,74; 158,71; 158,57; 158,15; 153,18; 151,86; 151,83; 151,76; 151,63; 151,43; 150,99; 149,00; 148,68; 145,95; 145,40; 145,23; 145,06; 145,02; 144,98; 51,44; 51,38; 51,30; 51,06; 35,09; 30,83; 30,75; 30,66; 26,64; 22,65.

MS (MALDI-TOF) m/z 1253 [M+Na⁺], 1231 [M+H⁺], 1189, 1175, 1119, 1063.

Elementární analýza. Vypočítáno pro C₅₂H₆₂N₁₆O₂S₇Zn·3H₂O: C 48,53; H 5,33; N 17,41; %. Nalezeno: C 48,26; H 5,45; N 17,10.

UV-Vis (DMF) λ_{max} (nm) (ϵ): 654 (228 300); 594 (31 000); 387 (127 200).

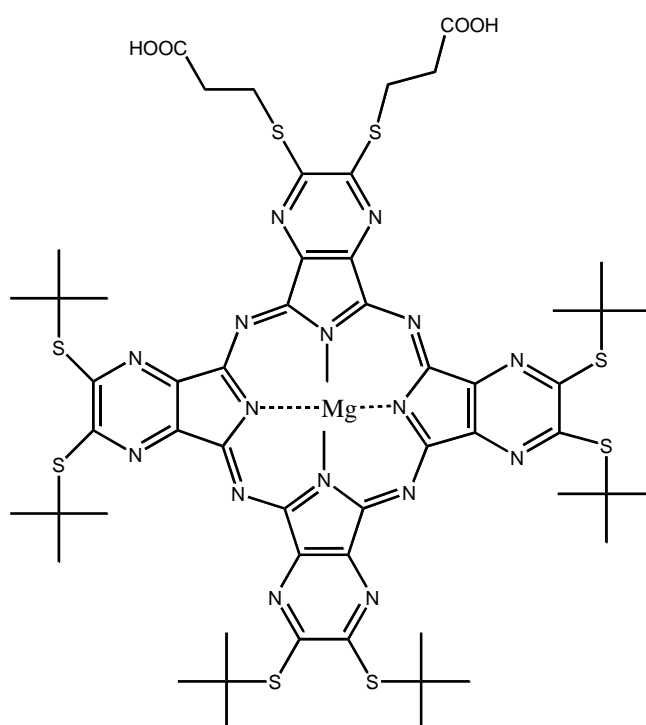
5.3.2. Příprava [9,10,16,17,23,24-hexakis(*tert*-butylsulfanyl)-2,3-bis(2-karboxyethylsulfanyl)-1,4,8,11,15,18,22,25-oktaazaftalocyaninato] zinečnatého komplexu (5)



Rozpustila jsem 5,6-bis(2-karboxyethylsulfanyl)pyrazin-2,3-dikarbonitril (30 μmol ; 0,0107 g) a octan zinečnatý (630 μmol ; 0,116 g) v 1 ml bezvodého DMF v malé

baňce. Baňku jsem zahřívala při 160 °C na olejové lázni se vzdušným chladičem, po 30 minutách a částečném ochlazení jsem přidala 5,6-bis(*tert*-butylsulfanyl)pyrazin-2,3-dikarbonitril (60 μmol; 0,0182 g). Baňku jsem dále zahřívala po dobu 2 hodin, ale reakce neproběhla.

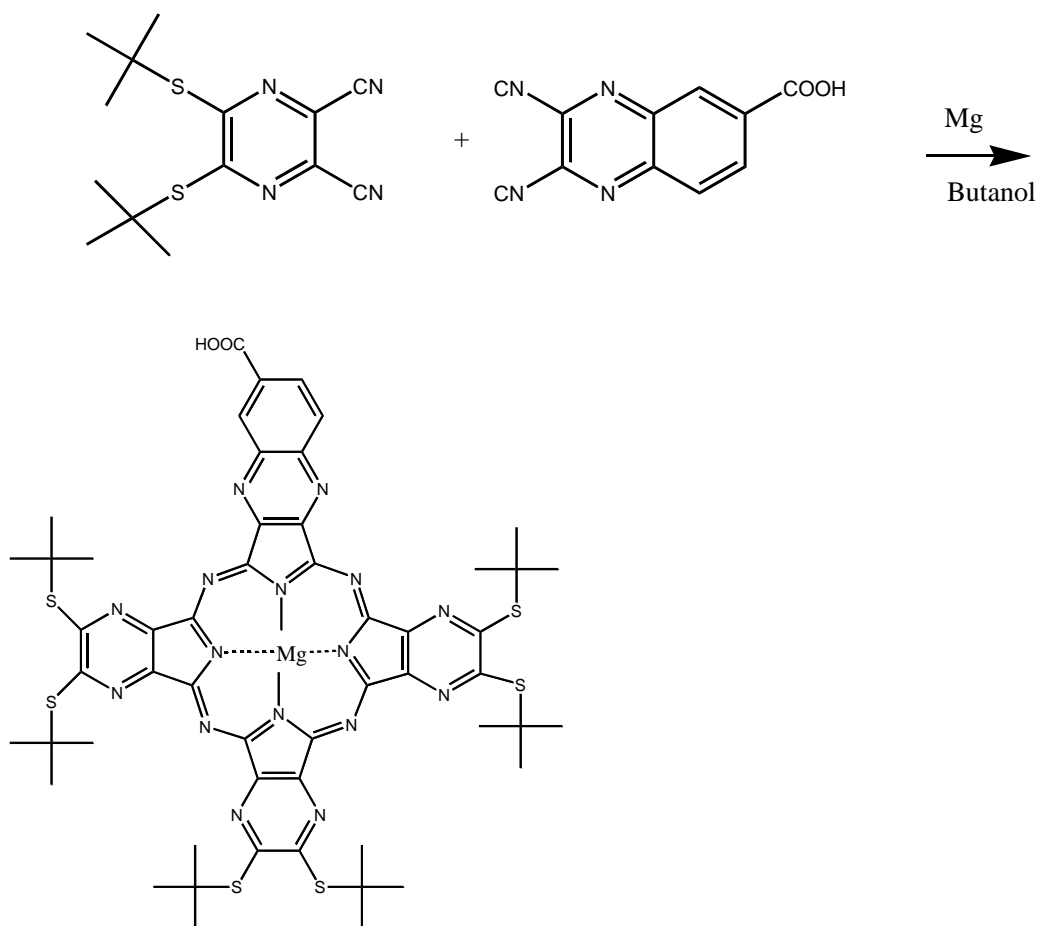
5.3.3. Příprava [9,10,16,17,23,24-hexakis(*tert*-butylsulfanyl)-2,3-bis(2-karboxyethylsulfanyl)-1,4,8,11,15,18,22,25-oktaazaftalocyaninato] hořečnatého komplexu (6)



Hořčík (617 μmol; 0,015 g) a krystalek jodu jsem zahřívala v bezvodém butanolu (2 ml) pod zpětným chladičem při teplotě 130 °C se sušící rourkou po dobu 3 hodin za vzniku butanolátu hořečnatého. Pak jsem přidala 5,6-bis(2-karboxyethylsulfanyl)pyrazin-2,3-dikarbonitril (30 μmol; 0,011 g) a zahřívala 1 hodinu, pak jsem přidala 5,6-bis(*tert*-butylsulfanyl)pyrazin-2,3-dikarbonitril (60 μmol; 0,0183 g) a zahřívala 4 hodiny. Vše probíhalo za stejných podmínek. Po ukončení reakce jsem produkt odpařila do sucha. K odpařenému produktu jsem přilila kyselinu octovou (50 % v/v, 50 ml) a nechala půl hodiny míchat. Z přebytečného butanolátu hořečnatého vznikl octan hořečnatý. Produkt jsem přefiltrovala přes skládaný filtr, vymyla vodou a

kyselinou octovou (50 % v/v, 50 ml) a nechala vyschnout. Produkt byl po rozpuštění v chloroformu analyzován na TLC s mobilní fází chloroform:aceton:methanol (15:1:2), (15:1:1), (15:1,5:1), (15:1:0,5), ale v oblasti očekávaných R_f hodnot byly jen nepatrné známky produktu.

5.3.4. Příprava 3-karboxy[2',3'-b]chinoxalino-11,12,18,19,25,26-hexakis(*tert*-butylsulfanyl)tripyrazino[g,l,q]porfyrizinato hořečnatého komplexu (7)



Hořčík (28 mmol; 0,6815 g) a krystalek jodu jsem zahřívala v bezvodém butanolu pod zpětným chladičem při teplotě 130 °C se sušící rourkou po dobu 135 minut. Pak jsem přisypala do reakce 5,6-bis(*tert*-butylsulfanyl)pyrazin-2,3-dikarbonitril (3 mmol; 0,9183 g) a 2,3-dikyanochinoxalin-6-karboxylovou kyselinu (1 mmol; 0,2242 g). A dále jsem zahřívala 3 hodiny. Pak jsem reakci ukončila. Baňku s produktem jsem odpařila.

Do ní nalila kyselinu octovou (50 % v/v, 80 ml) a nechala 30 minut míchat. Produkt jsem přefiltrovala přes skládaný filtr a promyla vodou. Nechala vyschnout. Dala jsem si stranou 0,200 g produktu. Zbytek byl dále podroben reakci na zinečnatý komplex.

0,200 g produktu jsem přečistila sloupcovou chromatografií se soustavou chloroform:aceton:methanol (15:1:3) a získala hořečnatý komplex. Získané frakce z chromatografie jsem odpařila do sucha a provedla druhé přečištění se soustavou chloroform:aceton:methanol (15:1:2).

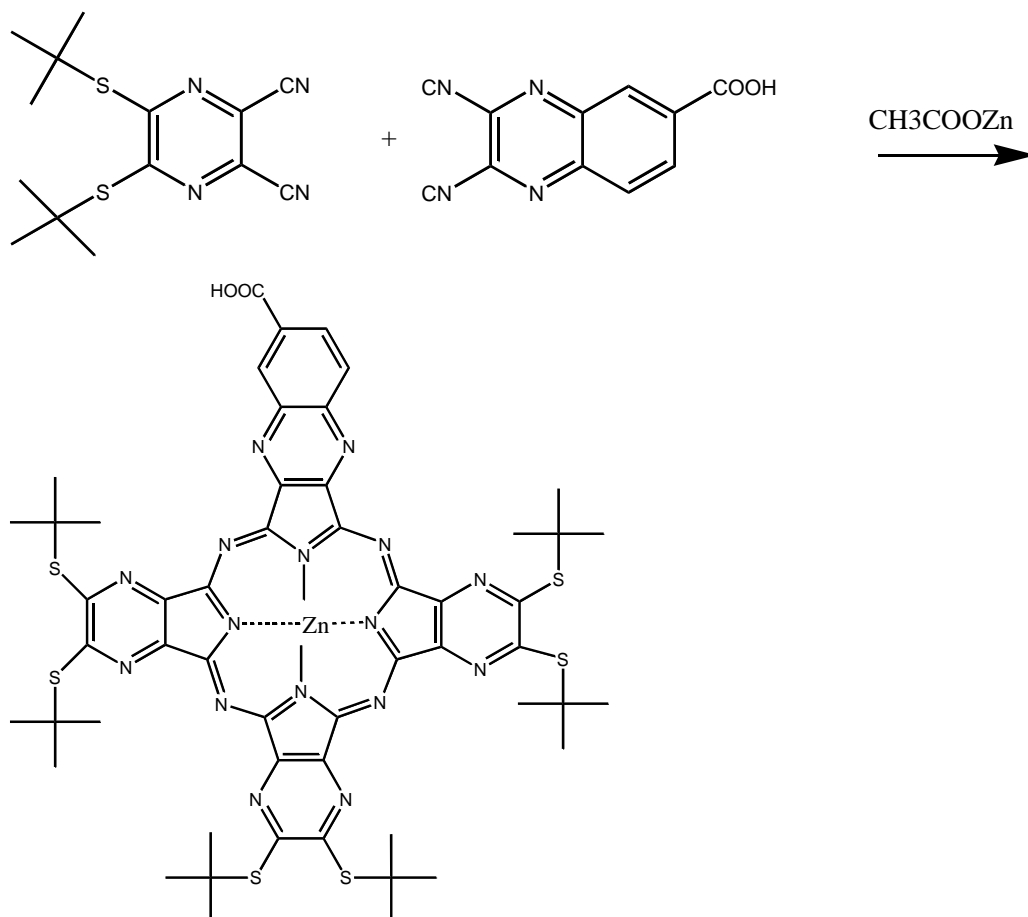
Výtěžek: 11 mg (5,2 %)

Molekulová hmotnost: 1196,38

Sumární vzorec: $C_{56}H_{64}MgN_{16}O_2S_6$

UV-Vis (THF) λ_{max} (nm): 678; 654; 626; 595; 364.

5.3.5. Příprava 3-karboxy[2',3'-b]chinoxalino-11,12,18,19,25,26-hexakis(*tert*-butylsulfanyl)tripyrazino[g,l,q]porfyrizinato zinečnatého komplexu (8)



Zbytek produktu (0,900 g) z předchozí reakce jsem rozpustila v baňce v THF a chloroformu (v poměru 1:1, v/v), a pak přidala kyselinu *p*-toluensulfonovou (26 mmol; 5,0 g) rozpuštěnou v THF a nechala míchat. Po 90 minutách jsem baňku odpařila do sucha, promyla vodou a vymyla tak zbytky kyseliny a tosylátu hořečnatého. Rozpustila v chloroformu, acetonu a toluenu, a odpařila do sucha. Pak jsem obsah baňky rozpustila v pyridinu a nechala s octanem zinečnatým (22 mmol; 4,0 g) zahřívala pod zpětným chladičem při 130 °C, 120 minut. Pak odpařila, promyla vodou a 1% HCl. Přefiltrovala jsem a nechala produkt uschnout. Provedla jsem dvě přečištění přes kolonu se soustavou chloroform:aceton:methanol (15:1:2).

Výtěžek: 27 mg (2,8 %)

Molekulová hmotnost: 1236,3

Sumární vzorec: $C_{55}H_{64}N_{16}O_2S_6Zn$

1H NMR (pyridin- d_5) δ (ppm): 9,96 (bs; 1H; aromH); 8,98 (bs; 2H; aromH); 2,28 (bs; 36H; CH_3); 2,09 (bs; 18H; CH_3).

^{13}C NMR (pyridin- d_5) δ (ppm): 51,5; 30,7; aromatické signály nedetekovatelné.

UV-Vis (DMF) λ_{max} (nm): 681; 656; 629; 598; 383.

Pro odkovený derivát:

UV-Vis (THF) λ_{max} (nm): 690; 648; 631; 588; 475; 358.

6. Diskuse

V první reakci jsem se pokoušela modifikovat reakční podmínky při přípravě základního prekursoru 5,6-dioxo-1,4,5,6-tetrahydropyrazin-2,3-dikarbonitrilu. Provedla jsem reakci oxalylchloridu s diaminomaleonitrem za pokojové teploty, oproti původním 50.°C. Změnou reakčních podmínek vznikal ovšem ve větší míře produkt *N,N'*-bis[(*Z*)-3-amino(dinitril)but-2-en-2-yl]oxamid (**1a**), který snížil výtěžek požadovaného produktu 5,6-dioxo-1,4,5,6-tetrahydropyrazin-2,3-dikarbonitrilu (**1**). Potvrdili jsme si, že původní syntéza je optimální.

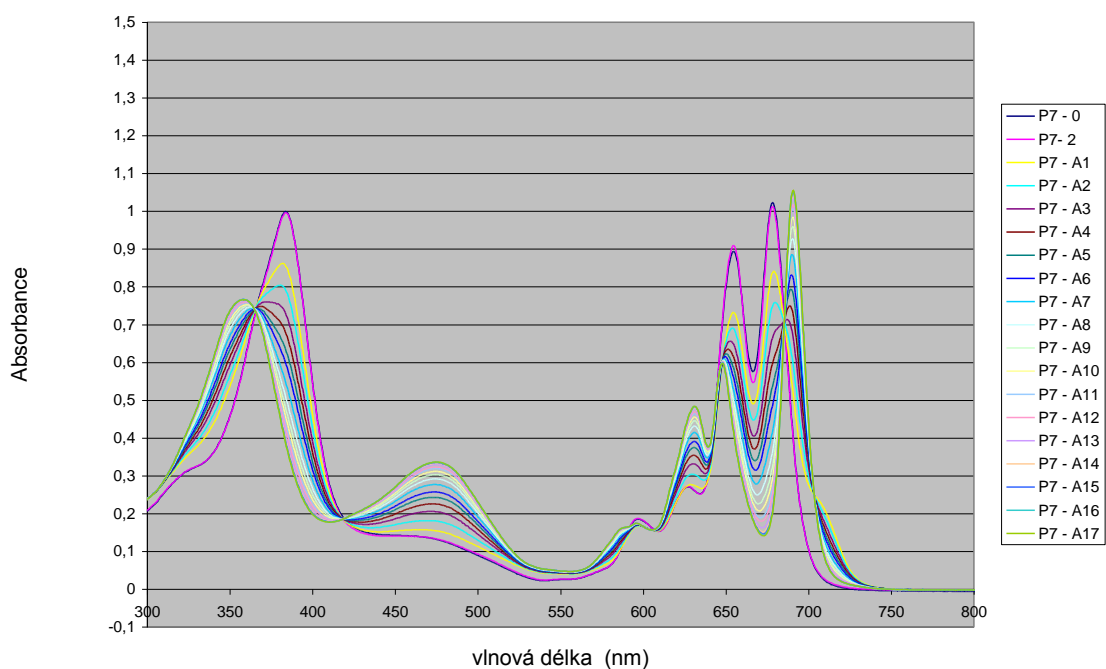
Podle již ověřených postupů jsem dále připravila výchozí látku, 5,6-dichlorpyrazin-2,3-dikarbonitril, potřebnou pro syntézu prekursorů AzaPc.

Příprava prekursoru, s hydroxylovou funkcí, vhodného pro následnou cyklizaci neprobíhala podle mých představ. Problémy se vyskytli při syntéze 5,6-bis(hydroxyethylsulfanyl)pyrazin-2,3-dikarbonitrilu (**4**). Vzniklá bílá látka nešla detekovat pomocí TLC. Pokusila jsem se upravit reakční prostředí přidáním dalšího množství hydroxidu sodného a sulfanylethanolu. Opět jsem provedla sadu TLC, ale detekce byla nejasná. Reakce byla ukončena kvůli komplikovanosti vzniklé směsi.

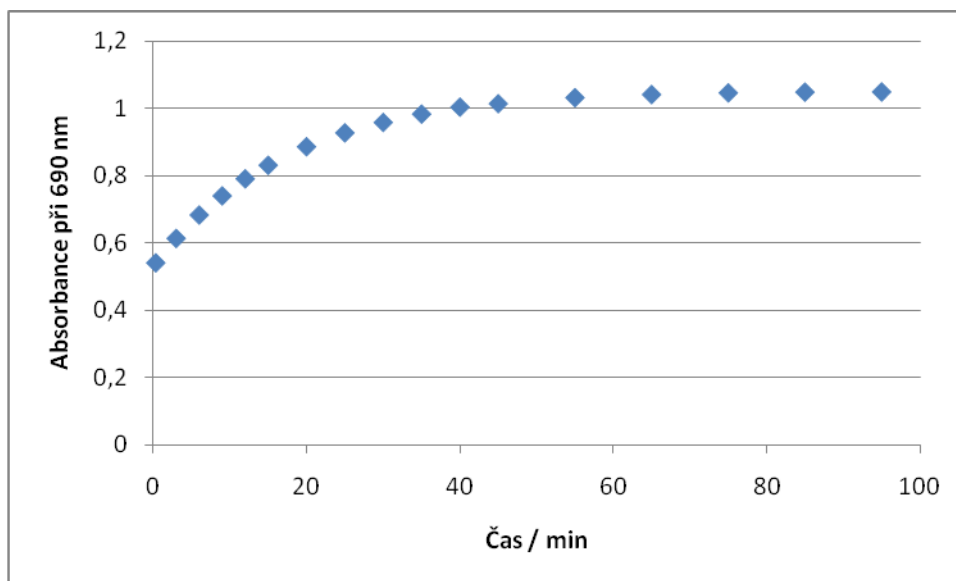
Příprava prekursoru s karboxylovou funkcí, kyseliny 6-(3-*terc*-butylsulfanyl-5,6-dikyanpyrazin-2-ylamino)hexanové (**3**), proběhla s velkým výtěžkem a bez problémů podle již dříve publikovaných postupů.

Problémy též nastaly při přípravě zinečnatého komplexu (**5**) kondenzací 5,6-bis(2-karboxyethylsulfanyl)pyrazin-2,3-dikarbonitrilu a 5,6-bis(*terc*-butylsulfanyl)pyrazin-2,3-dikarbonitrilu. Důvod neúspěchu mohl spočívat ve vlhkém octanu zinečnatém. Reakci jsem proto provedla znovu za použití reaktivnějšího butanolátu hořečnatého připraveného *in situ*. Ale v oblasti očekávaných R_f hodnot byly jen nepatrné známky hořečnatého komplexu (**6**).

Statistickou kondenzací kyseliny 2,3-dikyanochinoxalin-6-karboxylové a 5,6-bis(*tert*-butylsulfanyl)pyrazin-2,3-dikarbonitrilu vznikl hořečnatý komplex (7) a směs dalších produktů statistické kondenzace. Tato metoda poskytuje směs šesti sloučenin (AAAA, AAAB, AABB, ABAB, ABBB, BBBB). Aby reakce vedla k vytvoření co největšího množství požadovaného derivátu A₃B (7) je zapotřebí vhodný stechiometrický poměr použitých reaktantů A a B, tedy 3:1 (viz metodická část). Reakce probíhala bez větších problémů a separace na chromatografické koloně při výběru vhodné mobilní fáze probíhala velmi pěkně [chloroform:aceton:methanol (15:1:2)]. S částí produktu jsem provedla měření reakční doby potřebné k odkovení hořečnatého komplexu (viz graf 1) kyselinou *p*-toluensulfonovou. Odkovení hořečnatého komplexu je potřebné jako mezistupeň při přípravě aktivnějších zinečnatých komplexů. Z měření vyplynulo, že k úplnému odkovení stačí 90 minut (viz graf 2). Absorbance při vlnové délce 690 nm, při které byl průběh reakce monitorován, odpovídá vznikajícímu bezkovovému komplexu.



Graf 1: Změna absorpčního spektra hořečnatého komplexu při jeho odkovování kyselinou *p*-toluensulfonovou v čase (rozsah 0-90 minut).



Graf 2: Změna absorbance při vlnové délce 690 nm v závislosti na čase odkovování

Část hořečnatého komplexu (7) jsem použila na přípravu zinečnatého komplexu (8). Zinečnaté komplexy mají lepší vlastnosti-přibližně dvojnásobnou produkci singletového kyslíku než komplexy hořečnaté. Přidáním kyseliny *p*-toluensulfonové se vytěsnil centrální atom hořčíku a následnou reakcí se zinečnatými ionty vznikl žádaný komplex.

Zinečnatý komplex (8) jsem se pokusila připravit i jinou metodou. Navázila jsem do dvou baněk vždy octan zinečnatý (0,931 mmol; 0,170 g), 5,6-bis(*tert*-butylsulfanyl)pyrazin-2,3-dikarbonitril (0,1 mmol; 3,06 mg), 2,3-diisocyanochinoxalin-6-karboxylovou kyselinou (0,033 mmol; 0,74 mg). Do 1. baňky jsem přidala 1,5 ml dimethylaminoethanolu. Do 2. baňky 1,5 ml bezvodého dimethylformamidu. Obě baňky jsem zahřívala při 160 °C pod vzdušným chladičem. 1. baňku jsem po 1 hodině vyndala, reakční směs nalila do kádinky s vodou a nechala vypadnout produkt. Pak přefiltrovala přes skládaný filtr. To samé jsem učinila s 2. baňkou, ale až po třech hodinách. Filtráty jsem nechala vyschnout a produkty pak rozpustila v chloroformu. Vzniklé produkty jsme po sérii TLC nevybrali.

7. Závěr

V rámci mé diplomové práce jsem připravila:

1. podle již ověřených postupů výchozí látky pro syntézu potřebných prekurzorů. Modifikace postupu se neosvědčila.
 - 5,6-dioxo-1,4,5,6-tetrahydropyrazin-2,3-dikarbonitril
 - 5,6-dichlorpyrazin-2,3-dikarbonitril
2. prekurzor AzaPc s jednou karboxylovou funkcí
 - kyselinu 6-(3-*terc*-butylsulfanyl-5,6-dikyanpyrazin-2-ylamino)hexanovou
3. cyklizací prekurzoru 5,6-bis(*terc*-butylsulfanyl)pyrazin-2,3-dikarbonitrilu a 2,3-dikyanochinoxalin-6-karboxylové kyseliny nesymetrické AzaPc
 - 3-karboxy[2',3'-b]chinoxalino-11,12,18,19,25,26-hexakis(*terc*-butylsulfanyl)tripyrazino[g,l,q]porfyrizinato zinečnatý komplex (P7-1Zn)
 - 3-karboxy[2',3'-b]chinoxalino-11,12,18,19,25,26-hexakis(*terc*-butylsulfanyl)tripyrazino[g,l,q]porfyrizinato hořečnatý komplex (P7-1Mg)

V rámci mé diplomové práce se mi nepodařilo připravit:

1. prekurzor AzaPc
 - 5,6-bis(hydroxyethylsulfanyl)pyrazin-2,3-dikarbonitril
2. cyklizací prekurzoru 5,6-bis(*terc*-butylsulfanyl)pyrazin-2,3-dikarbonitrilu a 5,6-bis(2-karboxyethylsulfanyl)pyrazin-2,3-dikarbonitril nesymetrické AzaPc
 - [9,10,16,17,23,24-hexakis(*terc*-butylsulfanyl)-2,3-bis(2-karboxyethylsulfanyl)-1,4,8,11,15,18,22,25-oktaazaftalocyaninato] zinečnatý komplex
 - [9,10,16,17,23,24-hexakis(*terc*-butylsulfanyl)-2,3-bis(2-karboxyethylsulfanyl)-1,4,8,11,15,18,22,25-oktaazaftalocyaninato] hořečnatý komplex

8. Literatura

- ¹ Boyle R. W., Dolphin D.: *Photochem. Photobiol.* **1996**; 64; 469.
- ² Ochsner M., *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **1997**; 39; 1.
- ³ MacDonald I. J., Dougherty T. J.: *J. Porphyrins Phthalocyanines.* **2001**; 5; 105.
- ⁴ Nyman E. S., Hynninen P. H.: *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **2004**; 73; 1.
- ⁵ Graham A. et al.: *Photochem Photobiol.* **2003**; 77; 561.
- ⁶ Potter W. R. et al.: *Photochem Photobiol* **1999**; 70; 781.
- ⁷ Wilson B. C.: *Can. J. Gastroenterol.* 2002; 16; 393.
- ⁸ Kalka K. et al.: *J. Am. Acad.* **2000**; 42; 389.
- ⁹ Krutmann J., Honigsmann H.: *Hadbuch der dermatologischen Phototherapie und Photodiagnostik.* Springer – Verlag, Berlin Heidelberg New York, **1997**; 407.
- ¹⁰ Kurwa H. A., Barlow R. J.: *Clin. Exp. Dermatol.* **1999**; 24; 143.
- ¹¹ Allison R. R. et al.: *Semin. Cutan. Med. Surg.* **1998**; 17; 153.
- ¹² Bonnett R., Berenbaum M.: *Porphyrins as photosensitizers. Ciba Found. Symp.* **1989**; 146; 40.
- ¹³ Dougherty T. J. et al. Historical perspectiv. In: Henderson B. W., Dougherty T. J., editors. *Photodynamic therapy.* Marcel Dekker, New York; **1992**; 1.
- ¹⁴ Fritsch C. et al.: *Arch. Dermatol.* **1998**; 134; 207.
- ¹⁵ Ackroyd R. et al.: *Photochem. Photobiol.* **2001**; 74; 656.
- ¹⁶ Dougherty T. J. et al.: *Natl. Cancer Inst.* **1975**; 55; 115.
- ¹⁷ Schwartz S. K. et al.: *Univ. Minn. Med. Bull.* **1955**; 27; 7.
- ¹⁸ Henderson B. W., Dougherty T. J.: *Photochem. Photobiol.* **1992**; 55; 145.
- ¹⁹ Sharman W. M. et al.: *Methods Enzymol.* **2000**; 319; 376.
- ²⁰ Jory D., Spikes J. D.: *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **1990**, 6, 93.
- ²¹ Sternberg E. D. et al.: *Tetrahedron.* **1998**; 54; 4151.
- ²² Foote C. S.: *Photochem. Photobiol.* **1991**; 54; 659.
- ²³ Patterson M. S. et al.: *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **1990**; 5; 69.
- ²⁴ Zimčík P., Miletín M.: *Čes. Slov. Farm.* **2004**; 53, 219.
- ²⁵ Castano A. P. et al.: *Photodiagn. Photodyn. Ther.* **2004**; 1; 279.
- ²⁶ Sharman W. M. et al.: *Methods Enzymol.* **2000**; 319; 376.
- ²⁷ Moan J., Berg K.: *Photochem. Photobiol.* **1991**; 53; 549.
- ²⁸ Konan Y. N. et al.: *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **2002**; 66; 89.
- ²⁹ Stewart F. et al.: *Radiother. Oncol.* **1998**; 48; 233.
- ³⁰ Zimčík P., Miletín M.: *Čes. Slov. Farm.* **2004**; 53; 272.
- ³¹ Bertolini G.: *Microbios.* **1999**; 71; 33.
- ³² Bertolini G.: *Laser Life Sci.* **1993**; 5; 267.
- ³³ Hamblin M. R., Hasan T.: *Photochem. Photobiol. Sci.* **2004**; 3; 436.
- ³⁴ Zimčík P., Miletín M.: *Čes. Slov. Farm.* **2004**; 53; 271.
- ³⁵ Fingar V. H. et al.: *Photochem. Photobiol.* **1993**; 58; 251.
- ³⁶ Boyle R. et al.: *Br. J. Cancer,* **1992**; 65; 813.
- ³⁷ Detty M. R. et al.: *J. Med. Chem.* **2004**; 47; 3897.
- ³⁸ Szeimies R. M. et al.: *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **1996**; 34; 67.
- ³⁹ Kral V., et al.: *J. Med. Chem.* **2002**; 45; 1073.
- ⁴⁰ Agostinis P. et al.: *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* **2002**; 34; 221.
- ⁴¹ Wainwright M., Crossley K. B.: *J. Chemother.* **2002**; 14; 431.
- ⁴² Phoenix D. A., Harris F.: *Trends Mol. Med.* **2003**; 9; 283.

-
- ⁴³ Jori G., Brown S. B.: *Photochem. Photobiol. Sci.* **2004**; 3; 403.
- ⁴⁴ Bonnet R., Martínez G.: *Tetrahedron*. **2001**; 57; 9513
- ⁴⁵ Česká vitreoretinální společnost [online]. **2006** [cit. 2008-04-01]. Dostupné z: <http://www.cvrs.cz/vpmd-sekce02.php>
- ⁴⁶ Brancalion L., Moseley H.: *Lasers Med. Sci.* **2002**; 17; 173.
- ⁴⁷ Boyle D. G., Potter W. R.: *Photochem. Photobiol.* **1987**; 46; 997.
- ⁴⁸ Svaasand L. O.: *Prog. Clin. Biol. Res.* **1984**; 170; 91.
- ⁴⁹ Wilson B. C. et al.: *Photochem. Photobiol.* **1985**; 42; 153.
- ⁵⁰ Firey P. A., Rodgers M. A.: *Photochem. Photobiol.* **1987**; 45; 535.
- ⁵¹ van Leengoed H. L. et al.: *Br. J. Cancer*. **1993**; 67; 898.
- ⁵² Dougherty T. J., Potter W. R.: *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **1991**; 8; 223.
- ⁵³ Spikes J. D., Bommer J. C.: *Photochem. Photobiol.* **1993**; 58; 346.
- ⁵⁴ Boyle D. G., Potter W. R.: *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **1987**; 46; 997.
- ⁵⁵ Laser Partner [online] 2004.. Dostupné z: <http://www.laserpartner.cz/lasp/web/cz/2000/0015.htm>
- ⁵⁶ Kanakarajan K., Czarnik A. W.: *J. Org. Chem.* **1986**; 51; 5241.
- ⁵⁷ Mørkved E. H. et al.: *Acta. Chem. Scand.* **1996**; 50; 1153.
- ⁵⁸ Klein B., Berkowitz J.: *J. Am. Chem. Soc.* **1959**; 81; 5160.
- ⁵⁹ Červinka O. et al.: *Chemie organických sloučenin , 1. díl, 1.vydání, SNTL, Praha, 1985*; 669.
- ⁶⁰ Foks H., Manowska W.: *Acta Pol. Pharm.* **1976**; 33; 687.
- ⁶¹ Haider N. et al.: *Pharmazie*. **1994**; 49; 575.
- ⁶² Banks C. K.: *J. Am. Chem. Soc.* **1944**; 66; 127.
- ⁶³ Kopecky K. et al.: *Dyes Pigment*. **2008**; 78; 231
- ⁶⁴ Asai M.: *Yakugaku Zasshi*. **1961**; 81; 1475.
- ⁶⁵ Foks H. et al.: *Pol. J. Pharmacol. Pharm.* **1977**; 29; 663.
- ⁶⁶ Mørkved E. H. et al.: *Acta Chem. Scand.* **1999**; 1117; 53.
- ⁶⁷ Zimcik P. et al.: *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* **2004**; 163; 21
- ⁶⁸ La Torre G. et al.: *Eur. J. Org. Chem.* **2000**; 2821.
- ⁶⁹ Aoudia M. et al.: *J. Am. Chem. Soc.* **1997**; 119; 602926039.
- ⁷⁰ Clarkson G. J. et al.: *J. Chem. Soc., Perkin Trans.* **1995**; 1; 181721823.
- ⁷¹ Treacher K. E. et al.: *Mol. Cryst., Liq. Cryst.* **1995**; 260; 2552260.
- ⁷² Ali-Adib Z. et al.: *Macromolecules*. **1996**; 29; 9132917.
- ⁷³ McKeown N. B. et al.: *J. Chem. Soc., Perkin Trans.* **1990**; 1; 116921177.
- ⁷⁴ Kimura-Suda H., Sasabe J.: *Mater. Chem.* **1997**; 7; 8612863.
- ⁷⁵ La Torre G., Torres T.: *J. Porphyrins Phthalocyanines*. **1997**; 1; 2212226.
- ⁷⁶ Kobayashi N. et al.: *J. Am. Chem. Soc.* **1990**; 112; 964029641.
- ⁷⁷ Sastre A. et al.: *Tetrahedron Lett.* **1995**; 36; 850128504.
- ⁷⁸ Weitemeyer A. et al.: *J. Org. Chem.* **1996**; 60; 490024904.
- ⁷⁹ Sastre A. et al.: *J. Org. Chem.* **1996**; 859128597.
- ⁸⁰ Leznoff C.C., Hall T.W.: *Tetrahedron Lett.* **1982**; 23; 302323026.
- ⁸¹ Idelson E. M., U.S. Patent 4,061,654, 1977: *Chem. Abstr.* **1977**; 88; 171797.
- ⁸² Musil Z. et al.: *Eur. J. Org. Chem.* **2007**; 27; 4535.
- ⁸³ Zimcik P. et al.: *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* **2006**; 183; 59.
- ⁸⁴ Leznoff C. C. et al.: *Chem. Commun.* **1996**; 1245.
- ⁸⁵ Dabak S., Bekaroglu O.: *New J. Chem.* **1997**; 21; 267.
- ⁸⁶ Leznoff C. C. et al.: *Can. J. Chem.* **1987**; 65; 170521713.
- ⁸⁷ Torre G. et al.: *Eur. J. Org. Chem.* **2000**; 16; 2821.
- ⁸⁸ Zimcik P. et al.: *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* **2003**; 155; 127.

-
- ⁸⁹ Musil Z. et al.: *J. Porphyrins Phthalocyanines*. **2006**; 10; 122.
- ⁹⁰ Zimcik P. et al.: *Dyes Pigment*. **2008**; 77; 281.
- ⁹¹ Kopecký K.: Diplomová práce, Syntéza potenciálních fotodynamicky aktivních látek typu dusíkatých analogů ftalocyaninů II, Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická Fakulta v Hradci Králové, **2004**.
- ⁹² Rothkopf H. W. et al.: *Chem. Ber.* **1975**; 108; 875.
- ⁹³ Kostka M. et al.: *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* **2006**; 178; 16.
- ⁹⁴ Suzuki T. et al.: *Heterocycl. Chem.* **1986**; 23; 1419.
- ⁹⁵ Mørkved E. H. et al.: *Acta Chem. Scand.* **1996**; 50; 1155.
- ⁹⁶ Musil Z. et al.: *J. Porphyrins Phthalocyanines*. **2006**; 1; 122.