

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

# **Potenciální fotodynamicky aktivní látky charakteru dusíkatých makrocyclů**

*Disertační práce*

**Mgr. Miroslav Kostka**

Hradec Králové 2006

## *Poděkování*

Poděkování na tomto místě patří mému školiteli doc. RNDr. Jiřímu Hartlovi, CSc. za všestrannou podporu při celém mém počínání v laboratoři.

Školitel specialista PharmDr. Miroslav Miletín, Ph.D. zasluhuje velký dík, neboť bez jeho rad, odborného dohledu a usměrnění mých myšlenek by tato práce asi nevznikla. Další člen týmu Petr Zimčík, Ph.D. byl mi vždy ochoten pomoci, poradit a korigovat mé psané závěry.

Za spolupráci v laboratoři děkuji PharmDr. Janu Poncovi, PharmDr. Markétě Vaňkové.

Dále děkuji paní Věnceslavě Hronové a Drahomíře Karlíčkové za měření CHN analýz a paní Jitce Žížkové za změření IČ spekter.

Poděkování věnuji taktéž mé rodině a mým přátelům, kteří byli mou podporou v dalším úsilí a aniž si toho všimli.

# OBSAH

1. SEZNAM ZKRATEK .....	5
2. TEORETICKÁ ČÁST .....	6
2.1. ÚVOD.....	6
2.2. HISTORIE PDT.....	6
2.3. PRINCIP PDT.....	8
2.4. BIOLOGICKÁ ODPOVĚĎ.....	11
2.4.1. <i>Přímý efekt</i> .....	11
2.4.2. <i>Změny v cévním zásobení</i> .....	12
2.4.3. <i>Imunitní systém</i> .....	12
2.5. FOTOSENZITIZÉRY.....	13
2.5.1. <i>Vlastnosti ideálního fotosenzitizéru</i> .....	13
2.5.2. <i>„Photobleaching“</i> .....	14
2.6. TYPY FOTOSENZITIZÉRŮ.....	14
2.6.1. <i>PS s porfyrinovým chromoforem</i> .....	16
2.6.2. <i>PS s částečně redukováným porfyrinovým chromoforem</i> .....	18
2.6.3. <i>Syntetická barviva</i> .....	20
2.6.4. <i>Další fotosenzitizéry</i> .....	21
2.7. ZLEPŠENÍ BIODISTRIBUCE PS.....	22
2.7.1. <i>Pasivně cílená biodistribuce</i> .....	23
2.7.2. <i>Dlouhocirkulující systémy</i> .....	23
2.7.3. <i>Aktivně cílená biodistribuce</i> .....	24
3. CÍL PRÁCE.....	26
4. METODICKÁ ČÁST.....	27
4.1. SYNTÉZA FTALOCYANINŮ.....	27
4.2. MĚŘENÍ PRODUKCE SINGLETOVÉHO KYSLÍKU.....	30
5. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	32
5.1. OBECNÉ VLASTNOSTI FTALOCYANINŮ.....	32
5.2. VÝSLEDKY A DISKUSE.....	33
5.2.1. <i>Syntéza ftalocyaninů s axiálními substituenty na centrálním atomu             křemíku a hliníku</i> .....	33
5.2.2. <i>Syntéza oktasubstituovaných ftalocyaninů s centrálním atomem             zinku a hořčíku</i> .....	36

5.2.3. <i>Vliv periferních substituentů na agregaci</i> .....	38
5.3. PRAKTICKÁ ČÁST.....	39
5.3.1. <i>Syntetická část</i> .....	39
5.3.2. <i>Měření produkce singletového kyslíku</i> .....	45
6. <b>SOUHRN</b> .....	47
7. <b>SUMMARY</b> .....	49
8. <b>SEZNAM PUBLIKOVANÝCH PRACÍ</b> .....	50
9. <b>LITERATURA</b> .....	51
10. <b>PŘÍLOHA č.1</b> .....	55
11. <b>PŘÍLOHA č.2</b> .....	66

## 1. SEZNAM ZKRATEK

ALA	kyselina 5-aminolevulinová
AMD	„age-related macular degeneration“, senilní makulární degenerace
DBU	1,8-diazabicyklo[5,4,0]undec-7-en
DCM	dichlormethan
DMF	N,N-dimethylformamid
DMSO	dimethylsulfoxid
DPBF	1,3-difenylisobenzofuran
HpD	„hematoporphyrin derivative“
ISC	„intersystem crossing“
LDL	„low-density lipoproteins“
MAb	„monoclonal antibody“
Pc	ftalocyanin
PDT	„photodynamic therapy“
PpIX	protoporfyrin IX
PS	fotosenzitizér
PUVA	léčba pomocí psoralenů aktivovaných UV A světlem
ROS	„reactive oxygen species“
THF	tetrahydrofuran

## 2. TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1. ÚVOD

Fotodynamická terapie (angl. photodynamic therapy, PDT) je slibná metoda léčby několika onemocnění, především nádorových. Nejedná se o žádnou novinku, využití světla a fotosenzitivní látek je znám již stovky let, historicky první zmínění bychom našli u starých Egypťanů, Řeků, Indů a Číňanů (např. rostlinné extrakty obsahující furokumariny sloužily k léčbě vitiliga)<sup>1</sup>. Větší rozvoj však nastal až počátkem 20.století zásluhou lékaře Finsena, který popsal úspěšnou léčbu kožní formy tuberkulózy pomocí ultrafialového světla<sup>2</sup>, za což mu byla roku 1903 udělena Nobelova cena. Léčba byla nazvána fototerapií, protože využívá pouze světlo. Jinou metodu vystihuje název fotochemoterapie, která využívá vlastností fotosenzitizující sloučeniny („fotosenzitizér“, z angl. photosensitiser (PS)) po ozáření. Uplatnění této kombinace nalezneme při léčbě vitiliga<sup>3</sup> a lupénky (PUVA terapie)<sup>1</sup>. PDT je v podstatě podskupinou fotochemoterapie, avšak s tím rozdílem, že pro účinek je nezbytně nutná přítomnost kyslíku. Principem je předání energie absorbované PS molekulárnímu kyslíku, z něhož vytváří vysoce reaktivní formy kyslíku (angl. reactive oxygen species, ROS) jako např. volné radikály a singletový kyslík. Reakcí okolních biomolekul s ROS dochází ke ztrátě jejich buněčných funkcí a následně k likvidaci buňky<sup>4</sup>.

PS blízke jsou fluorescenční sloučeniny bez destrukčního vlivu na tkáň, jejich silná fluorescence a zvýšená kumulace v nádorových tkáních je řadí k látkám vhodných pro fotodiagnostiku<sup>5</sup>.

### 2.2. HISTORIE PDT

První pozorování PDT se datuje rokem 1900 a svou roli sehrála náhoda. Student medicíny Oscar Raab prováděl experiment vlivu akridinu na prvoky rodu *Paramecium*, světelné efekty během silné bouře byly dostačujícím impulsem pro aktivaci PS, který měl letální následky na protozoa<sup>6</sup>. V témže roce zjistil francouzský neurolog Prime, že po perorální aplikaci eosinu, jež používal pro léčbu epilepsie, se na těle takto léčených pacientů objevila dermatitida na místech exponovaných slunečnímu záření<sup>7</sup>.

Roku 1903, jako reakci na předchozí dvě události, provedli von Tappeiner a dermatolog Jesionek pokus s topickou aplikací eosinu a světla při léčbě nádoru kůže<sup>8</sup>. Od roku 1907 je znám pojem „fotodynamický efekt“, který zavedl von Tappeiner, když zjistil, že pro účinný

efekt je nezbytný také kyslík<sup>9</sup>. Ve stejném roce se zásluhou Hausmanna dostaly do popředí zájmu porfyriny. Hausmann pozoroval kožní reakce u myší, kterým podal hematoporfyrin a poté vystavil světlu. Podobným pokusům neunikli prvoci rodu *Paramecium* ani červené krvinky, které usmrtil kombinací chlorofylu a světla<sup>10</sup>. První experiment na lidech provedl roku 1913 Meyer-Betz sám na sobě, kdy si injekčně aplikoval 200 mg hematoporfyrinu a následně zaznamenal silné svědění a bolest v místech, jež byla vystavena světlu<sup>11</sup>. Schopnost kumulace porfyrinů v nádoru poprvé popisuje Policard v roce 1924 po pozorování fluorescence přírodních porfyrinů v nádorech<sup>11</sup>.

V roce 1960 připravili Lipson a Baldes z hematoporfyrinu jeho derivát (angl. hematoporphyrin derivative, HpD), jež se vyznačoval daleko vyšší účinností. Přípravou však vzniká směs mono-, di- a oligomerů, kterou nelze prakticky separovat. Přesto se po částečném vyčištění stává tato směs základem pro v současné době nejrozšířenější fotosensitizer – sodnou sůl porfimeru (pod obchodním názvem Photofrin<sup>®</sup>)<sup>12</sup>.

O cílené léčbě nádorů pomocí PS lze hovořit od roku 1972, kdy Diamond a kolektiv dokázali úspěšně léčit gliom kryš<sup>13</sup>. Testy *in vitro* vykazaly 100 % usmrcení nádorových buněk. U kryš se stejným typem nádorových buněk však došlo pouze k zastavení jejich růstu asi na 10–20 dní.

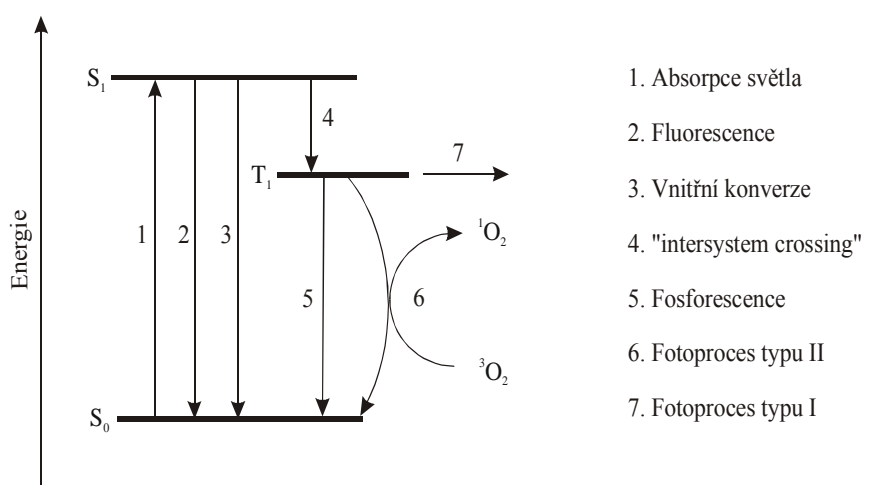
Rok 1975 se zapsal úspěchem Doughertyho kolektivu, jejich kombinace HpD a červeného světla vyléčila nádor prsních žláz u myší<sup>14</sup>. V tom samém roce Kellyho kolektiv provedl podobně úspěšné pokusy u myší s transplantovanými buňkami lidského nádoru močového měchýře<sup>15</sup>.

Následovaly humánní pokusy, první pozitivní výsledek zveřejnil Kelly, kdy se mu podařilo vyléčit nádor močového měchýře u pacienta, u něhož ostatní způsoby léčby (radioterapie, chemoterapie, transuretrální resekce) selhaly<sup>16</sup>. První rozsáhlejší studii s 25 pacienty s celkem 113 primárními i sekundárními nádory kůže přinesl Dougherty. Z těchto 113 ložisek se 98 zhojilo úplně, u 13 byla pozorována pouze částečná odpověď a 2 se ukázala být k léčbě rezistentní<sup>17</sup>. V Kanadě je od roku 1993 zavedena sodná sůl HpD (Photofrin<sup>®</sup>) do klinické praxe k terapii nádoru močového měchýře. Po sérii těchto úspěchů se rozběhly další studie na užití PDT nejen k léčbě nádorů kůže a močového měchýře, ale i plic<sup>18</sup>, jícnu<sup>19</sup>, konečníku<sup>20</sup>.

## 2.3. PRINCIP PDT

Základním mechanismem fotodynamické terapie je aktivace fotosenzitizeru světlem vhodné vlnové délky a následná produkce singletového kyslíku, který zničí okolní tkáň. Vlnová délka světla rozhoduje o hloubce průniku tkáněmi, při nižších vlnových délkách dochází k pohlcování světla endogenními chromofory (hemoglobin), průnik se omezuje do hloubky několika milimetrů a zasažená oblast je malá. Optimální vlnové délky se nacházejí v rozmezí 680–800 nm, vyšší hodnoty nad 800 nm již nemusí stačit k aktivaci PS z důvodu nižší energie záření.

Po absorpci kvanta záření vhodné vlnové délky se PS excituje ze základního singletového stavu ( $S_0$ ) do excitovaného stavu ( $S_1$ ), který trvá velmi krátce (jednotky nanosekund)<sup>4</sup> a tudíž se nepředpokládá jeho významnější vliv na fotodynamickou aktivitu PS. Návrat z energeticky bohatšího stavu PS do základního se může uskutečnit několika způsoby<sup>21</sup> zobrazených na modifikovaném Jablonského diagramu (obr.1). Proces fluorescence je zcela bez účinku na buňky, zatímco při vnitřní konverzi nelze vyloučit podíl na cytotoxickém účinku vlivem lokálně zvýšené teploty<sup>22</sup>.



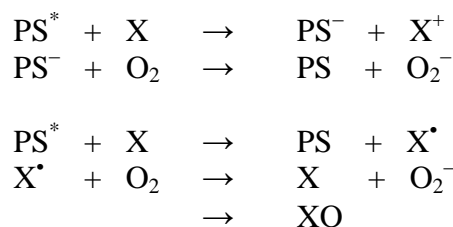
Obr. 1 Modifikovaný Jablonského diagram

Mnohem významnější je mezisystémový přechod (angl. „intersystem crossing“ (ISC)), kterým se PS dostane do svého tripletového stavu ( $T_1$ ), přičemž dochází k inverzi spinu jednoho elektronu (přechod „spinem-zakázaný“). V případě dobrého PS je tento jev vysoce pravděpodobný. Následný přechod  $T_1 \rightarrow S_0$  je taktéž „spinem-zakázaný“, z toho plyne, že stav  $T_1$  trvá poměrně dlouho pro interakci s okolím (mikro až milisekundy). Množství PS přecházejícího po aktivaci do stavu  $T_1$  („triplet state quantum yield“ ( $\Phi_T$ )) a doba, po kterou

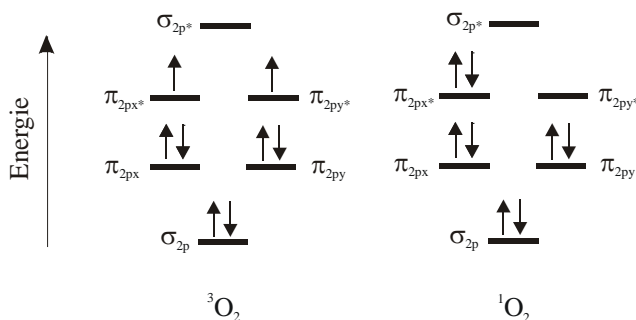


je schopen PS se udržet ve stavu  $T_1$  („triplet state lifetime“ ( $\tau_T$ )) se staly důležitou charakteristikou PS. Vyšší hodnoty těchto parametrů ukazují na kvalitnější PS (v PDT hodnoty  $\Phi_T = 0,2-0,7$  a  $\tau_T > 500 \text{ ns}^{23}$ ).

Přechod  $T_1 \rightarrow S_0$  představuje fosforescence (vyzáření fotonu) nebo fotoproces I a II. Oba fotoprocesy probíhají současně v závislosti na PS a množství kyslíku. Fotoproces I nastává při nízkých koncentracích kyslíku<sup>21</sup> (obr. 2). Při anoxii dochází k přenosu elektronu mezi excitovaným  $PS^*$  a okolní biomolekulou (X), výsledkem je oxidovaný substrát ( $X^+$ ) a redukovaný fotosenzitizér ( $PS^-$ ), za hypoxie může reagovat  $PS^-$  s kyslíkem za vzniku superoxidového aniontu ( $O_2^-$ ), který poskytuje hydroxidový radikál ( $OH^\bullet$ ), jež se dále výrazně účastní při oxidaci biomolekul<sup>24</sup>. Vznik radikálu ( $X^\bullet$ ) lze předpokládat i z přenosu elektronu mezi excitovaným  $PS^*$  a biosubstrátem (X) nebo okolním rozpouštědlem. Radikály ( $X^\bullet$ ) reakcí s kyslíkem poskytují superoxidový aniont ( $O_2^-$ ) nebo působí oxidační změny na biomolekulách ( $XO$ )<sup>21</sup>.



**Obr.2** Reakce probíhající při fotoprocesu typu I



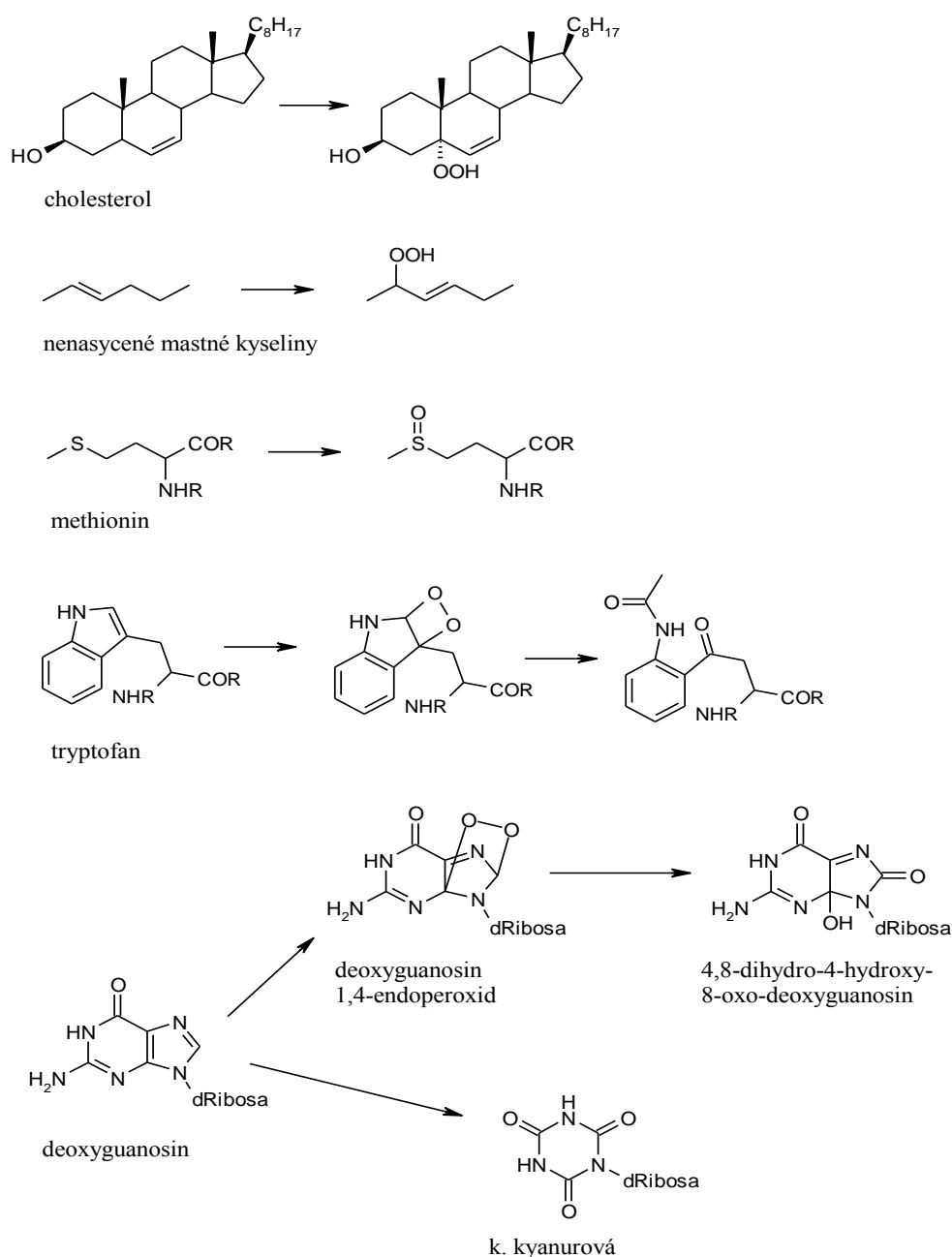
**Obr.3** Modely molekulových orbitalů tripletového a singletového kyslíku

Vyšší koncentrace kyslíku umožňuje fotoproces typu II, dochází k přenosu energie na základní tripletový stav molekulárního kyslíku ( $^3O_2$ ) a následně k inverzi spinu jednoho elektronu (obr. 3). Výsledkem je silně reaktivní singletový kyslík ( $^1O_2$ ), kterému je přisouzen biodegradační účinek v PDT. Doba existence  $^1O_2$  je závislá na okolním prostředí (voda 2–4  $\mu s^{21}$ , lipidy 50–100  $\mu s^4$ , organická rozpouštědla 10–100  $\mu s^{24}$  a okolo 0,6–0,04  $\mu s$  v biologickém prostředí<sup>25</sup>).

Díky krátké existenci  $^1O_2$  lze PDT považovat za selektivní metodu léčby solidních nádorů, protože zasahuje pouze ozářenou oblast tumoru obsahující PS. Singletový kyslík vyřadí svým účinkem (oxidace, cykloadice) okolní biomolekuly z jejich biologické funkce (obr. 4).

## Zdroje záření

Na počátku PDT se kožní nádory ozařovaly konvenčními lampami, jejichž světlo bylo nutné filtrovat z důvodu zahřívání tkáně způsobené infračervenou oblastí světelného spektra. Dalšími nevýhodami těchto zdrojů světla bylo jejich komplikované zavádění na nepřístupná místa, složité ovládání a intenzita osvětlení (typicky  $50\text{mW}/\text{cm}^2$ )<sup>26</sup>. Současná technologie používá k produkci záření lasery, ale existují se i jiné zdroje, např. LED diody. Laditelný argonový laser na bázi barviva produkuje záření v rozpětí vlnových délek od 350 do 700 nm, ovšem za cenu náročné obsluhy a vysokých pořizovacích nákladů. Kombinací laseru a optického vlákna lze ozářit prakticky kteroukoliv část lidského těla, včetně pojiva či kostí<sup>27</sup>.



**Obr. 4** Oxidace biomolekul singletovým kyslíkem

## 2.4. BIOLOGICKÁ ODPOVĚĎ

Konečný efekt PDT je výsledkem spolupráce několika procesů, které nelze od sebe navzájem oddělovat. Jde o spolupůsobení mnoha faktorů, jejichž vliv se mění v závislosti na použitém PS, způsobu ozáření a typu nádoru. V současnosti se předpokládají tři hlavní mechanismy zničení nádoru. ROS ničí buňky přímo v nádoru, způsobuje změny v cévním zásobování nádorové tkáně nebo prostřednictvím cytokinů a jiných mediátorů zánětu uvolněným z napadených buněk aktivuje imunitní systém<sup>28</sup>.

### 2.4.1. Přímý efekt

Přímým efektem se považuje účinek ROS na buněčnou i mitochondriální membránu, lysozomy a z části i DNA<sup>24</sup>. Poškození DNA není hlavním efektem při přímém poškození, jak se předpokládalo dříve, avšak změny DNA hrají roli během pozdější aktivace apoptotické odpovědi<sup>24</sup>. Existují důkazy o napadení zejména guaninových bazí v DNA<sup>29</sup>, pozdější práce však poukazují na nevýznamné poškození DNA některými PS<sup>30</sup>. Lysozomy jsou místem účinku zejména hydrofilních PS, po jejich aktivaci dochází k uvolnění hydrolasy a kyselého obsahu, který může ničit okolní organely<sup>31</sup>. Uvolněné enzymy zprostředkují vznik mediátorů apoptózy. Tímto způsobem indukovaná apoptóza je však daleko pomalejší než ta indukovaná po napadení mitochondrií<sup>32</sup>, při které do cytosolu buňky uvolněný cytochrom c aktivuje kaspasu 9 a kaspasu 3<sup>33</sup>. Membrána mitochondrií je cílem pro mnoho hydrofóbních PS. Vzhledem k tomu, že ATP nutné k řadě energetických pochodů v buňce je produkováno právě v mitochondriích, bylo jejich poškození studováno a prokázána inhibice velkého množství enzymů v nich obsažených<sup>24,34</sup>. Poškozeny jsou zejména enzymy v membránách, cytosolové enzymy jsou mnohem méně dotčeny. Tento jev souvisí pravděpodobně s velice krátkou životností singletového kyslíku ve vodném prostředí oproti lipidové vrstvě.

Dalším místem kumulace hydrofóbních PS je buněčná membrána. Dochází k fotoperoxidaci lipidů v ní obsažených a může dojít až k jejímu protržení. Průběh ovšem není rychlý, mnohem dřív dojde k inhibici mitochondriálních proteinů. Přímé poškození membránových lipidů není sice letální, ale oxidované fosfolipidy slouží jako startovní signál pro buňku k její smrti. Dochází také k aktivaci fosfolipasy A2 a fosfolipasy C produkujících kyselinu arachidonovou, která je důležitým prekurzorem pro syntézu mediátorů zánětu.

#### 2.4.2. Změny v cévním zásobení

Pro nádorové buňky je charakteristický zvýšený přísun živin a kyslíku. Přerušení cévního spojení má na kontrolu nádoru podle posledních poznatků větší vliv než přímá cytotoxicita. PDT indukuje uzavření cév v ozářené oblasti a omezuje tím okysličení nádoru<sup>28</sup>. K uzavěru cév dochází téměř okamžitě díky vazokonstrikci jako důsledek porušené rovnováhy mezi vasoaktivními a vazokonstrikčními faktory<sup>24</sup>. Po několika hodinách dochází k druhé fázi cévního uzávěru charakterizované tvorbou trombu<sup>35</sup>. Lokální nedostatek kyslíku však může omezit cytotoxický účinek. Přínos obou efektů (přímý efekt × cévní zásobení) se liší v závislosti na použitém PS a intervalu mezi podáním PS a ozářením. Krátký interval postačí na cévní uzávěry, dlouhé intervaly poskytují čas pro kumulaci PS ve tkáni.

#### 2.4.3. Imunitní systém

PDT má vliv na imunitní systém jak aktivační, tak supresivní. Suprese imunitního systému se dá využít v léčbě některých autoimunitních onemocnění (např. arthritida<sup>36</sup>), ale na druhou stranu může omezovat efekt specifické imunitní odpovědi na PDT<sup>24</sup>. Indukce specifické imunitní odpovědi byla předložena v roce 1996 Korbélikem<sup>37</sup>. Napadená tkáň uvolňuje velké množství buněčných zbytků ze zničených buněk, cytokinů a dalších prozánětlivých signálů. Po několika minutách po ozáření lze pozorovat velké množství neutrofilů vnikajících do poškozeného místa. Ty vylučují lysozomální enzymy a produkují ROS, které ničí endothelové a nádorové buňky a dále zesilují zánětlivý proces. Po smrti neutrofilů se uvolní jejich buněčný obsah, který dále působí jako chemotaktický signál pro další vlny zánětlivých buněk. Následně se do poškozené tkáně dostávají žírné buňky a uvolňují granule obsahující vasoaktivní složky a cytokiny<sup>38</sup>. Také monocyty a makrofágy pronikají do těchto míst, proliferyjí, sbírají zbytky buněk a ničí kapsy přeživších tumorózních buněk.

Zajímavým experimentem je použití lyzátu z nádorových buněk izolovaných po PDT k vakcinaci myši proti dalšímu rozvoji nádoru<sup>38</sup>. Závěry umožňují předpoklad, že se indukuje specifická protinádorová imunita.

## 2.5. FOTOLENIZITIZÉRY

Fotosenzitizéry jsou sloučeniny různých struktur, které mají společnou vlastnost absorpce světla specifické vlnové délky a následnou přeměnu na jinou využitelnou energii (např. pro PDT produkce cytotoxických agens). V současnosti existují stovky přírodních a syntetických barviv, u kterých lze najít tento společný jmenovatel. Využití v PDT mají a budou mít však jen ty PS, které splní nebo se významně přiblíží specifickým podmínkám, které byly definovány postupně s vývojem této léčebné metody<sup>39</sup>.

### 2.5.1. Vlastnosti ideálního fotosenzitizéru

Minimální toxicita ve tmě - PS a jeho případné metabolity jsou netoxické, toxicita je žádoucí pouze po aktivaci zářením příslušné vlnové délky.

Nízká fotosenzitizace kůže - všechny PS se dostávají do kůže, kde způsobují fototoxicitu po vystavení slunečnímu světlu. U ideálního PS trvá tenhle negativní efekt hodiny nebo maximálně dny (ne týdny či měsíce).

Chemická čistota – PS představuje jednotnou chemicky čistou sloučeninu

Selektivní kumulace – výrazně vyšší koncentrace PS v cílové tkáni než ve zdravé je nutná vzhledem k mechanismu účinku.

Rychlá eliminace – pro zamezení systémové toxicity je požadována rychlá eliminace volného PS. Selektivně vázaný PS může zůstat ve tkáni déle pro opakování fotodynamického procesu.

Výhodné fotochemické vlastnosti – PS by měl mít vysokou produkci singletového kyslíku, hodnotící parametry „triplet state quantum yield“ ( $\Phi_T$ ) a „triplet state lifetime“ ( $\tau_T$ ) dosahují vyšších hodnot.

Výhodné spektrální vlastnosti – PS má mít silnou absorpci s vysokými extinkčními koeficienty při delších vlnových délkách (650–800 nm), které dosahují maximální tkáňové prostupnosti a energie stačí pro dostatečnou produkci singletového kyslíku. Naopak má nízkou absorpci v oblasti spektrálního maxima denního světla (400-600 nm) z důvodu možné fotosenzitizace kůže.

Dostupnost, cena, modifikace – Také tyto hlediska je nutné akceptovat, náročná syntéza se odráží v ceně PS, která následně brání rozšíření do ambulantní léčby, pacienti většinou preferované před hospitalizací. Modifikace PS umožní zlepšení farmakokinetických vlastností, případně rozšíří rozsah použití.

Bezbolestná léčba – PS by měly zaručit bezbolestnou ambulantní léčbu, kterou lze aplikovat současně s ostatními léčebnými postupy jako ozařování, chemoterapie a chirurgie.

### 2.5.2. „*Photobleaching*“

Základem naprosté většiny PS je porfyrinový skelet jako u chlorofylu nebo hemoglobinu. Systém konjugovaných  $\pi$ -vazeb vytváří chromofor. PS můžeme řadit mezi barviva. U barviv se obecně setkáváme s jevem, který způsobuje jejich vyblednutí („photobleaching“) a taktéž postihuje i PS. Photobleaching lze definovat jako ztrátu intenzity absorpce a emise způsobenou světlem (fotoadice, oxidace, fotoredukce, fotocyklizace).

Rozlišujeme dva typy ireverzibilních změn chromoforu, fotomodifikaci 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<sup>40</sup>.

Důsledkem pro PDT (dochází většinou k pravému photobleachingu) je to, že PS už poté neabsorbují světlo, kterému je tak umožněno proniknout do hlubších vrstev. Na druhou stranu ovšem rozložený PS je již neaktivní a nemůže vykazovat žádné cytotoxické účinky. Photobleaching se může také podílet na rychlejšímu vylučování PS z těla díky jeho rozkladu v kůži<sup>41</sup>.

## 2.6. TYPY FOTOSENZITIZÉRŮ

V současné době tvoří skupinu PS stovky sloučenin, do klinických zkoušek a následného komerčního využití postoupilo však jen několik sloučenin (tab. 1). Početná skupina PS se dá rozdělit podle chemické struktury do tří kategorií<sup>39</sup>:

*PS s porfyrinovým chromoforem*

HpD

BPD

ALA

*PS s částečně redukováným porfyrinovým chromoforem*

Chloriny

Bakteriochloriny

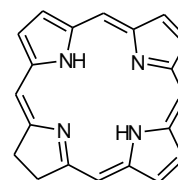
Purpuriny

*Syntetická barviva*

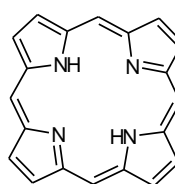
Ftalocyaniny

Naftalocyaniny

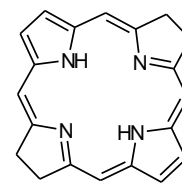
Texafyriny



chlorin



porfyrin



bakteriochlorin

Kategorie	Název	Substance	Výrobce
porfyrin	Photofrin <sup>®</sup>	porfimer sodný	Axcan Pharma, Inc.
porfyrin	Levulan <sup>®</sup>	ALA	DUSA Pharmaceuticals, Inc.
porfyrin	Metvix <sup>®</sup>	M-ALA	PhotoCure ASA
chlorin	Visudyne <sup>®</sup>	verteporfin	Novartis Pharmaceuticals
texafyrin	Antrin <sup>®</sup>	motexafin lutecium	Pharmacyclics
texafyrin	Xcytrin <sup>®</sup>	motexafin gadolinium	Pharmacyclics
chlorin	Foscan <sup>®</sup>	temoporfin	Biolitec Pharma Ltd.
chlorin	Laserphyrin <sup>®</sup>	talaporfin	Light Sciences
chlorin	Photochlor	HPPH	RPCI
barvivo	Photosens <sup>®</sup>	ftalocyanin	General Physics Institute

**Tab. 1** Fotosenzitizéry v klinickém a komerčním použití

Jiná kategorizace PS zohledňuje vývojem zlepšené fotochemické vlastnosti a vyšší selektivitu k cílové tkáni. Existují tři generace PS, které se liší stupněm přiblížení k ideálnímu PS. Dělení na kategorie však mnohdy vzbuzuje dojem, že novější generace jsou lepší než starší, což není zcela správné. Novější PS často zatěžuje bolestivá aplikace, silnější fotosenzibilita nutí k vyšší opatrnosti při léčbě, sluneční fototoxicita se výrazně nesnižuje, molekuly jsou méně selektivní a aktivní než předpokládaný biochemický profil.

První generaci zastupuje HpD jako jediný zástupce. Nevýhodné vlastnosti HpD daly vznik druhé generaci PS. Patří sem sloučeniny odvozené od porfyrinu i látky jiných struktur. PS druhé generace jsou chemicky jednotné sloučeniny, které aktivuje světlo vyšších vlnových délek s hlubší tkáňovou prostupností (tab. 2).

PS	$\lambda_{\max}$ (nm)	$\epsilon$ (M <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> )
hematoporfyrin	630	3500
Photofrin II	~ 630	~ 2000
<i>meso</i> -substituovaný porfyrin	650	18000
texafyrin	732	42000
benzoporfyrin	685	118000
chloriny	680	40000
bakteriochloriny	780	150000
Zn komplex etiopurpurinu	~ 690	~ 70000
ftalocyaniny	700	200000
naftalocyaniny	780	350000
porfycen	630	52000

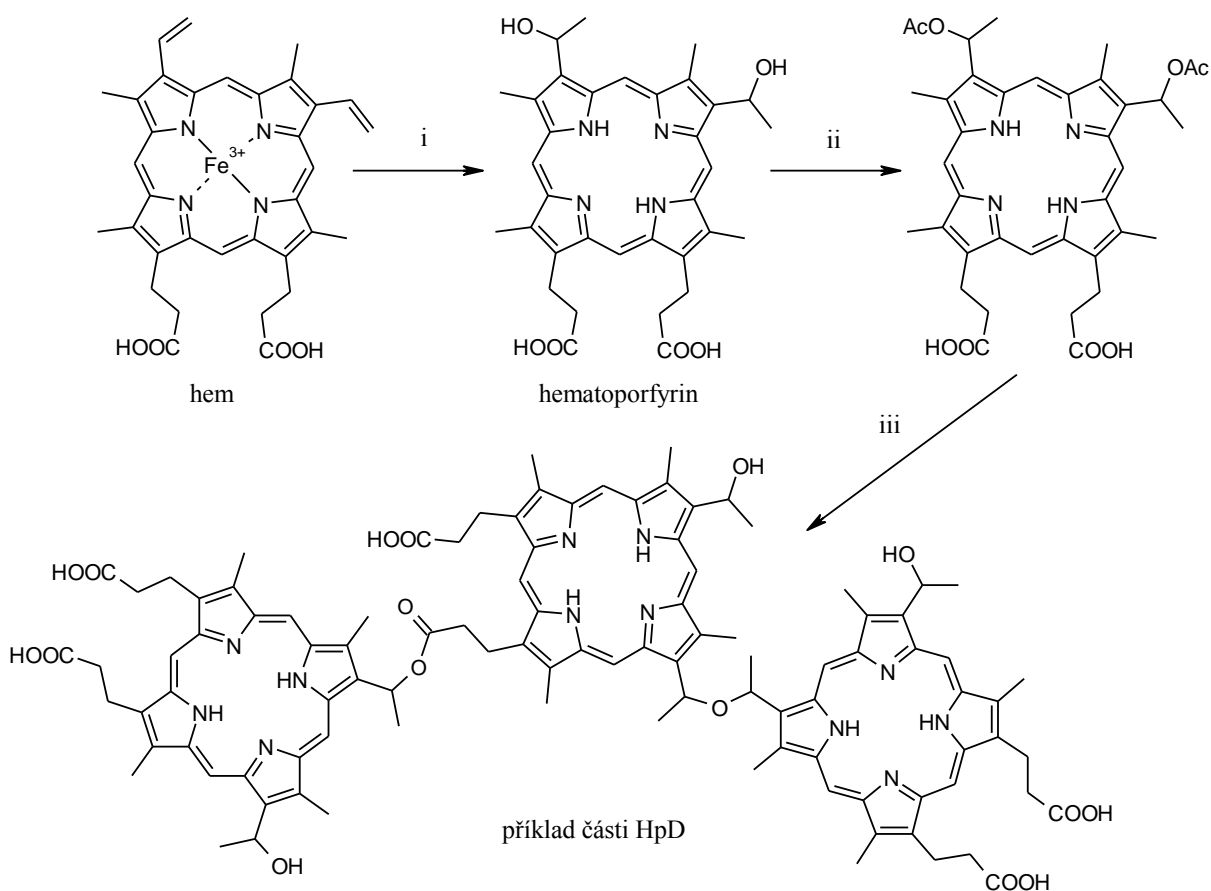
**Tab. 2** Porovnání  $\lambda_{\max}$  a  $\epsilon$  současných PS

Třetí generaci tvoří PS druhé generace, které pro zlepšení farmakokinetických parametrů využívají spojení s biologicky aktivními molekulami (steroidy, insulin, monoklonální protilátky) nebo syntetickými polymery (polyethylenglykol). Více je uvedeno v další kapitole.

### 2.6.1. PS s porfyrinovým chromoforem

#### **Porfimer sodný (HpD, Photofrin<sup>®</sup>, Photohem<sup>®</sup>, Photosan<sup>®</sup>)**

HpD je první látka používaná v PDT. HpD není chemicky čistou substancí, jde o směs produktů, směs dimerů a oligomerů hematoporfyrinu, který se izoluje z hemu (barevné části hemoglobinu)<sup>42</sup>. Na hematoporfyrin izolovaný z krve se nejdříve nechá působit kyselina sírová v prostředí kyseliny octové, směs se odfiltruje a neutralizuje hydroxidem sodným (obr. 5). Tato složitá směs, jejíž jednotky jsou pospojovány esterovými nebo éterovými vazbami, se stala základem porfimeru, který je ve formě sodné soli obsažen v přípravku Photofrin<sup>®</sup>. Nevýhodných vlastností má porfimer sodný několik. Nízká vlnová délka vhodná pro aktivaci (630 nm) a velice nízký extinkční koeficient při tomto maximu ( $1170 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) vyžadují vysoké dávky jak PS, tak světla. Jedná se o směs asi 60 látek, což komplikuje určení přesného složení. Není příliš selektivní, kumuluje se v játrech, ledvinách, slezině a kůži<sup>11</sup>. Zejména v kůži pak přetrvává až 6 týdnů, což způsobuje dlouhodobou fotosenzitivitu a pacienti nesmí přijít do kontaktu s ostrým světlem.



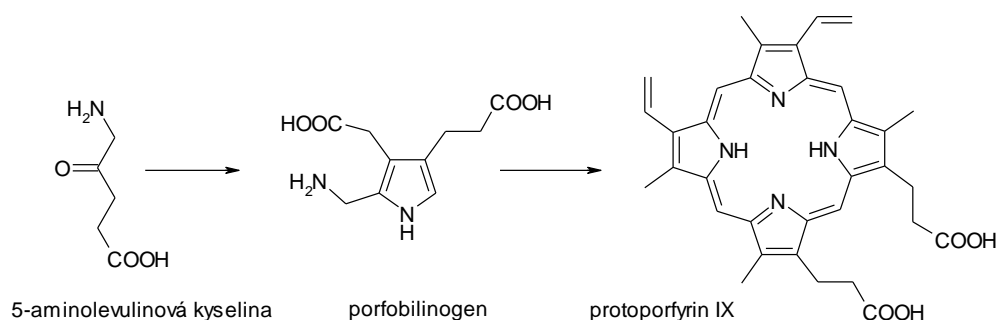
**Obr. 5** Syntéza HpD. Reakční podmínky: i) HBr, k. octová, H<sub>2</sub>O, ii) H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, k. octová, iii) NaOH



Porfimer přes veškeré výše uvedené nežádoucí vlastnosti zůstává nejrozšířenějším PS, byl zaveden v mnoha zemích k léčbě prekancerózních stavů (Barrettův jícn, cervikální dysplazie) i vlastních nádorů (karcinom cervixu, jícnu, močového měchýře, žaludku a bronchiální karcinom)<sup>39</sup>. Dále je testován i pro léčbu dalších nádorových onemocnění jako je rakovina hlavy a krku, střev, kůže, prsu a nekancerózní onemocnění jako je psoriáza nebo k prevenci arteriální restenózy. Derivát porfimeru Photohem<sup>®</sup> se začal používat k léčbě rakoviny kůže, prsu, jícnu, plic, hrtanu a žaludku. Také se používá k léčbě psoriázy a jako profylaxe zákalu korneálního štěpu<sup>42</sup>.

### 5-aminolevulinová kyselina (ALA, Levulan<sup>®</sup>, Metvix<sup>®</sup>, Hexvix<sup>®</sup>, Benzvix<sup>®</sup>)

Elegantní metoda v PDT spočívá ve vytváření senzitivizátoru přímo v buňce nebo organismu. ALA je endogenní substrát pro syntézu protoporphyrinu IX (PpIX), který funguje jako účinný PS. Inkorporací atomu železa enzymem ferrochelatase vzniká přirozenou cestou z PpIX fotodynamicky neaktivní hem. Biosyntéza hemu je kontrolována zpětnou vazbou, kdy zvýšená koncentrace hemu má negativní vliv na biosyntézu ALA. Vysoké exogenní dávky ALA potom způsobí kumulaci PpIX. Selektivitu k nádorové tkáni a účinnost ALA zajišťuje zvýšená permeabilita abnormálního keratinu (v případě topických aplikací), zvýšená hladina porfobilinogendeaminasy, snížená koncentrace železa a snížená aktivita ferrochelatasy. Nízkou lipofilitu ALA řeší příprava esterů, které lépe pronikají do tkání (zejména při aplikaci na kůži) a po hydrolyze uvolňují volnou ALA.



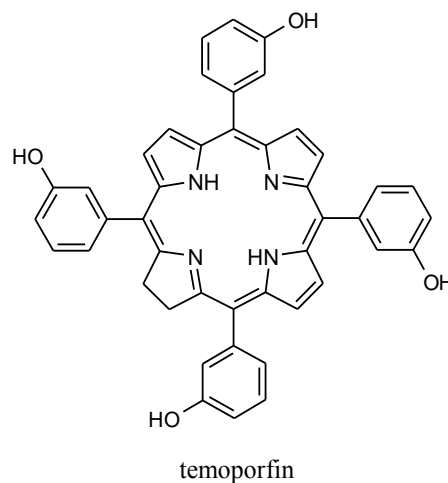
Jako každý PS se ALA zkouší pro různé léčebné aplikace, ve kterých je v různém stádiu klinických zkoušek (léčba akné, nemelanotické rakoviny kůže, endometriální ablace, rakoviny žaludku a jícnu, Barrettova jícnu a psoriázy)<sup>39</sup>. Povolení k použití ALA k léčbě aktinoidní keratózy vydal FDA v roce 2000. Methyl ester kyseliny 5-aminolevulinové byl jako Metvix<sup>®</sup> zaveden v roce 2001 k léčbě aktinoidní keratózy a karcinomu bazálních buněk kůže. Homologický hexyl ester kyseliny 5-aminolevulinové je jako Hexvix<sup>®</sup> vyvíjen pro

fotodetekci rakoviny močového měchýře. Přípravují se také klinické zkoušky benzyl esteru kyseliny 5-aminolevulinové (Benzvix<sup>®</sup>) pro fotodetekci a léčbu rakoviny jícnu<sup>43</sup>.

### 2.6.2. PS s částečně redukováným porfyrinovým chromoforem

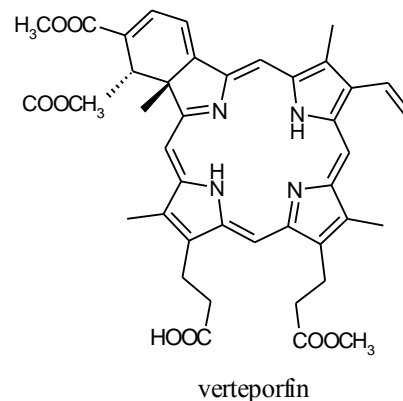
#### **Temoporfin (mTHPC, Foscan<sup>®</sup>)**

Temoporfin (tetra(*meta*-hydroxyfenyl)chlorin, mTHPC,  $\lambda_{\max} = 652 \text{ nm}$ ,  $\epsilon_{652} = 22400 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) vyniká nízkým dávkováním (cca  $0,1 \text{ mg kg}^{-1}$ ) pro efektivní účinek, což stokrát převyšuje účinnost HpD. Selektivní kumulací však neoplývá, navíc kožní fotosenzitivita tohoto PS přetrvává 2-3 týdny. Foscan<sup>®</sup> je indikován pro paliativní léčbu pacientů s pokročilým skvamózním karcinomem v oblasti hlavy a krku, při kterém selhaly předchozí způsoby léčby, a který je nevhodný pro radioterapii, chirurgický zákrok či systémovou chemoterapii. Dále se PS zkouší pro léčbu rakoviny jícnu a dysplazie u Barrettova jícnu, u karcinomu žaludku, prostaty, kůže, hyperplazie prostaty, sterilizace okolí zásahu po chirurgické léčbě nádoru nebo proti bakteriím rezistentním na antibiotika<sup>11,39</sup>.



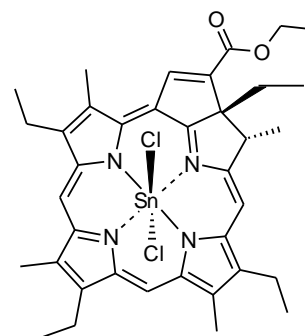
#### **Verteoporfin (BPD-MA, Visudyne<sup>™</sup>)**

Verteoporfin (zkratka BPD-MA pochází z angl. benzoporphyrin-derivative monoacid ring A,  $\lambda_{\max} = 690 \text{ nm}$ ) je velmi rychle absorbován nádorovou tkání. Nejlepší poměr mezi nádorovými a ostatními tkáněmi je dosažen přibližně po 30–150 minutách, avšak koncentrace v tumorech a organismu velice rychle klesá. Selektivita není ideální vzhledem ke stále velkému množství cirkulující látky v krevním oběhu. Komerční použití našel verteoporfin při léčbě AMD (přípravek Visudyne<sup>™</sup> je registrován i v České republice). Látka se nachází ve III. fázi klinických zkoušek pro léčbu karcinomu basálních buněk kůže, v II. fázi klinických zkoušek pro léčbu nemelanotických kožní nádorů<sup>43</sup>, psoriázy, psoriatické a revmatoidní artritidy. Přípravuje se také pro autotransplantační léčbu u nádorových onemocnění kostní dřeně<sup>39,44</sup>, pro zkoušky na terapii Barrettova jícnu (prekanceróza) a k endometriální ablaci.



## Rostaporfin (Etiopurpurin-komplex s cínem, SnET2, Purlytin<sup>®</sup>, Photrex<sup>®</sup>)

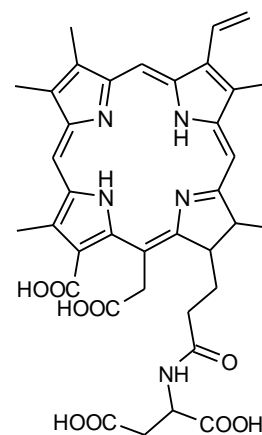
Tento PS je velmi nestabilní ve vodném prostředí a pro účinnou PDT jsou potřebné vysoké dávky světla (srovnatelné s HpD), kožní fotosenzitivita přetrvává asi 10–14 dní po podání. Přesto pod obchodním názvem Photrex<sup>®</sup> dokončil třetí fázi klinických zkoušek pro léčbu AMD firmou Miravant Medical Technologies (Santa Barbara, CA, USA)<sup>11</sup>. SnET2 podstupuje druhou fázi klinických zkoušek pro léčbu kožních metastáz rakoviny prsu a Kaposiho sarkomu u pacientů s AIDS. Připravují se preklinické zkoušky na léčbu rakoviny mozku, plic, kůže, hlavy a krku a nenádorové indikace jako psoriáza a cévní restenóza<sup>45</sup>.



Sn(IV)-etiopurpurin

## Talaporfin (LS11, MACE, Laserphyrin)

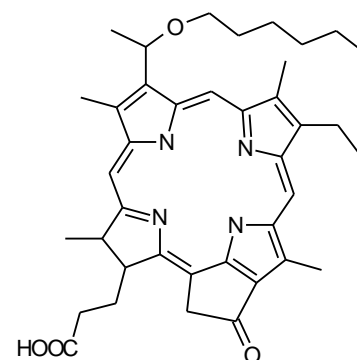
Talaporfin ( $\lambda_{\max} = 664 \text{ nm}$ ,  $\epsilon_{664} = 38000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) je syntetický chlorin (mono N-aspartyl chlorin e6), který je rozpustný ve vodném prostředí ve formě sodné soli. Účinnější terapie nastává po vyšších dávkách PS i světla, poté se však vytrácí selektivita<sup>46</sup>. Eliminace žlučí je rychlá, a proto k ozáření dochází po 4 hodinách po intravenózní aplikaci. Po aplikaci PS nebyla pozorována nežádoucí fotosenzibilita. Laserphyrin obdržel povolení k léčbě časného stádia rakoviny plic (Meiji Seika Kaisha, Tokyo, Japonsko), dále pokračují první fáze testů léčby AMD a preklinické zkoušky pro léčbu aterosklerózy<sup>39</sup>.



talaporfin

## Photoclor

Photoclor je hexyleter feoforbidu-a (HPPH) ( $\lambda_{\max} = 665 \text{ nm}$ ,  $\epsilon_{665} = 50000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ), v klinických testech pro léčbu karcinomu jícnu vykazuje dobrou selektivní kumulaci a nízkou kožní fototoxicitu<sup>11</sup>.



photoclor

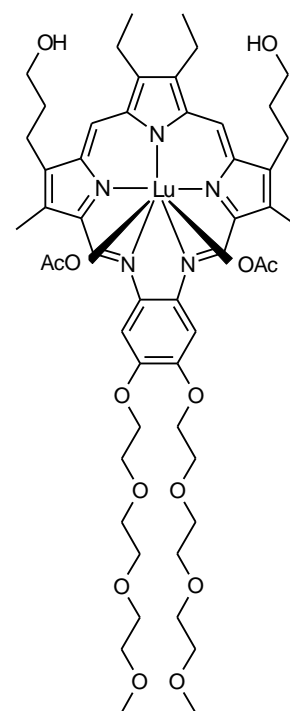
### 2.6.3. Syntetická barviva

#### **Motexafin lutecium (Lutex, Antrin<sup>®</sup>, Xcytrin<sup>®</sup>)**

Tento derivát texafyrinu s centrálně chelatovaným atomem lutecia má dobrou selektivitu, slabou fotosenzibilitu a rychlou eliminaci z krevní plasmy, což umožňuje opakovanou aplikaci, jejíž výhodnost potvrzují pokusy na zvířatech. PS se silnou absorpcí při dlouhé vlnové délce 732 nm je vhodný k léčbě silně pigmentovaných nádorů (maligní melanom), do kterých světlo nižších vlnových délek neproniká.

Motexafin lutecium (Antrin<sup>®</sup>) je testován pro prevenci arteriální restenózy a léčbu aterosklerózy, protože se kumuluje v aterosklerotických plátech (vazba na LDL). Fotoangioplastika se pokouší aktivací PS odstranit aterosklerotické pláty<sup>11, 39</sup>.

Motexafin gadolinium (Xcytrin<sup>®</sup>) vznikl umístěním atomu gadolinia do centra texafyrinu. Nízká toxicita a vysoká retence v nádoru ho přivedly v kombinaci s radioterapií již do třetí fáze klinických zkoušek u pacientů s mozkovými metastázemi<sup>39</sup>. V druhé fázi je zkoušen u tumorů plic a ledvin. Překvapující jsou výsledky experimentů *in vivo*, ve kterých byla účinnost tohoto PS vyšší než v pokusech *in vitro*. Xcytrin<sup>®</sup> není PS v pravém smyslu slova, jeho mechanismem účinku je zásah do buněčného metabolismu inhibicí klíčového enzymu thioredoxinreduktázy s následnou produkcí ROS. Navíc přítomnost paramagnetického gadolinia umožňuje zobrazení kumulace PS pomocí magnetické rezonance. Při anoxii vznikají hydroxylové radikály v místě ozáření RTG-paprsky<sup>47</sup>.



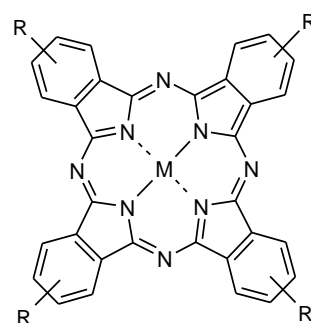
motexafin lutecium

#### **Ftalocyaniny (Pc4, Photosense)**

Barviva tvoří historický základ fotosenzitivních látek (viz Historie), fotodynamicky nejaktivnější sloučeniny se nacházejí ve skupině ftalocyaninů a naftalocyaninů.

Ftalocyaniny (angl. phthalocyanine, Pc) mají strukturu podobnou porfyriu, rozšíření chromoforu vede k posunu maximální vlnové délky absorpce (670–700 nm). Chelatované centrální kovy a polokovy prodlužují trvání tripletového stavu PS a tím i zvyšují jeho účinnost v PDT (např. Zn, Al, Si). Špatná rozpustnost těchto komplexů vede k modifikacím na periférii Pc nebo inkorporací Pc do lipozómů. Photosense (směs různě sulfonovaného hlinitého komplexu ftalocyaninu) se dostal do třetí fáze zkoušek pro léčbu karcinomu plic, kůže, prsu a

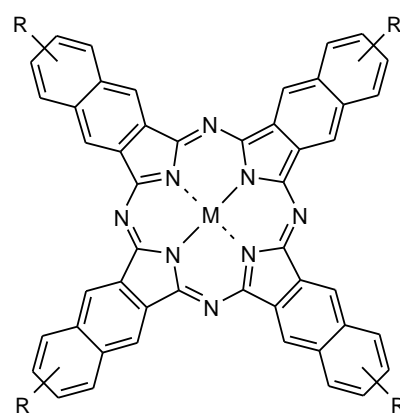
GIT<sup>11,39</sup>. Špatně rozpustný zinečnatý komplex nesubstituovaného ftalocyaninu byl ve formě lipozómů v I/II fázi klinických zkoušek pro léčbu karcinomu skvamózních buněk kůže<sup>43</sup>.



ftalocyaniny

Křemičitý komplex ftalocyaninu (Pc4) se zkouší ke sterilizaci krevních produktů (V. I. Technologies, Melville, NY, USA), při které cíleně zasahuje patogeny – viry (HIV), bakterie, kvasinky, prvoky (*Plasmodium malariae*) a přitom neohrožuje červené krvinky. Krevní plasma a erythrocyty totiž neobsahují DNA, do které se interkalují planární kationické senzitizery. Ftalocyaniny navíc absorbují záření mimo absorpci hemových pigmentů (nad 600 nm)<sup>48</sup>.

Experimenty na myších odhalily imunopresivní účinky některých Pc<sup>49</sup>.

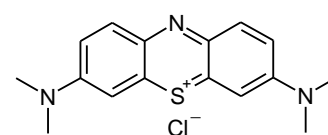


naftalocyaniny

Ftalocyaninům strukturně podobné naftalocyaniny charakterizují přikondenzovaná benzenová jádra na skelet Pc, vzniklý rozšířený chromofor dosahuje absorpce až při 770 nm, což ho předurčuje pro léčbu vysoce pigmentovaných kožních nádorů (melanom).

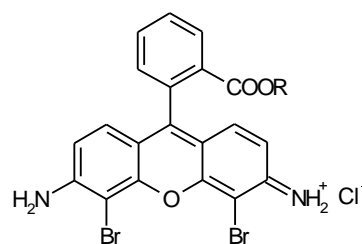
#### 2.6.4. Další fotosenzitizery

**Methylénová modř** ( $\lambda_{\max} = 668 \text{ nm}$ ,  $\epsilon_{668} = 95000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) se uplatnila při dekontaminaci čerstvě zmrazené plasmu, inaktivuje extracelulárně přítomné viry a je prakticky netoxická pro člověka<sup>50</sup>. *In vivo* aplikaci brání buněčné enzymy, které redukuje barvivo na fotodynamicky neaktivní leukoformu.



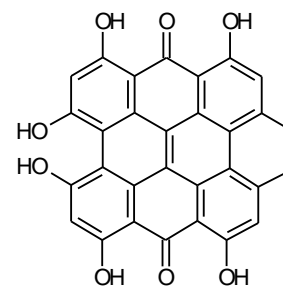
methylénová modř

Bromovaný analog **rhodaminu** ( $\lambda_{\max} = 511 \text{ nm}$ ,  $\epsilon_{511} = 20000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) se dostal do první fáze klinických zkoušek pro autotransplantační léčbu chronické myeloidní leukémie. Při *ex vivo* probíhající léčbě se zničí nemocné buňky kostní dřeně, normální zdravé buňky přežívají a jsou poté použity k autotransplantaci<sup>43</sup>.

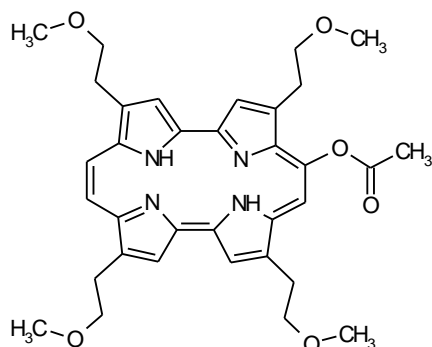


bromovaný rhodamin

Z rostlin izolovaný **hypericin** ( $\lambda_{\max} = 590 \text{ nm}$ ,  $\varepsilon_{590} = 44000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) se nachází v první fázi klinických zkoušek na léčbu psoriázy, bradavic a rakoviny kůže<sup>51</sup>.



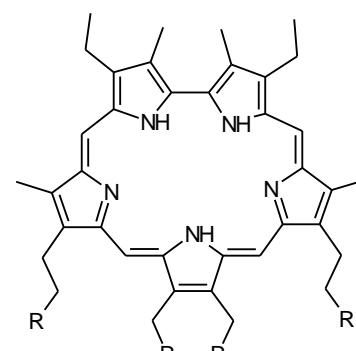
hypericin



porfycen (ATMPn)

**Porfyceny** - ATMPn (9-acetoxy-2,7,12,17-tetrakis-( $\beta$ -methoxyethyl)-porfycen) patří mezi nejrychleji vychytávané PS v *in vitro* studiích vůbec. Aplikuje se pouze topicky, pro léčbu kožních nemocí (psoriáza, nemelanotický karcinom kůže)<sup>52</sup>.

U některých sloučenin ze skupiny **safyrinů** (expandovaných porfyrinů s  $\lambda_{\max}$  okolo 675 nm) byl zjištěn vysoký poměr rozdělení mezi nádorovou a okolní svalovou tkáň, ovšem hodnoty maximální koncentrace v nádoru byly naměřeny až za 3–6 dny po aplikaci<sup>53</sup>.



safyrin

## 2.7. ZLEPŠENÍ BIODISTRIBUCE PS

Důležitou podmínkou pro efektivní PDT je mnohonásobně vyšší koncentrace PS v cílové nádorové tkáni než v okolní zdravé. Současné PS se do určité míry selektivně hromadí v cílové tkáni vůči zdravé, ale poměr koncentrací PS v obou místech je velmi nízký. Snaha o zlepšení této skutečnosti se děje různými cestami. Syntéza nových PS, jejichž selektivita bude vlastností samotné molekuly PS, neprobíhá snadně, výhodnější farmakokinetické vlastnosti často znamenají zhoršení fotofyzikálních parametrů (absorpční spektrum, produkce singletového kyslíku). Dále se vyvíjí aplikační formy již známých PS zlepšující biodistribuci (PS v lipozómech, olejových disperzích) a připravují se PS „třetí generace“.

### 2.7.1. Pasivně cílená biodistribuce

Do této kategorie spadají lipozómy, olejové disperze, micelární systémy, biodegradabilní polymerní částice a konjugáty PS s hydrofilními polymery. K selektivní biodistribuci využívají přirozené mechanismy (fagocytóza, pasivní difúze), proto lze hovořit o „pasivně cílené biodistribuci“. Podle studií<sup>54</sup> zvýšenou nádorovou kumulaci umožňuje nekompletní endoteliální bariéra, zvýšená cévní permeabilita a snížená lymfatická drenáž způsobená nižším rozvinutím lymfatického systému v tumorózní tkáni.

Lipozómy představují efektivní přenašeč PS používaný již v klinické praxi (verteporfin pro léčbu AMD)<sup>55</sup>. Disperze Cremophoru-EL (neionogenní tenzid typu polyethoxylovaného ricinového oleje) s PS zlepšuje efekt PDT při nižších koncentracích PS. Avšak případy akutní anafylaktické reakce po podání léčiv v Cremophoru-EL brání rozšíření tohoto systému<sup>56</sup>. Nadějně pH-senzitivní polymerní micely obsahující PS uvolní léčivo až po svém rozpadu při nižším pH, které je často v nádorovém intersticiu, lysozómech a endozómech. V *in vivo* studiích mají aktivitu srovnatelnou s Cremophorem-EL, ale s daleko rychlejší clearence z krevního oběhu<sup>57</sup>. Biodegradabilní polymerní částice transportují vysoké koncentrace PS s možností jeho postupného uvolňování. Tyto nanočástice vykazují vysokou fototoxicitou *in vitro* a zvýšenou biodistribuci. Prodloužit intravaskulární poločas, zvýšit nádorovou selektivitu se daří konjugátům, které vznikly spojením PS s hydrofilními polymery obsahujícími N-(2-hydroxypropyl) metakrylamid nebo s poly-L-lysinem, polyethylenglykolem, polyvinylalkoholem<sup>58</sup>.

### 2.7.2. Dlouhocirkulující systémy

Terapeutické koloidní systémy jsou poměrně rychle eliminovány z oběhu mononukleárním fagocytárním systémem a v cílové tkáni nedosáhnou patřičných koncentrací. Omezit fagocytózu dokáže metoda modifikace povrchu koloidních systémů hydrofilními vrstvami. Vychází ze znalostí, že opsonizace cizích těles (iniciace fagocytózy) probíhá daleko lépe na hydrofobní než hydrofilní částice. Potažením povrchu částic např. poloxamery, poloxaminy<sup>59</sup>, polyethylenglykolem nebo inkorporací gangliosidů<sup>60</sup> do lipidové dvojvrstvy dochází k redukci jejich clearence z krevního oběhu.

### 2.7.3. Aktivně cílená biodistribuce

Metoda spočívá v přípravě třetí generace PS, spojení PS s ligandy pro specifické receptory vyniká vyšší selektivitou a použitím nižších efektivních dávek PS.

#### **Lipoproteiny**

Nejvýznamnějším lipoproteinem je LDL (low-density lipoproteins). Jednotky LDL jsou hlavními nosiči cholesterolu, který je esenciální strukturou všech plazmatických membrán. Rychlejší proliferace nádorové tkáně vyžaduje vyšší přísun cholesterolu, a proto LDL-receptory jsou exprimovány ve zvýšeném množství na nádorových buňkách<sup>55</sup>. Hydrofóbní PS se ukládají do lipofilního jádra LDL a nemění jejich vnější vlastnosti. Důležitá je kovalentní vazba na LDL, neboť při nekovalentních vazbách dochází k redistribuci PS mezi ostatní plasmatické proteiny, které vykazují mnohem menší afinitu k cílové tkáni. LDL jsou velmi perspektivními pro cílený zásah PDT, avšak výsledky experimentů na zvířatech nelze přímo extrapolovat na lidský organismus vzhledem k výrazným rozdílům zejména ve složení plasmatických proteinů mezi živočišnými druhy<sup>61</sup>.

#### **Monoklonální protilátky**

Charakteristického rozdílu mezi zdravými a nádorovými buňkami v expresi některých antigenů nebo onkoproteinů<sup>62</sup> se snaží využít konjugáty PS s monoklonálními protilátkami (angl. monoclonal antibody, MAb). Takle slibná vysoká specifická distribuce nízkých koncentrací PS však naráží na několik problémů. Molekula PS přímo vázaná na MAb mění fyzikálně chemické vlastnosti protilátky, což se projevuje snížením afinity<sup>63</sup>. V případě nekovalentní vazby PS na MAb dochází k uvolnění PS po aplikaci do živého organismu. Řešení možná nabídne vazba PS na MAb přes polymerní nosič<sup>64</sup> (dextran, polyglutamová kyselina, polyvinylalkohol, poly-L-lysin). Nádorová tkáň je velmi heterogenní a neexprimuje odpovídající množství antigenů vzhledem ke své velikosti. Méně než 1 % velkých proteinů MAb se skutečně dostane do tumoru, většina zůstává v cévním řečišti nádoru<sup>55</sup>.

#### **Ligandy různých struktur**

Nádorovou tkáň charakterizuje zvýšený metabolismus a rychlá proliferace. Pro zajištění těchto procesů je nezbytný vyšší přísun substrátů, který nádorové buňky obstarají zmnožením receptorů specifickým pro konkrétní substrát. Spojení PS a patřičného ligandu vzniká substrát s významnou selektivitou. V experimentech *in vitro* vykazují některé



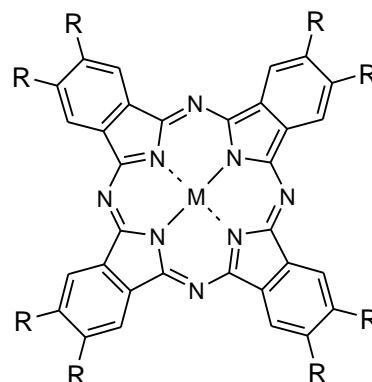
konjugáty mnohonásobně větší fototoxicitu než samotné molekuly PS. Jako ligand se zkouší inzulin, transferin, epidermální růstový faktor, annexiny, bifosfonáty, cholesterol, hemoglobin, pohlavní hormony<sup>55</sup>. Vazba PS na oligonukleotidy obohacuje metodu genové terapie. Oligonukleotidy po vazbě na RNA (antisense) nebo DNA (antigene) vytvářejí s nativní nukleovou kyselinou špatně rozpojitelné duplexy (s RNA) nebo triplexy (s DNA) a brání expresi vybraných cílových genů<sup>65</sup>.

### **Fotosensitizující adenovirus**

Použití fotosensitizujícího adenoviru představuje zcela jiný přístup ke zvýšení selektivity. Geneticky upravený adenovir obsahuje enzym ALA synthasu, která syntetizuje 5-aminolevulinovou kyselinu (prekurzor PpIX). Regulační mechanismy pro ALA synthasu jsou záměrně porušeny, což vede k nadměrné produkci tohoto enzymu. Metoda však musí dořešit zvýšení afinity adenoviru k nádorové tkáni<sup>55,66</sup>.

### 3. CÍL PRÁCE

Vzhledem k perspektivním vyhlídkám PDT se neustále hledají nové druhy fotosenzitizérů a rozšiřují již známé kategorie PS o nové sloučeniny. Cílem práce je syntéza a charakteristika nových derivátů ftalocyaninů, které by se svými vlastnostmi přiblížily kritériím ideálního fotosenzitizéru a jejich chemická struktura by umožnila tvorbu třetí generace PS.



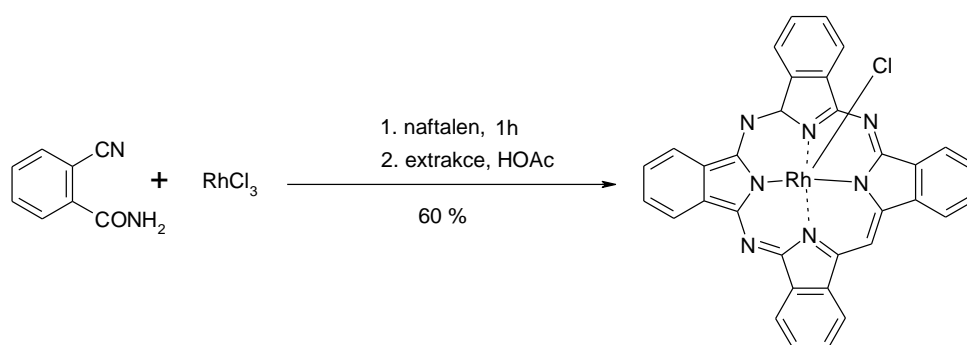
## 4. METODICKÁ ČÁST

### 4.1. SYNTÉZA FTALOCYANINŮ

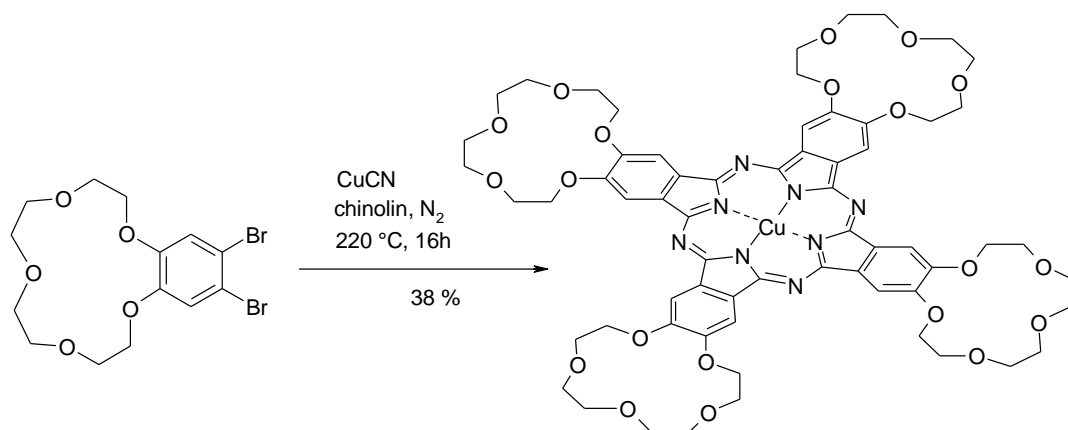
Molekula ftalocyaninu (Pc) je stejně jako u nejrozšířenějších porfyrinů složena ze čtyř pyrrolových jader, ovšem s tím rozdílem, že pyrrolové jednotky jsou spojeny přes atom dusíku místo methinových můstků. Navíc jsou ke všem pyrrolovým jádrům přikondenzovány benzenové cykly, čímž se posunuje maximální vlnovou délku absorpce směrem k červené části spektra (670–700 nm) a jednak zesiluje absorpce při této vlnové délce ( $\epsilon$  až  $200000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ).

Syntézy ftalocyaninů a jejich derivátů jsou v podstatě nepřilíš složité reakce, vychází se z různě substituované kyseliny ftalové, anhydridu kyseliny ftalové (obr. 8), ftalimidu, 2-kyanbenzamidu (obr. 6), 1,2-dibrombenzenu (obr. 7), ftalonitrilu (obr. 9) nebo isoindolindiiminu (kondenzačního produktu ftalonitrilu a amoniaku). Jednotlivé druhy prekurzorů reagují za odlišných podmínek, nicméně u všech probíhá tetramerizace za vyšší teploty a vyžaduje přítomnost baze např. močoviny, DBU (1,8-diazabicyklo[5,4,0]undec-7-en). Cyklizací prekurzorů vznikají planární skelety Pc charakteristické svou schopností agregace a špatnou rozpustností v běžných rozpouštědlech, což sice nevylučuje, ale značně omezuje další použití. Vhodně substituovaný prekurzor pak tetramerizuje na periferně substituovaný Pc s nižší tendencí k agregaci a mnohem vyšší rozpustností. Případné funkční skupiny na periférii makrocyklu lze využít k další modifikaci PS. Deriváty ftalonitrilu lze označit za nejpoužívanější prekurzory Pc pro nenáročné reakční podmínky a lepší výtěžky.

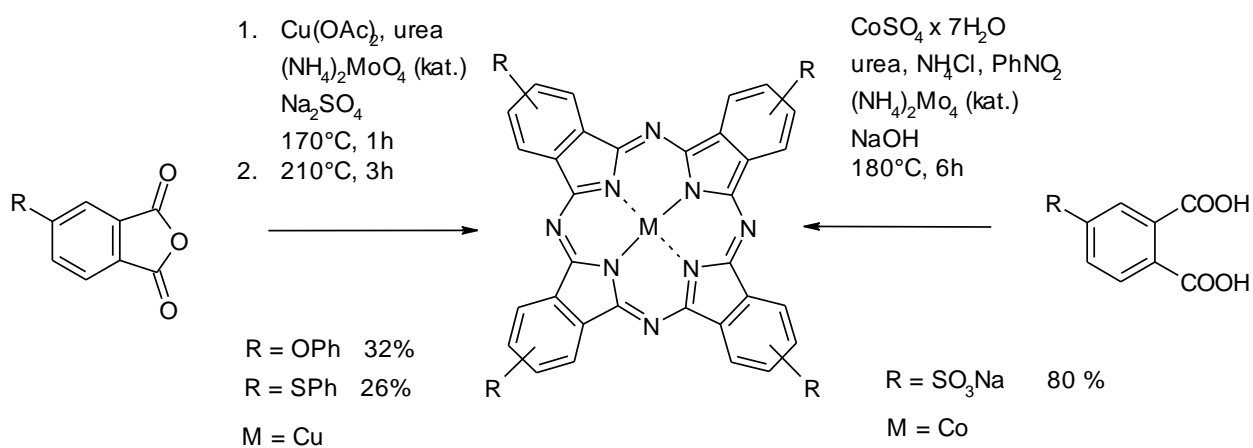
Poněkud jiný přístup nabízí příprava nesymetrického substituovaného Pc rozšířením skeletu subftalocyaninu (obr. 10).



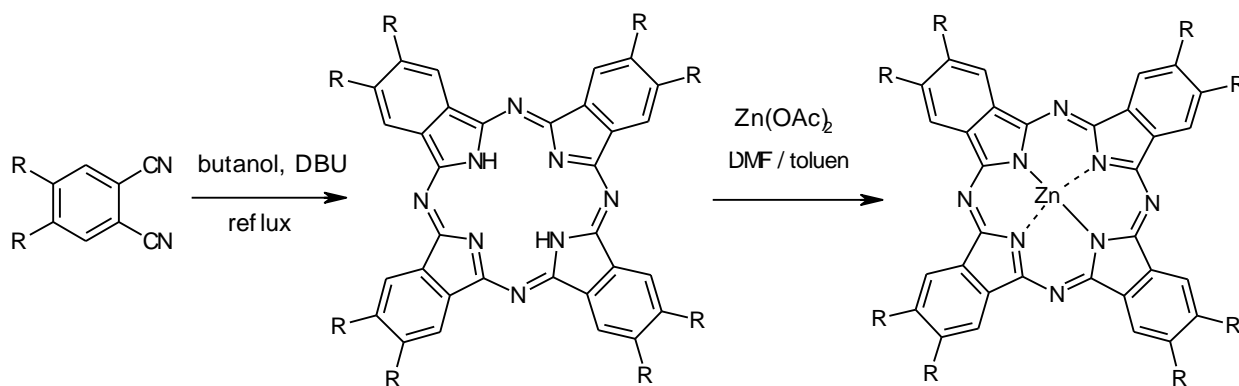
Obr. 6 Tetramerizace 2-kyanbenzamidu <sup>67</sup>



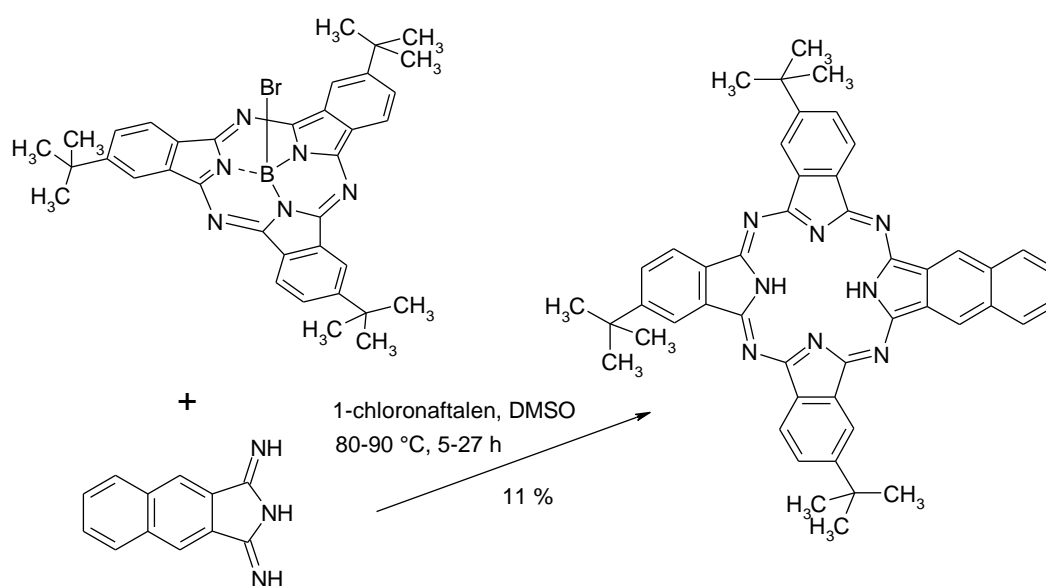
**Obr. 7** Tetramerizace derivátu 1,2-dibrombenzenu<sup>68</sup>



**Obr. 8** Tetramerizace substituovaného anhydridu kyseliny ftalové<sup>69</sup> a kyseliny ftalové<sup>70</sup>

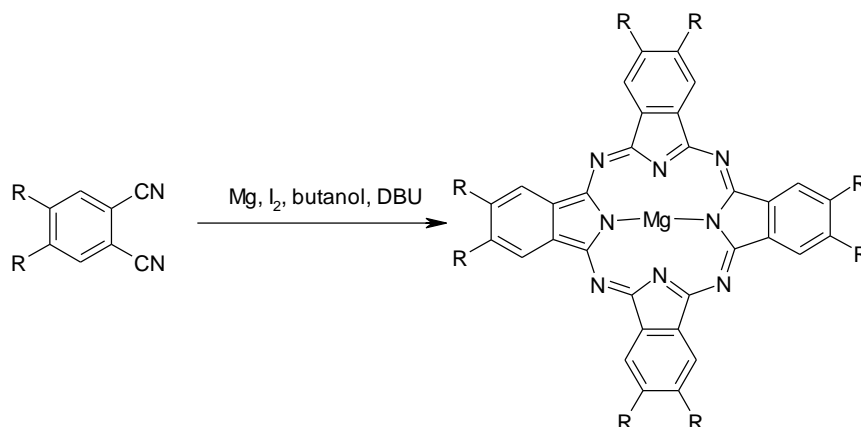


**Obr. 9** Tetramerizace derivátu ftalonitrilu a příprava Pc s centrálním atomem zinku<sup>71</sup>



**Obr. 10** Příprava nesymetrického substituovaného Pc rozšířením skeletu subftalocyaninu <sup>68</sup>

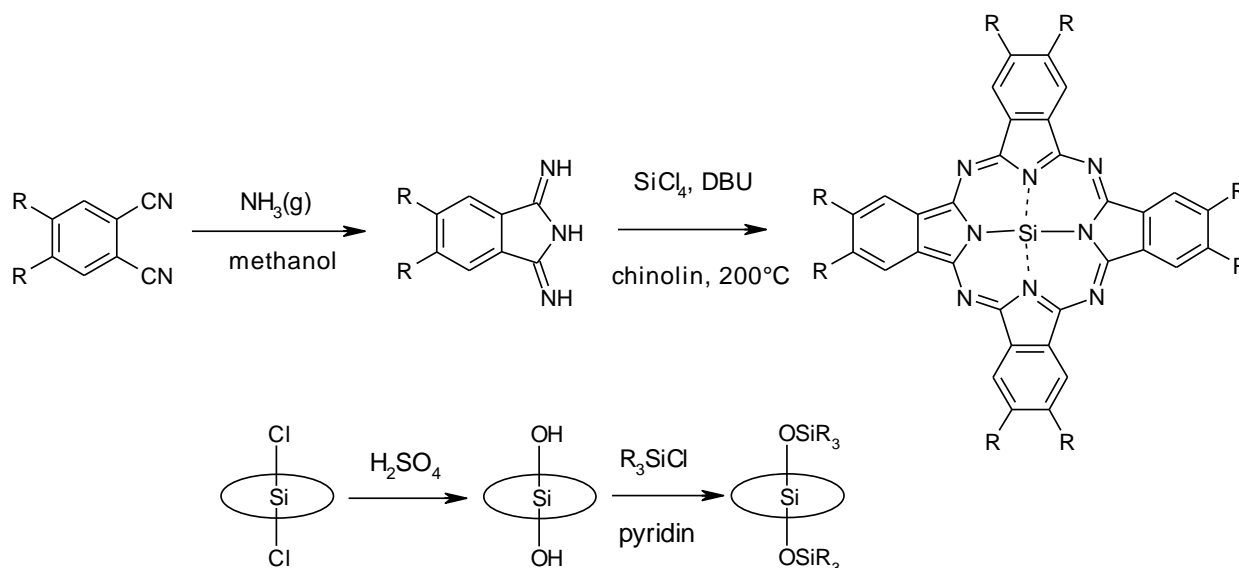
Do centra makrocyklu Pc lze umístit atom kovu nebo polokovu, který významně ovlivňuje spektrální a fotodynamické vlastnosti. Přítomnost vhodného centrálního atomu prodlužuje trvání tripletového stavu PS a tím i zvyšuje jeho účinnost v PDT (např. Zn, Al, Si). Molekula Pc dokáže chelátovat pravděpodobně všechny kovy a některé polokovy periodické tabulky prvků<sup>72</sup>. Centrální kovy mohou podléhat oxidacím<sup>73</sup>, redukcím<sup>74</sup> a měnit svoje mocenství, v jádře jsou vázány koordinačně-kovalentní vazbou, jejíž stabilita je variabilní u různých prvků. Už slabší kyseliny odstraňují slabou vazbou vázané alkalické kovy a kovy alkalických zemin za vzniku bezkovových Pc. Příprava Pc s těmito kovy je pak možná pouze prostřednictvím alkoholátů příslušných kovů (obr. 11).



**Obr. 11** Příprava hořečnatého komplexu ftalocyaninu

Pc s ostatními chelatovanými prvky vznikají přímou reakcí substituovaného prekursoru a soli daného kovu ve výše vroucích rozpouštědlech (chinolin). Inkorporace některých prvků (Si, Al) probíhá obtížně, proto se pro cyklizaci používají reaktivnější isoindolindiiminy<sup>75</sup> (obr. 12). Jinou možností přípravy chelatovaných Pc představuje vložení požadovaného atomu kovu do již připraveného bezkovového Pc<sup>71</sup>.

Další modifikace připravené molekuly Pc probíhají na periférii cyklu (elektrofilní substituce, oxidace, redukce) nebo vazbou ligandů na vícevazné centrální atomy (Al, Si)<sup>76</sup>.



**Obr. 12** Tetramerizace isoindolindiiminu a modifikace ligandů na centrálním atomu křemíku

## 4.2. MĚŘENÍ PRODUKCE SINGLETOVÉHO KYSLÍKU

Množství vyprodukovaného singletového kyslíku je důležitým parametrem každého PS. Pro jednoduché srovnání látek se používá bezrozměrná veličina „singlet oxygen quantum yield“ ( $\Phi_{\Delta}$ ). Její hodnota je závislá na způsobu měření a hlavně na rozpouštědle, v němž ke stanovení  $\Phi_{\Delta}$  dochází. Měření je většinou nepřímé, tzn. s využitím standartu látky o známém  $\Phi_{\Delta}$  v daném rozpouštědle, a proto seznamy hodnot pro PS uvádějí také způsob měření, rozpouštědlo a použitý standart<sup>77,78</sup>. Hodnotu  $\Phi_{\Delta}$  lze získat třemi metodami: fosforencí v blízké IČ oblasti, fototermální technikou a chemickým vychytáváním scavangerem<sup>79</sup>.

### Fosforescence v blízké IČ oblasti

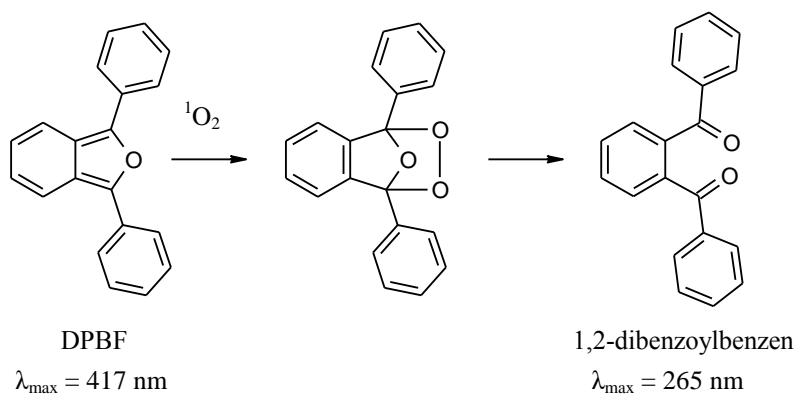
Charakteristickou emisí fotonu singletovým kyslíkem při 1270 nm detekuje germaniový fotodiodový detektor. Srovnávací metoda vyžaduje dobře definované standardy o známém  $\Phi_{\Delta}$ . Produkce fosforescence je ovšem slabá a proměnlivá v různých rozpouštědlech, přičemž voda je nejméně vhodná.

### Fototermální metody

Metody detekují teplo vydané neradiačními procesy vedoucími k produkci a rozkladu singletového kyslíku. Zahrnují fotoakustickou kalorimetrii, „thermal lensing“ a „photothermal beam deflection“. Thermal lensing je jediná přímá metoda pro absolutní určení  $\Phi_{\Delta}$  s využitím při přesném stanovení hodnot u standardů.

### Chemické metody

Obecně jde o zachycení singletového kyslíku reakcí s vhodným akceptorem a sledovat vznik nových produktů nebo úbytek akceptoru. K monitorování chemických změn se používají analytické metody jako je absorpční a fluorescenční spektrofotometrie, NMR, ESR, chromatografie. Jedním z nejpoužívanějších akceptorů je 1,3-difenylisobenzofuran (DPBF), který je selektivně měněn pouze singletovým kyslíkem, ne jinými případnými reakcemi a nezháší singletový kyslík fyzikálními procesy. Reakcí se singletovým kyslíkem dochází velice rychle k cykloadici s následným otevřením furanového kruhu za vzniku 1,2-dibenzoylbenzen (obr. 13). Měří se úbytek DPBF jako pokles absorbance při jeho absorpčním maximu ( $\lambda_{\max} = 417 \text{ nm}$ ). Produkt oxidace při této vlnové délce neabsorbuje a tudíž nedochází ke zkreslení výsledků.



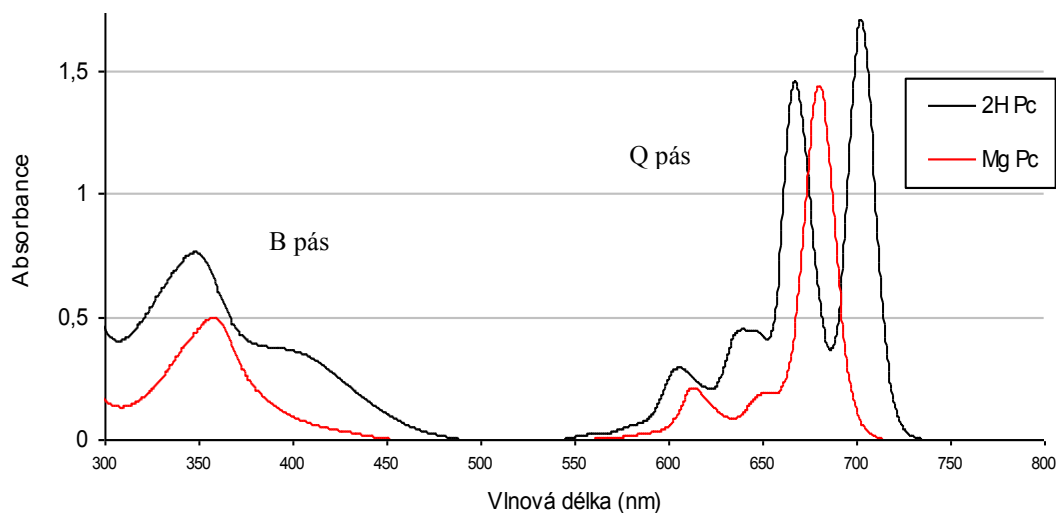
**Obr. 13** Oxidace DPBF singletovým kyslíkem na 1,2-dibenzoylbenzen

## 5. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 5.1. Obecné vlastnosti ftalocyaninů

Experimentální část popisuje přípravu nových derivátů Pc, které by svými vlastnostmi rozšířily skupinu PS vhodných pro PDT. Jedno z hodnotících kritérií PS je jeho produkce singletového kyslíku, a proto volba centrálního atomu ukázala na Zn, Mg, Si a Al, o jejichž pozitivním vlivu na tvorbu ROS u ftalocyaninů dnes není pochyb (zvyšují  $\tau_T$  - „triplet state lifetime“ - fotosensitizeru)<sup>80,81</sup>. Syntézy zároveň směřovaly k posunu absorpční maxima Pc k vyšším vlnovým délkám zajišťující hlubší průnik světla do tkání. Značná pozornost byla věnována také periferním substituentům Pc skeletu, které jednak úspěšně zabraňují agregaci molekul Pc a některé z nich jsou zakončeny funkční skupinou vhodnou ke konjugaci s dalšími molekulami pro vznik PS třetí generace. Charakteristická agregace planárních molekul Pc omezuje z chemického hlediska následné reakce Pc a komplikuje proces získávání chemicky čistých sloučenin. Z hlediska fotofyzikálního způsobuje agregace významné snížení např. kvantového výtěžku singletového kyslíku, kvantového výtěžku fluorescence apod., což je samozřejmě v aplikaci PDT nežádoucí.

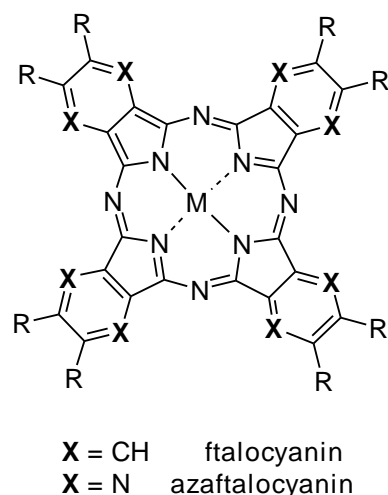
Pro Pc je charakteristické jejich UV-vis spektrum. Vzhledem k makrocyclickému systému konjugovaných  $\pi$  vazeb se vyznačují absorpcí při vyšších vlnových délkách, což způsobuje charakteristické modré nebo zelené zbarvení látek. V absorpčním spektru těchto látek rozeznáváme dva charakteristické pásy. Jeden v oblasti asi 350 nm zvaný Sorretův nebo také B pás. Druhý je v oblasti přibližně 600-800 nm a označuje se jako Q pás. Q pás je u bezkovových Pc rozštěpen na dva pásy, kdežto kovové Pc jsou charakteristické pouze jedním pásem (obr. 14). Tento jev je důležitým rozlišovacím faktorem při kontrole průběhu syntéz.



**Obr.14** Příklad UV-vis spektra bezkovového a kovového Pc s charakteristickým B a Q pásem.



Současně se syntézou ftalocyaninů probíhá na našem pracovišti intenzivní rozvoj makrocyklů typu azaftalocyaninů (AzaPc)<sup>82</sup>. Strukturu AzaPc lze velice snadno odvodit od předlohy Pc izosterní náhradou methinové skupiny (-CH=) v benzenových podjednotkách dusíkovými atomy. Zkušenosti a poznatky o skupině AzaPc jsou cennými zdroji informací pro skupinu Pc, což platí přirozeně i naopak. Oba typy makrocyklů se dočkaly i vzájemného přímého srovnání v inhibici agregace a v produkci singletového kyslíku (viz kapitola 5.2.3.-*Vliv periferních substituentů na agregaci*).



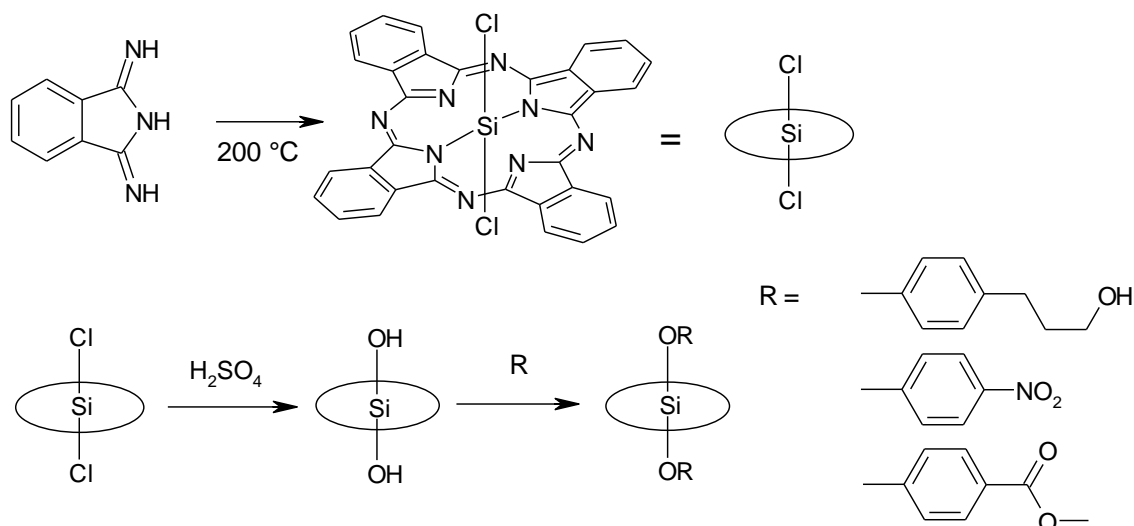
## 5.2. Výsledky a diskuse

### 5.2.1. Syntéza ftalocyaninů s axiálními substituenty na centrálním atomu křemíku a hliníku

Úvodními experimenty jsem se snažil navázat na centrální atom uprostřed ftalocyaninového skeletu objemný substituent, jenž by účinně inhiboval agregaci a současně nesl vhodnou funkční skupinu pro další reakce. Pro následné konjugací reakce byla požadována amino-, hydroxy- nebo karboxylová funkční skupina. Jako centrální atomy byly vybrány atomy křemíku a hliníku, jenž svou přítomností v Pc významně zvyšují produkci singletového kyslíku a zároveň umožňují axiálně vázat objemné ligandy. Atom hliníku v Pc váže pouze jeden ligand, atom křemíku nabízí 2 místa pro axiální ligandy. Výhodou je pak omezený počet ligandů nesoucích funkční skupinu a tím i snadnější čištění v případě směsi konjugátů. Zdrojem hliníku byl komerčně zakoupený trimethylaluminium a křemičitým reaktantem se stal také komerčně zakoupený tetrachlorsilan a propyltrichlorsilan. Současně se syntézami Pc probíhaly snahy o přípravu dalších derivátů silanu, které by agregaci Pc více eliminovali. Pokusy byly však neúspěšné a nejsou v této práci popsány.

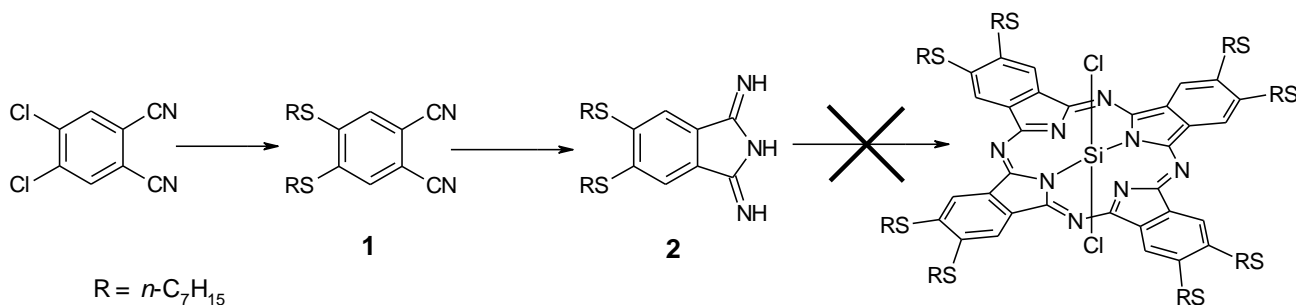
Syntéza Pc s centrálním atomem křemíku (SiPc) je popsána v literatuře<sup>75</sup>, stejně jako následná tvorba axiálně substituovaného derivátu<sup>83</sup>. Tetramerizací nesubstituovaného 1,3-isoindolindiiminu vzniká špatně rozpustná molekula SiPc (obr. 15). Záměnu hydroxylových skupin na místo atomů chlóru provází posun v Q pásu k nižší vlnovým délkám. Rozpuštěním v 2,4,6-kolidinu dosahuje dichlorderivát SiPc hodnoty  $\lambda_{\max}$  při 695 nm zatímco dihydroxyderivát SiPc má  $\lambda_{\max}$  při 668 nm. Dihydroxyderivát SiPc byl výchozí látkou pro následné reakce<sup>75</sup> s objemnějším ligandem, která se uskutečnila společným zahříváním při

vysoké teplotě bez izolace produktů (obr. 15). Větší rozpustnost Pc, průběžně odebraného z reakční směsi, signalizovala pozitivní průběh reakce. Nicméně ani po delší době nebyla reakce uspokojivě kvantitativní a při práci s malým množstvím reaktantů se nepodařilo izolovat produkt. Vzhledem k nesnadné kontrole průběhu reakce a předpokládanému komplikovanému čištění jsme pozastavili další experimenty této metody.

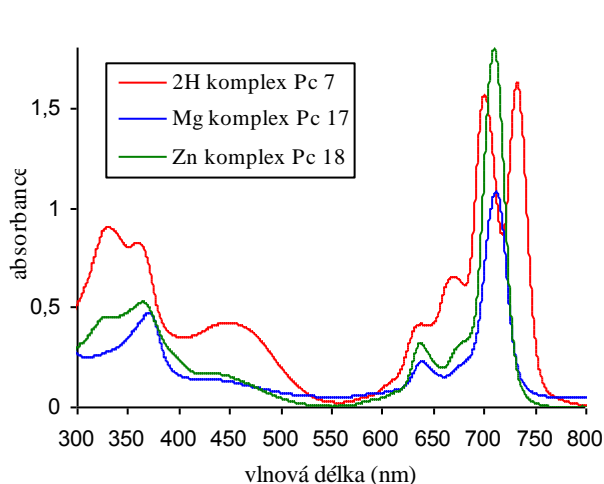


**Obr. 15** Schéma syntézy ftalocyaninů s axiálními substituenty na centrálním atomu křemíku

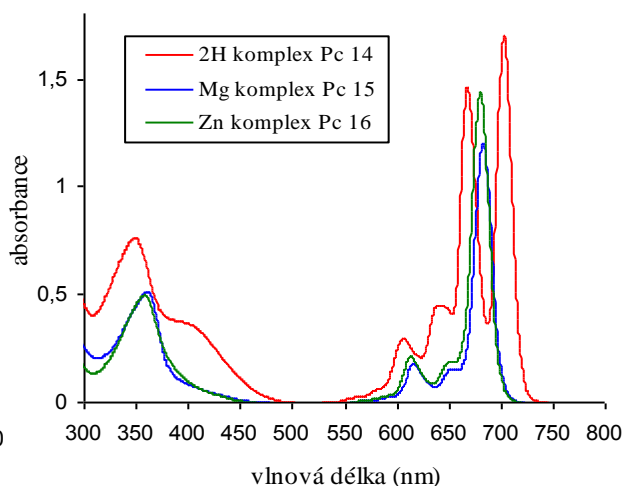
Bylo zřejmé, že Pc skelet musí být substituovaný na periférii, aby se rozpustnost Pc zvýšila a umožnila tak reakce probíhající v roztoku. Výchozí sloučeninou se stal 4,5-dichlorftalonitril, který byl nejprve substituován v poloze 4 a 5 alifatickým alkylsulfanylovým řetězcem<sup>84</sup> (**1**) a poté převeden na reaktivnější derivát 1,3-isoindolindiiminu (**2**). Vazba substituentu přes heteroatom síry měla své opodstatnění v posunu absorpční maxima Q pásma Pc k vyšším vlnovým délkám. Podle paralelních pokusů na jiných Pc lze dosáhnout posunu o 30 nm v případě vazby přes atom síry v porovnání s atomem kyslíku (obr. 17 a 18). K zacyklení na oktasubstituovaný SiPc však nedocházelo (obr. 16). Během reakce zřejmě dochází k rozkladu prekursoru (**2**), což signalizovalo červené zbarvení reakční směsi. V případě pozitivního průběhu reakce se zbarvuje reakční směs do temně zelené barvy.



**Obr. 16** Schéma syntézy SiPc s periferními substituenty vázané přes atom síry

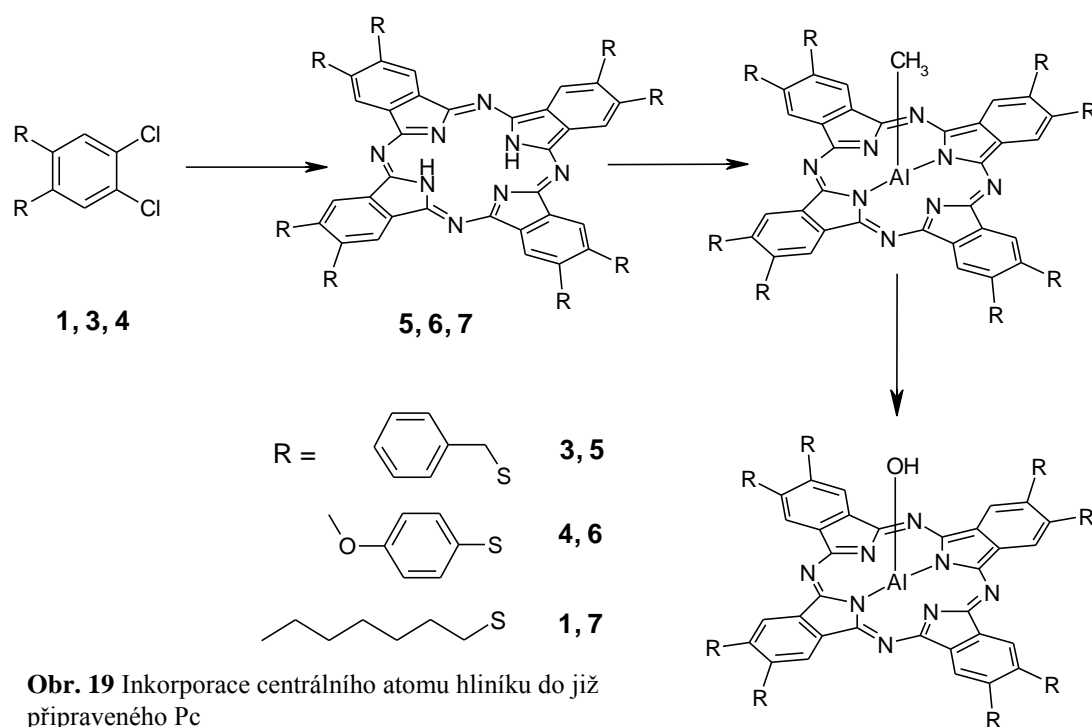


**Obr. 17** Absorpční spektrum Pc s periferními substituenty vázanými přes atom síry (**7**, **17**, **18**)



**Obr. 18** Absorpční spektrum Pc s periferními substituenty vázanými přes atom kyslíku (**14**, **15**, **16**)

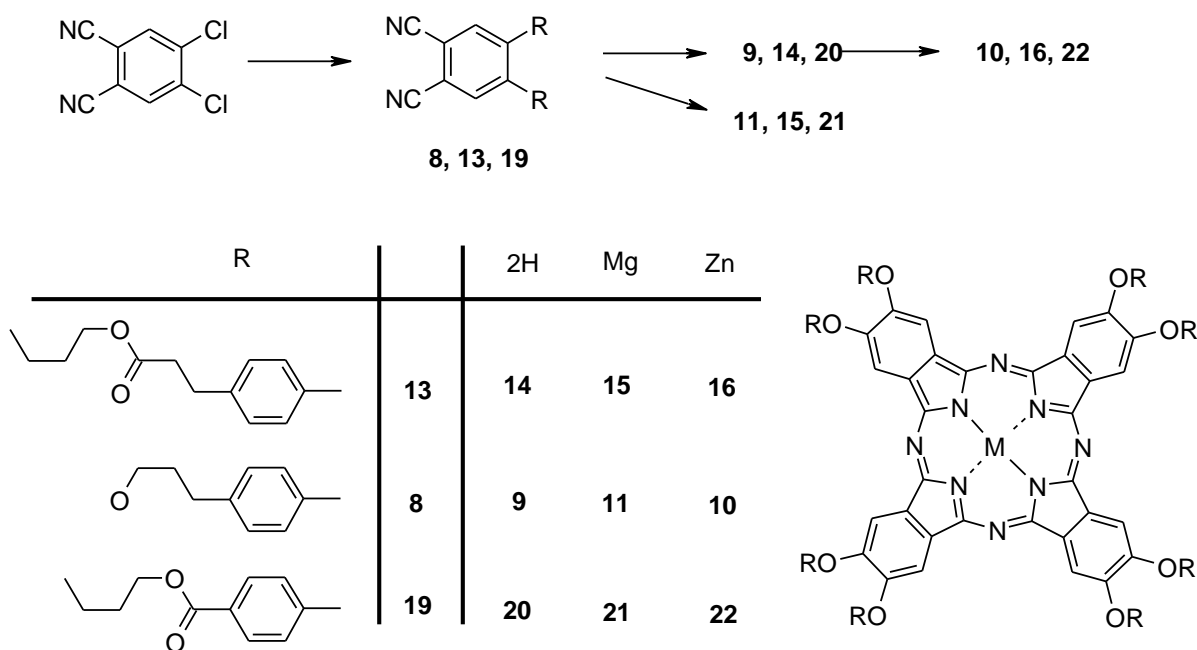
Jiný přístup nabízí inkorporace centrálního atomu hliníku do již připraveného Pc. Reakce vyžaduje rozpustný Pc, práci pod argonovou atmosférou, přísně bezvodé prostředí, které zaručí stabilitu hliníkového reaktantu (trimethylaluminium). Přípravy prekurzorů Pc (**3**, **4**) se zaměřily opět na substituenty vázané přes atom síry, jejichž velikost by mohla stačit pro inhibici agregace. Substituenty neobsahovaly záměrně jakékoliv alkylové řetězce, které měly být součástí ligandu později vázaného na centrální atom hliníku (obr. 19). Tím by se zjednodušila interpretace NMR spekter finálních Pc, která není vždy zcela jasná. Připravené ftalocyaniny (**5**, **6**) však prokázaly velmi omezenou rozpustnost a byly dále nepoužitelné, zatímco makrocyklus Pc **7** vzniklý tetramerizací sloučeniny **1** bránil agregaci spolehlivě.



**Obr. 19** Inkorporace centrálního atomu hliníku do již připraveného Pc

Ačkoliv se proces inkorporace atomu hliníku jevil dle dostupných informací jednoduše, nepřinesl opakovaně očekávaný výsledek. Nutno zmínit, že kontrolou UV-vis spektra byla zjištěna pravděpodobná přítomnost Pc s centrálním kovem hliníku (AlPc) v reakční směsi ( $\lambda_{\max}$  (THF) 734 nm), avšak v množství, které se nedalo izolovat. Po odstranění rozpouštědla za sníženého tlaku došlo překvapivě u AlPc k posunu  $\lambda_{\max}$  směrem k nižším vlnovým délkám (714 nm). Tuto změnu vysvětlujeme uskutečněnou hydrolyzou methylové skupiny za vzniku hydroxyderivátu AlPc, ke které dochází okamžitě po kontaktu se vzdušnou vlhkostí při manipulaci. Samotná hydrolyza není negativní neboť hydroxyderivát AlPc by byl určitě výchozí sloučeninou pro následné reakce na centrálním atomu (analogicky jako v případě SiPc).

Jak je patrné z předchozích odstavců, schématicky jednoduché syntézy SiPc a AlPc provází mnohdy náročné reakční podmínky a případné množství produktu není zatím z ekonomického pohledu výhodné. Lze však očekávat další vývoj v oblasti syntéz periferně a současně axiálně substituovaných SiPc a AlPc, které nabídnou účinnou blokádu agregace a dobrou produkci singletového kyslíku.

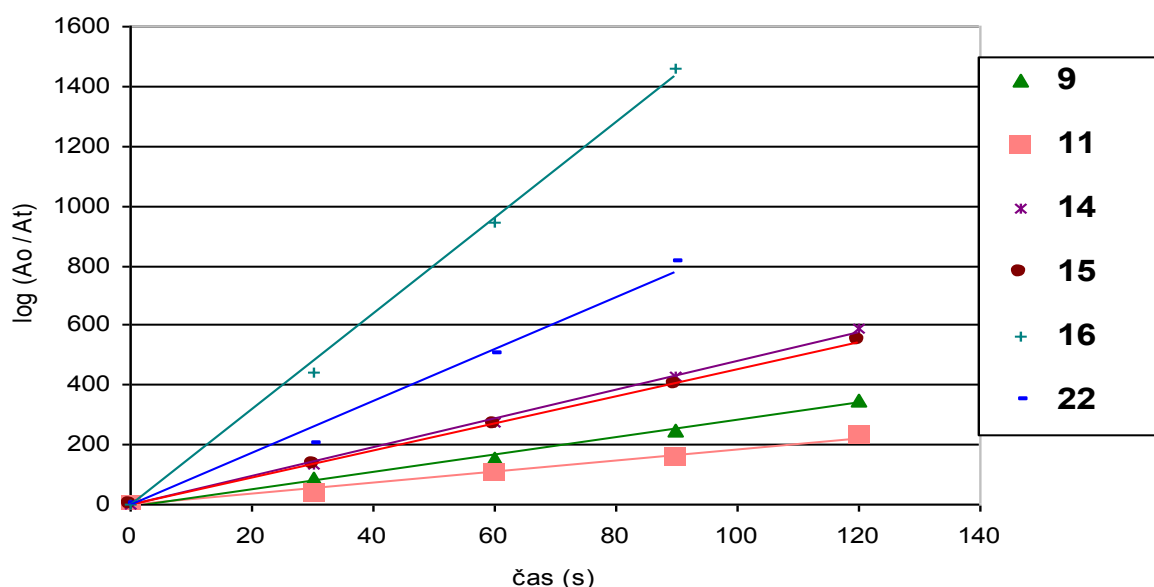


**Obr. 20** Syntéza oktasubstituovaných ftalocyaninů s centrálním atomem zinku a hořčíku

### 5.2.2. Syntéza oktasubstituovaných ftalocyaninů s centrálním atomem zinku a hořčíku

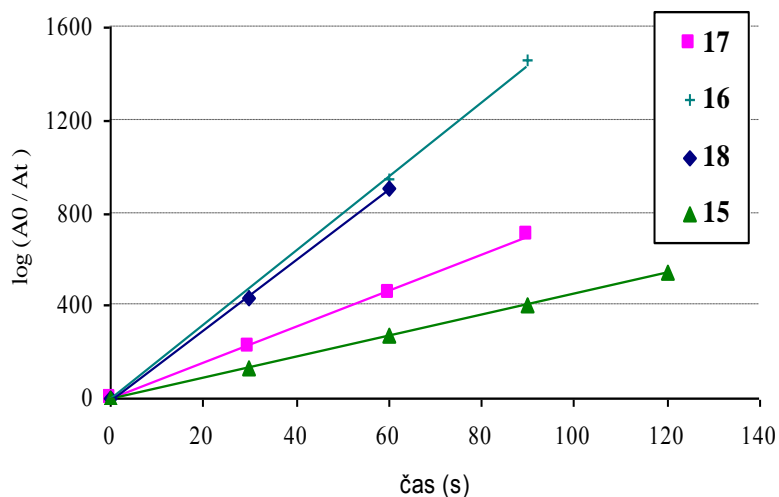
Dalším tématem byla příprava oktasubstituovaných Pc s centrálním atomem zinku a hořčíku. Výběr substituentů se orientoval na struktury s funkční skupinou, která by následně

byla využita pro konjugaci s biosubstrátem<sup>71</sup>, případně umožnila rozpustnost ve vodném prostředí (obr. 20). Zároveň jsme chtěli srovnat produkci singletového kyslíku hořečnatých a zinečnatých komplexů ftalocyaninů a zda-li je různými funkčními skupinami ovlivněna. Sloučeniny **9**, **10**, **11** se odlišovaly od ostatních Pc dobrou rozpustností v ethanolu (díky snížené lipofilitě molekuly způsobené přítomností hydroxylových skupin), který u ostatních Pc sloužil při purifikaci k odstranění některých balastních látek. Roztoky látek **10**, **11**, **15**, **16**, **21**, **22** v THF mají výraznou fluorescenci při excitaci světlem vlnové délky 366 nm, což společně s monomerním spektrem dokazuje přítomnost převážně monomerů v roztoku. Produkce singletového kyslíku byla u látek s hydroxylovými skupinami (**10**, **11**) překvapivě nízká ve srovnání s Pc, jejichž periferní část zakončují esterové skupiny (obr. 21).



**Obr. 21** Linearizované závislosti rozkladu DPBF singletovým kyslíkem na době ozáření. Směrnice takto linearizovaných vztahů lze použít pro jednoduché srovnání účinnosti připravených Pc (viz kapitola 5.3.2.- *Měření produkce singletového kyslíku*).

Pc s esterovými vazbami byly původně připravovány jako methylestery (z výchozích látek **13** a **19**). Jak jsme ovšem zjistili, dochází při tetramerizaci prekurzorů **13** a **19** v prostředí bezvodého butanolu u sloučenin **14** – **16** a **20** – **22** k reesterifikaci na periferních substituentech. Reesterifikace však není zcela kompletní a tak lze nalézt v NMR spektrech takto připravených Pc signály výchozího methylesteru vůči butylesteru v poměru přibližně 1:9. Přítomnost delších i kratších alifatických řetězců ovšem nijak nenarušuje srovnání těchto látek mezi sebou. Po hydrolyze esterových vazeb a vytvoření sodné soli na substituentech se makrocycly Pc dobře rozpouštěly ve vodě, avšak fluorescence se ztratila. Příčinou je zřejmě tvorba dimerů těchto sloučenin ve vodném prostředí. Pozoruhodná byla i menší produkce <sup>1</sup>O<sub>2</sub>

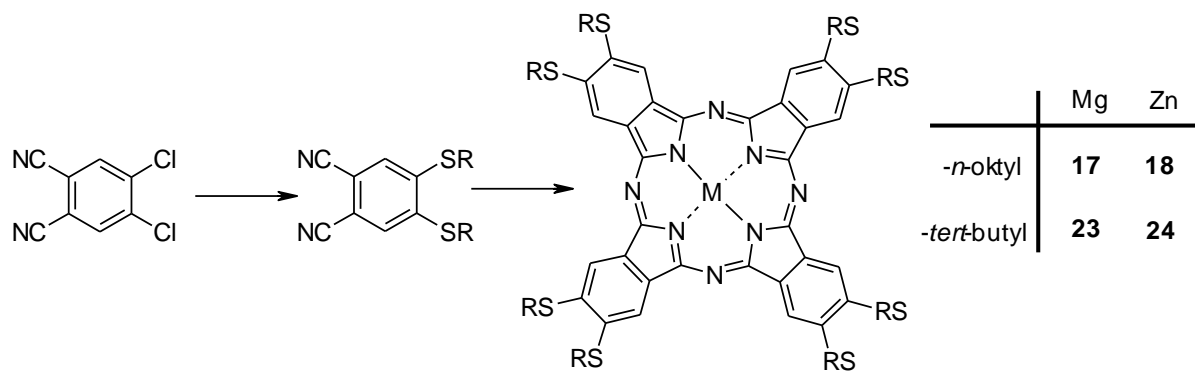


**Obr.22** Rozklad DPBF v roztocích komplexů Pc substituovaných přes kyslík (**15**, **16**) a síru (**17**, **18**)

hořečnatých komplexů **11**, **15** než odpovídajících bezkovových Pc **9** a **14** (obr. 21), pro kterou zatím neznáme odpověď. Provedená měření potvrdila obecně výrazně lepší produkci  $^1\text{O}_2$  zinečnatými komplexy Pc než jejich hořečnatými analogy (obr.22).

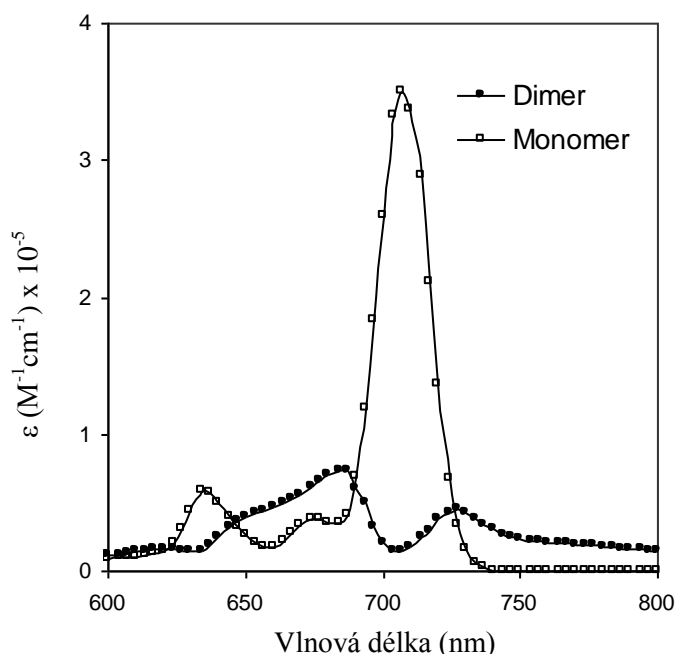
### 5.2.3. Vliv periferních substituentů na agregaci

V rámci přípravy nových PS jsme se zaměřili i na problematiku agregace planárních molekul ftalocyaninů a azaftalocyaninů. Vliv postranní substituce na tvorbu dimerů a na produkci singletového kyslíku byl sledován na Pc a jeho analogu AzaPc, jejichž periferii tvořilo osm *n*-oktylsulfanyl nebo *tert*-butylsulfanyl skupin (obr. 23) (syntéza, charakteristika a metodika měření a výpočtů je obsažena v publikaci – viz Příloha č. 1). Přítomnost dimerů ovlivňuje výrazným způsobem produkci singletového kyslíku. PS v agregované formě je sice excitován do stavu  $S_1$ , ale z této energetické hladiny se vrací do základního stavu  $S_0$  převážně tzv. vnitřní konverzí za vydání absorbované energie ve formě tepla. Nedochozí proto k zářivým procesům (fluorescenci) nebo „mezisystémovému přechodu“ (ISC) a tudíž ani k procesům vycházejících z tripletového stavu  $T_1$  (fosforescence, fotoprocesy typu I a II).



**Obr 23** Příprava Pc pro určení vlivu postranní substituce na tvorbu dimerů.

Vznik dimerů se projevuje výrazným poklesem extinkčních koeficientů v oblasti Q pásu, který mění svůj tvar díky jinému UV-vis spektru přítomných dimerů (obr. 24). Na tvorbu dimerů má negativní vliv vyšší teplota a nižší koncentrace sloučeniny. Důležitý je i



**Obr. 24** Rozdílná UV-vis spektra monomeru a dimeru sloučeniny **17**

výběr rozpouštědla. Z námi zkoušených rozpouštědel byl pro naše měření nejvhodnější toluen. Z experimentu vyplynulo, že pro dostatečnou inhibici agregace není třeba příliš dlouhých alifatických substituentů. Lepší výsledky inhibice agregace byly dosaženy u rozvětvené periferní substituce. V přímém srovnání zabránění tvorby Pc a AzaPc agregátů sice vítězí skupina Pc, kterou však značně zatěžuje pozorovaný rozklad makrocyklu vlivem pravého photobleachingu (přibližně 30-40 % během 4 hodin).

### 5.3. PRAKTICKÁ ČÁST

$^{13}\text{C}$  a  $^1\text{H}$  NMR spektra byla měřena na přístroji Varian Mercury VxBB 300 při 75 MHz a 300 MHz s vnitřním standardem TMS. UV-vis spektra poskytl spektrofotometr Shimadzu UV 2401 PC. Infračervená spektra (IČ) byla naměřena na spektrometru Nicolet Impact 400 v KBr tabletách (vlnočty jsou udány v  $\text{cm}^{-1}$ ). Teploty tání byly stanoveny na digitální přístroji pro stanovování teplot tání Electrothermal IA9200 a nejsou korigovány. Při sloupcové chromatografii byl použit silikagel Merck 60, 230-400 mesh. Kontrola průběhu reakcí a čistota produktů byly kontrolovány TLC na deskách Silufol UV 254 a detekovány UV světlem o vlnové délce 254 a 366 nm. Rozpouštědla byla použita ve stavu v jakém byla komerčně zakoupena. Bezvodý butanol byl skladován nad hořčíkem a potřebná množství nadestilována v čase potřeby. Hydrid sodný byl používán ve formě 60 % suspenze v minerálním oleji.

### 5.3.1. Syntetická část

Sloučeniny **2** a **12** postrádají údaj o teplotě tání, neboť se jedná pouze meziproducty, jejichž struktura byla potvrzena buď NMR spektry nebo byly použity bez zdlouhavé purifikace do dalších reakcí. V případě ftalocyaninů nastaly obtíže s interpretací NMR spekter v aromatické oblasti makrocyklů v podobě chybějících nebo obtížně identifikovatelných signálů. Přítomnost signálů periferních substituentů, dobrá rozpustnost, zbarvení roztoků a charakteristické spektrum v UV-vis oblasti světla nám popisují vznik příslušného chromoforu Pc. Chromatografické čištění ftalocyaninů na koloně není vždy plně uspokojivé a práci komplikuje nestálost Pc v roztocích v přítomnosti světla. Rozkladné producty ftalocyaninů se objevují poměrně rychle a negativně ovlivňují již tak nízkou výtěžnost syntéz.

Sloučeniny **19**, **20** jsou již popsány v literatuře<sup>85</sup>, přípravy kovových komplexů **21** a **22** jsou provedeny stejným postupem jako u sloučenin **15** a **16**.

Přípravy **17**, **18**, **23**, **24** jsou popsány v Příloze č. 1<sup>86</sup>.

#### *Příprava ftalocyaninatodichlorokřemičitého komplexu bez periferních substituentů*

Do 5 ml bezvodého chinolinu se pod dusíkovou atmosférou vpraví injekční jehlou 0,58 g (3,44 mmol; 0,39 ml) tetrachlorsilanu, směs se zakaluje a po dosažení přibližně 200 °C se přidá 0,50 g (3,44 mmol) isoindolindiiminu. Reakce se udržuje při 220 °C jednu hodinu. Po vychladnutí se vzniklý Pc promývá na fritě methanolem, acetonem do odbarvení protékajících rozpouštědel, případně se pročistí v Soxhletově extraktoru. Výsledkem je temně modrá sloučenina (75 mg) s omezenou rozpustností.

*Ftalocyaninatodihydroxykřemičitý komplex* se získá po dvouhodinovém míchání dichlorderivátu v koncentrované kyselině sírové<sup>75</sup> při 50 °C.

#### *Příprava a substituce na SiPc a AlPc*

##### *4,5-bis(heptylsulfanyl)ftalonitril (1)*

0,426 g (17,77 mmol) hydridu sodného se suspenduje do baňky s 20 ml bezvodého DMF a postupně se přikapává 1,975 g (14,93 mmol) heptanthiolu. Po dokončení vývoje vodíku se přisype směs 1,400 g (7,11 mmol) 4,5-dichlorftalonitrilu a 2,033 g (14,22 mmol) oxidu měďného. Pak se reakční směs intenzivně míchá při 90 °C po dobu 3 hodin pod dusíkovou atmosférou. Po ukončení reakce se odfiltruje katalyzátor, přidá se voda a vzniklý precipitát se



rozpustí v chloroformu. Oddělená organická část se protřepe s amoniakem a po odstranění rozpouštědla se nanese na chromatografickou kolonu. Jako mobilní fáze se použije chloroform. Výtěžek 2,51 g (91 %) jemně nazelenalých krystalů, t.t. 62-63 °C. IČ 3076 (arom. C-H); 2951; 2927; 2857 (alif C-H); 2229; 2238 (CN). <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 7,40 (s; 2H; arom CH); 3,01 (t; *J* = 7,4 Hz; 4H; CH<sub>2</sub>); 1,47 (p; *J* = 7,4 Hz; 4H; CH<sub>2</sub>); 1,53 – 1,41 (m; 4H; CH<sub>2</sub>); 1,40 – 1,21 (m; 12H; CH<sub>2</sub>); 0,89 (t; *J* = 6,9; 6H; CH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 144,2; 128,0; 115,7; 111,0; 32,6; 31,6; 28,8; 28,7; 28,0; 22,5; 14,0.

#### *5,6-bis(heptylsulfanyl)isoindolin-1,3-diimin (2)*

1,2 g (3,09 mmol) 4,5-bis(heptylsulfanyl)ftalonitrilu se rozpustí v 30 ml bezvodého methanolu, přidá se methanolát sodný (6,18 mmol), který slouží jako katalyzátor. Směs se probublává suchým NH<sub>3</sub> nejprve 1 hodinu při laboratorní teplotě a poté 2 hodiny při varu. Methanol se odpaří za sníženého tlaku a přidáním vody vzniká precipitát, který se překrystalizuje v methanolu a vysuší v exsikátoru. Produkt má nazelenalou barvu, výtěžek byl 0,7 g (56 %). Produkt nebyl dále čištěn a po krystalizaci byl přímo použit do dalších reakcí.

#### *4,5-bis(benzylsulfanyl)ftalonitril (3)*

Postup je shodný s přípravou sloučeniny **1**. 0,14 g (1,12 mmol; 0,13 ml) fenylmethanthiolu se přikape do suspenze 0,58 g (2,4 mmol) hydridu sodného v 6 ml bezvodého DMF, následuje přidání 0,10 g (0,51 mmol) 4,5-dichlorftalonitrilu a 0,15 g (1,02 mmol) Cu<sub>2</sub>O. Pro čištění na chromatografické koloně postačí samotný dichlormethan. Výtěžek 0,132 g (71 %), t.t. 186-188 °C. Anal. kalk. (C<sub>22</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>S<sub>2</sub>) C 70,94; H 4,33; N 7,52; S 17,21; nalez. C 70,81; H 4,42; N 7,53; S 16,17. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 7,42 (s; 2H; Ar-H); 7,36-7,30 (m; 10H; Ar-H); 4,22 (s; 4H; -S-CH<sub>2</sub>). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 143,9; 141,3; 129,0; 128,9; 128,2; 126,4; 115,3; 113,2; 37,5.

#### *4,5-bis-(4-methoxyfenylsulfanyl)ftalonitril (4)*

Syntéza se provádí analogicky jako v případě přípravy sloučeniny **1** za přidání 1,63 g (11,56 mmol) (4-methoxyfenyl)methanthiolu do suspenze 0,42 g hydridu sodného v 50 ml bezvodého DMF. Po přidavku 1,04 g (5,26 mmol) 4,5-dichlorftalonitrilu a 1,50 g Cu<sub>2</sub>O se směs zahřívá 2 hodiny při 90 °C. Výtěžek 1,45 g (68 %), t.t. 194 °C. Anal. kalk. (C<sub>22</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>S<sub>2</sub>) C 65,32; H 3,99; N 6,93; O 7,91; S 15,85; nalez. C 65,09; H 4,02; N 6,95; O 8,13; S 14,06. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 7,49 (d; 4H; *J* = 8,2 Hz; Ar-H); 7,04 (d; 4H; *J* = 8,9 Hz; Ar-H); 6,86 (s; 2H; Ar-H); 3,90 (s; 6H; -O-CH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 161,6; 144,5; 137,4; 128,7; 118,0; 116,3; 115,6; 111,0; 55,5.

*2,3,9,10,16,17,23,24-oktakis(benzylsulfanyl)ftalocyanin (5)*

0,1 g (0,268 mmol) 4,5-bis(benzylsulfanyl)ftalonitrilu se zahřívá k varu v 10 ml bezvodého butanolu s přídavkem 0,06 ml 1,8-diazabicyclo[5,4,0]undec-7-enu (DBU). Reakce v dusíkové atmosféře byla po 36 hodinách ukončena. Produkt se promývá methanolem pro odstranění nečistot a výsledkem je 0,031 g tmavě zelené pevné látky. Vzhledem k nerozpustnosti nebylo možné strukturu blíže analyzovat.

*2,3,9,10,16,17,23,24-oktakis(4-methoxyfenylsulfanyl)ftalocyanin (6)*

Stejný postup přípravy jako u látky **5** se stejným výsledkem.

*2,3,9,10,16,17,23,24-oktakis(heptylsulfanyl)ftalocyanin (7)*

0,05 g (12,86 mmol) 4,5-bis(heptylsulfanyl)ftalonitrilu se rozpustí v 6 ml bezvodého butanolu a přidá se 0,02 g (12,86 mmol) DBU. Směs se pod zpětným chladičem zahřívá k varu po dobu 24 hodin. Vzniklý produkt se odfiltruje, promyje methanolem a poté se přečistí sloupcovou chromatografií s chloroformovou mobilní fází. Výtěžek 0,019 g (38 %) zelené pevné látky. UV-vis  $\lambda_{\max}$  (pyridin) 375; 700; 720 (nm).

*4,5-bis-[4-(3-hydroxypropyl)fenoxy]ftalonitril (8)*

1,0 g (5,076 mmol) 4,5-dichloroftalonitrilu a 2,32 g (15,23 mmol) 4-(3-hydroxypropyl)fenolu se míchají při 90 °C v 10 ml bezvodého DMSO, každých 5 minut se do směsi přisype 1,4 g (10,15 mmol) vysušeného K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, celkem osmkrát. Po posledním přidání K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> se reakční směs ještě 30 minut zahřívá. Po ochlazení se nalije do vody s ledem, vzniklá sraženina se odsaje a promývá několikrát vodou. Produkt se rozpustí v methanolu, nanese na silikagel a přečistí na chromatografickém sloupci za použití nejprve diethyléru a následně ethylacetátu jako mobilní fáze. Výtěžek 2,0 g (78 %), t.t. 99-102 °C. IČ 3483 (OH); 3043 (arom. CH); 2938; 2862 (alif. CH); 2228 (CN). <sup>1</sup>H NMR (aceton-d<sub>6</sub>)  $\delta$  7,53 (s; 2H; arom. CH); 7,30 (d; 4H;  $J = 8,7$  Hz; arom. CH); 7,07 (d; 4H;  $J = 8,7$  Hz; arom. CH); 3,56 (t; 4H;  $J = 4,9$  Hz; -CH<sub>2</sub>-O); 2,71 (t, 4H;  $J = 8,0$  Hz; -CH<sub>2</sub>-arom.); 1,86-1,75 (m; 4H; -CH<sub>2</sub>-). <sup>13</sup>C NMR (aceton-d<sub>6</sub>)  $\delta$  153,8; 152,9; 140,5; 131,1; 124,3; 120,0; 116,0; 111,4; 61,5; 35,4; 32,0.

*2,3,9,10,16,17,23,24-oktakis[4-(3-hydroxypropyl)fenoxy]ftalocyanin (9)*

Po rozpuštění 0,15 g (0,35 mmol) látky **8** v 10 ml horkého bezvodého butanolu se přidá 12,7 ml (1,05 mmol) DBU a reakční směs se zahřívá k varu pod zpětným chladičem po dobu 20

hodin pod argonovou atmosférou. Produkt reakce se odcentrifuguje a zbaví nečistot promýváním methanolem a acetonem. Výtěžek 0,058 g (39 %).  $^1\text{H}$  NMR (pyridin- $d_5$ )  $\delta$  7,61-7,46 (m; 16H; arom. CH); 7,42-7,30 (m; 16H; arom. CH); 7,20 (s; 8H; arom. CH); 6,28-5,76 (bs; 8H; -OH); 4,05-3,90 (m; 16H; O-CH<sub>2</sub>); 3,00-2,85 (m; 16H; -CH<sub>2</sub>-arom.); 2,20-2,05 (m; 16H; -CH<sub>2</sub>-).  $^{13}\text{C}$  NMR (pyridin- $d_5$ )  $\delta$  156,0; 154,2; 151,2; 138,2; 130,4; 118,6; 116,1; 111,5; 61,4; 35,5; 32,1. UV-vis  $\lambda_{\text{max}}$  (pyridin) 345; 676; 703 (nm).

*{2,3,9,10,16,17,23,24-oktakis[4-(3-hydroxypropyl)fenoxy]ftalocyaninato}zinečnatý komplex (10)*

0,060 g (0,035 mmol) látky **9** se rozpustí v 8 ml bezvodého DMF, poté se přidá vysušený octan zinečnatý (0,032 g; 0,175 mmol) a reakce se udržuje 2 hodiny ve varu v inertní atmosféře. Po ukončení reakce se rozpouštědlo oddestiluje za sníženého tlaku a precipitát promývá vodou a poté ethanolem. Výtěžek 0,045 g (72 %).  $^1\text{H}$  NMR (pyridin- $d_5$ )  $\delta$  7,42-7,24 (m; 32H; arom. CH); 7,10 (s; 8H; arom. CH), 6,14-6,05 (m; 8H; -OH); 4,00-3,85 (m; 16H; -CH<sub>2</sub>-O); 2,95-2,80 (m; 16H; -CH<sub>2</sub>-arom.); 2,14-1,96 (m; 16H; -CH<sub>2</sub>-).  $^{13}\text{C}$  NMR (pyridin- $d_5$ )  $\delta$  156,5; 153,5; 150,8; 137,9; 130,3; 118,2; 115,7; 111,2; 61,3; 35,5; 32,0. UV-vis  $\lambda_{\text{max}}$  (THF) 354; 676 (nm).

*{2,3,9,10,16,17,23,24-oktakis[4-(3-hydroxypropyl)fenoxy]ftalocyaninato}hořečnatý komplex (11)*

0,2 g aktivovaného hořčíku se zahřívá společně s malým krystalkem jódu v 10 ml bezvodého butanolu po dobu přibližně 5 hodin při teplotě 140 °C. Ke vzniklému butanolátu hořečnatému se přisype 0,15 g (0,35 mmol) látky **8** a zahřívání k varu pokračuje další 4 hodiny. Po vychladnutí směsi se butanolát rozpustí ve zředěné kyselině octové, produkt se odfiltruje a následuje čištění na chromatografické koloně nejprve samotným DCM a poté soustavou DCM/methanol (8:1). Výtěžek 0,049 g (32 %) temně zeleného Pc dobře rozpustného v pyridinu, ale i v ethanolu.  $^1\text{H}$  NMR (pyridin- $d_5$ )  $\delta$  7,36-7,24 (m; 16H; arom. CH); 7,22-7,14 (m; 16H; arom. CH); 6,27-5,84 (bs; 8H; OH); 3,95-3,75 (m; 16H; O-CH<sub>2</sub>); 2,92-2,70 (m; 16H; -CH<sub>2</sub>-arom.); 2,11-1,88 (m; 16H; -CH<sub>2</sub>-).  $^{13}\text{C}$  NMR (pyridin- $d_5$ )  $\delta$  156,6; 154,1; 150,8; 137,7; 130,5; 118,1; 116,0; 112,1, 61,3; 35,5; 31,9. UV-vis  $\lambda_{\text{max}}$  (pyridin) 358; 682 (nm).

*Methylester kyseliny 3-(4-hydroxyfenyl)propanové (12)*

3,2 g (27 mmol) chloridu thionylu se přikape do 2 ml bezvodého methanolu, reakční směs se udržuje na teplotě 0 °C, doplní se odpařený methanol a reakce se nechá hodinu míchat při laboratorní teplotě. Přidá se 3,0 g (18 mmol) kyseliny 3-(4-hydroxyfenyl)propanové rozpuštěné v bezvodém methanolu, směs se míchá 30 minut, poté se zneutralizuje roztokem hydrogenuhličitanu sodného a extrahuje do chloroformu. Výtěžek 3,24 g (99 %) lehce nažloutlých krystalů. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 7,04 (d; 2H; *J* = 8,4 Hz; arom. H); 6,75 (d; 2H; *J* = 8,2 Hz; arom. H); 5,60 (bs; 1H; OH); 3,68 (s; 3H; CH<sub>3</sub>); 2,88 (t; 2H; *J* = 7,4 Hz; CH<sub>2</sub>); 2,60 (t; 2H; *J* = 7,5 Hz; CH<sub>2</sub>). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 173,9; 154,1; 132,3; 129,4; 115,3; 51,8; 36,0; 30,0.

*Methylester kyseliny 3-(4-{4,5-dikyano-2-[4-(2-methoxykarbonylethyl)fenoxy]fenoxy}fenyl)propanové (13)*

0,82 g (4,16 mmol) 4,5-dichlorftalonitrilu a 3,00 g (16,65 mmol) sloučeniny **12** se rozpustí v 10 ml bezvodého DMSO a míchá při 90 °C, po rozpuštění se přidává bezvodý uhličitán draselný 0,68 g (5,55 mmol) po 5 minutách, celkem osmkrát. Po zreagování směsi (po 30 minutách) se produkt nalije na ledovou tříšť. Vysrážená směs se rozpustí v chloroformu a protřepe s vodou. Organická frakce se přečistí sloupcovou chromatografií směsí rozpouštědel benzín/diethylether (1:1). Výtěžek 1,81 g (90 %) bezbarvých krystalů, t.t. 134,5-135,5 °C. Anal. kalk. (C<sub>28</sub>H<sub>24</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>) C 69,41; H 4,99; N 5,78; nalezeno C 69,40; H 5,23; N 5,84. IČ 3039 (arom. C-H); 2949 (alif C-H); 2229 (CN); 1731 (ester C=O). <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 7,43 – 7,39 (m; 6H; arom. CH); 7,15 (d; *J* = 8,1 Hz; 4H; arom. CH); 3,82 (s; 6H; CH<sub>3</sub>); 3,13 (t; *J* = 7,7 Hz; 4H; CH<sub>2</sub>); 2,80 (t; *J* = 7,7 Hz; 4H; CH<sub>2</sub>). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 173,0; 152,3; 152,0; 138,4; 130,4; 121,5; 120,1; 115,0; 110,1; 51,7; 35,5; 30,2.

*2,3,9,10,16,17,23,24-oktakis[4-(2-butoxykarbonylethyl)fenoxy]ftalocyanin (14)*

0,50 g (1,03 mmol) prekurzoru **13** se za horka rozpustí v 50 ml bezvodého butanolu, přidá se 0,47 g (3,09 mmol) DBU a směs se zahřívá pod zpětným chladičem po dobu 48 hodin. Vzniká suspenze, která se odfiltruje a promyje methanolem. Produkt se na sloupci přečistí chloroformem. Výtěžek 0,38 g (64,8 %) tmavě zelených krystalků. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 8,58 (bs; 8H; arom. CH); 7,37 – 7,11 (m; 32H; arom. CH); 4,12 (t; *J* = 6,5 Hz; 16H; O-CH<sub>2</sub>); 3,71 (s; 3H; CH<sub>3</sub>); 2,95 (t; *J* = 7,6 Hz; 16H; CH<sub>2</sub>); 2,64 (t; *J* = 8,0 Hz; 16H; CH<sub>2</sub>); 1,69 – 1,57 (m; 16H; CH<sub>2</sub>); 1,47 - 1,31 (m; 16H; CH<sub>2</sub>); 0,93 (t; *J* = 7,4 Hz; 24H; CH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ

173,0; 155,7; 150,5; 148,0; 135,7; 132,0; 129,6; 118,3; 114,3; 64,4; 51,6; 36,0; 30,7; 30,3; 19,1; 13,7. UV-vis  $\lambda_{\text{max}}$  (pyridin) 344; 675; 702 (nm).

*{2,3,9,10,16,17,23,24-oktakis[4-(2-butoxykarbonylethyl)fenoxyl]ftalocyaninato}hořečnatý komplex(15)*

Stejně jako u látky **11** se reakce zahájí tvorbou butanolátu hořečnatého, pro který se použije 0,25 g (10,30 mmol) kovového hořčíku a jod. Po přidavku 0,50 g (1,03 mmol) sloučeniny **13** se směs refluxuje 2 hodiny. Vzniklá suspenze se odstředí na centrifuze, promyje methanolem, acetonem a zředěnou kyselinou octovou. Produkt se přečistí na sloupci pomocí chloroformu jako mobilní fáze. Výtěžkem bylo 0,17 g (29 %) tmavě zelených krystalů.  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  9,37 – 9,01 (m; 8H; arom. CH); 7,93 – 6,81 (m; 32H; arom. CH); 4,32 – 3,95 (m; 16H; O-CH<sub>2</sub>); 3,19 (s; 3H; CH<sub>3</sub>); 3,10 – 2,80 (m; 16H; CH<sub>2</sub>); 2,78 – 2,46 (m; 16H; CH<sub>2</sub>); 1,73 – 1,48 (m; 16H; CH<sub>2</sub>); 1,48 - 1,16 (m; 16H; CH<sub>2</sub>); 1,02 – 0,64 (m; 24H; CH<sub>3</sub>).  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  173,0; 156,2; 150,0; 135,2; 132,2; 129,5; 117,8; 114,5; 64,4; 36,1; 30,7; 30,3; 19,1; 13,7. UV-vis  $\lambda_{\text{max}}$  (pyridin) 358; 682 (nm).

*{2,3,9,10,16,17,23,24-oktakis[4-(2-butoxykarbonylethyl)fenoxyl]ftalocyaninato}zinečnatý komplex (16)*

0,050 g (21,4 mmol) sloučeniny **14** a 0,004 g (21,4 mmol) octanu zinečnatého se zahřívají k varu ve směsi rozpouštědel toluen/DMF (3:2) přibližně 2 hodiny. Poté se odpaří rozpouštědla za sníženého tlaku. Produkt se přečistí na sloupci pomocí chloroformu jako mobilní fáze. Bylo získáno 0,045 g (89 %) tmavě modré sloučeniny.  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  9,82 – 8,03 (m; 8H; arom. CH); 8,03 – 6,38 (m; 32H; arom. CH); 4,23 – 3,75 (m; 16H; O-CH<sub>2</sub>); 3,17 (s; 3H; CH<sub>3</sub>); 3,07 – 2,63 (m; 16H; CH<sub>2</sub>); 2,63 - 2,09 (m; 16H; CH<sub>2</sub>); 1,76 – 1,42 (m; 16H; CH<sub>2</sub>); 1,42 – 1,00 (m; 16H; CH<sub>2</sub>); 1,00 – 0,55 (m; 24H; CH<sub>3</sub>).  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  172,9; 156,2; 149,9; 135,2; 129,3; 117,8; 113,8; 64,3; 51,0; 36,1; 30,7; 30,6; 19,1; 13,7. UV-vis  $\lambda_{\text{max}}$  (pyridin) 354; 682 (nm).

*{2,3,9,10,16,17,23,24-oktakis(oktylsulfanyl)ftalocyaninato}hořečnatý komplex (17)*

*{2,3,9,10,16,17,23,24-oktakis(oktylsulfanyl)ftalocyaninato}zinečnatý komplex (18)*

*{2,3,9,10,16,17,23,24-oktakis(tert-butylsulfanyl)ftalocyaninato}hořečnatý komplex (23)*

*{2,3,9,10,16,17,23,24-oktakis(tert-butylsulfanyl)ftalocyaninato}zinečnatý komplex (24)*

### 5.3.2. Měření produkce singletového kyslíku

Produkce singletového kyslíku byla měřena chemickou metodou s DPBF jako akceptorem. Vznikající singletový kyslík okamžitě reaguje s přítomným DPBF a rozkládá ho. Úbytek DPBF se stanoví jako pokles absorbance při 417 nm (absorpční maximum DPBF). Pro odfiltrování nižších vlnových délek jsme použili Hoya-G filtr, který odstraní ze spektra světlo pod 520 nm. DPBF tudíž neabsorbuje žádné elektromagnetické vlnění a nedochází k jeho fotodestrukci bez přítomnosti PS. Na druhou stranu je transmitance filtru od 580 nm konstantní a dosahuje takřka 100 % hodnot, což umožňuje aktivaci PS v oblasti jeho Q-pásu<sup>87</sup>.

Vlastní měření probíhá z větší části ve tmě, aby nedocházelo k ovlivnění výsledků po ozáření měřeného roztoku světlem v laboratoři. Připraví se roztok Pc v pyridinu o přesné koncentraci 100  $\mu\text{M}$ , který se těsně před použitím zředí na 2  $\mu\text{M}$  (roztok A). Dále se připraví roztok DPBF v pyridinu o přesné koncentraci 100  $\mu\text{M}$  (roztok B), což je dvojnásobná koncentrace než bude v měřeném roztoku. Připravený roztok B je nutné uchovávat ve tmě. Ve tmě se smísí ekvivalentní díly připraveného roztoku A a B, aby vznikl roztok v dostatečném množství pro všechna měření daného PS (roztok C). Také tento roztok je nutno uchovávat důsledně ve tmě (konc. Pc 1  $\mu\text{M}$ ; konc. DPBF 50  $\mu\text{M}$  v měřeném roztoku).

Opět ve tmě se převedou 3,5 ml připraveného roztoku C do skleněné zkumavky s magnetickým míchadlem. Zkumavka se vloží do temného boxu opatřeného magnetickou míchačkou a otvorem s filtrem a přikryje neprůsvitným krytem. Poté se stanovovaný roztok ozařuje přes filtr ze zdroje světla (halogenová lampa OSRAM 200W) po zvolenou dobu. Po ukončení ozařování se roztok ve tmě převede do kyvety a změří se jeho absorbance při 417 nm. Měření se opakuje s novými 3,5 ml roztoku C pro další ozařovací doby. Měření se provádějí převážně pro časy 30 s, 60 s, 90 s, 120 s, 240 s a 360 s, ale ozařovací doby lze modifikovat dle rychlosti rozkladu DPBF fotosensitizerem. Z hodnot absorbancí při 417 nm pro jednotlivá měření poté dostáváme hodnoty  $A'_t$ . Při 417 nm je nutno změřit také absorbanci roztoku C bez ozáření (hodnota  $A'_0$ ) a hodnotu absorbance roztoku A o poloviční koncentraci ( $A^{417}_{PS}$ ). Hodnoty  $A_0$  a  $A_t$  nezátížené chybou absorbance PS při 417 nm obdržíme z rovnic:

$$A_0 = A'_0 - A^{417}_{PS}$$

$$A_t = A'_t - A^{417}_{PS}$$

Výsledky lze zpracovat do grafů dvěma základními způsoby.

Jednou z možností je zakreslit závislost procentuálního množství zbylého DPBF v roztoku na ozařovací době  $t$  (závislost  $100 \cdot A_t / A_0$  na  $t$ ).

Druhou možností je linearizovat závislost na ozařovací době vztahem  $\log(A_0/A_t)$ .

Směrnice  $k$  takto linearizovaných vztahů lze poté použít k přímému srovnání jednotlivých látek mezi sebou. Tato metoda je pouze komparativní a k vyjádření absolutní hodnoty  $\Phi_\Delta$  by bylo potřeba porovnat látky s vhodným standardem o známé hodnotě  $\Phi_\Delta$  v pyridinu.

## 6. SOUHRN

V průběhu práce se mi podařilo připravit několik sloučenin ftalocyaninové struktury a změřit jejich produkci singletového kyslíku. Příprava Pc obecně není nikterak složitá, komplikace však nastávaly až později při získávání chemicky čistého produktu, jenž je znám svou vnitřní nestabilitou na světle a agregací svých molekul v koncentrovanějších roztocích. Častá nízká výtěžnost reakcí znamenala práci s omezeným množstvím sloučenin, které také ovlivnilo další rozhodování o směru syntéz. Celou prací se táhne snaha o vytvoření nových Pc s vhodnými funkčními skupinami pro konjugaci s biomolekulami.

První experimenty se odehrály ve skupině křemičitých komplexů Pc, kde se přes veškeré úsilí nepodařily syntézy axiálně substituovaných SiPc bez periferní substituce. Ještě hůř dopadly pokusy o přípravu SiPc periferně obohaceného o substituenty vázané přes atom síry. Pozorovaný rozklad reaktantů znamenal opuštění tohoto směru. Jinou metodou jsem se snažil umístit centrální atom hliníku do již připraveného Pc skeletu s periferní substitucí zajišťující snadnou rozpustnost, ne všechny zvolené substituenty však vyhovovaly (**5**, **6**). Ačkoliv záměr nebyl po několika pokusech docílen, z průběhu reakce bylo zřejmé, že lze v této metodě spatřit možnou přípravu hlinitých komplexů Pc, avšak až po dalším propracování postupu.

Po sérii neúspěchů s centrálními atomy hliníku a křemíku jsme obrátili pozornost na atomy zinku a hořčíku. Syntézy jsou propracované a reakční podmínky mírnější v srovnání předchozími reakcemi. V přípravách jsme se zabývali vlivem periferní substituce na posun Q pásu, produkci  $^1\text{O}_2$  a agregaci. Též funkční skupiny na periferii měly umožnit rozpustnost ve vodě, která byla požadována pro testování na buňkách.

Přípravy rozpustných ZnPc a MgPc, u nichž jsou postranní substituenty napojeny přes atom kyslíku, probíhaly ve srovnání s SiPc mnohem lépe. Objemné substituce umožnily žádoucí rozpustnost v organických rozpouštědlech, ve který mají tyto Pc výraznou fluorescenci při vlnové délce 366 nm. V pyridinu byla pak změřena jejich schopnost produkce singletového kyslíku chemickou metodou rozkladu DPBF, při které se potvrdila důležitost přítomných centrálních kovů. Vysoká produkce  $^1\text{O}_2$  zinečnatých komplexů Pc dvakrát

převyšovala hořečnaté analogy ve všech uskutečněných měřeních. Další postup na vytyčené trase zastavila následná solubilizace Pc ve vodě, ve které zcela vymizela charakteristická fluorescence Pc makrocyclů. Současně i velmi nízká produkce singletového kyslíku u oktahydroxylového Pc (**9**, **10**, **11**) znamenala změnu v plánování biodistribuce (směr k distribuci Pc v liposómech – experimenty v současné době probíhají). Při sledování vlivu postranní substituce na agregaci Pc a AzaPc ve skupině nearomatických substituentů (*n*-oktyl vs. *tert*-butyl) se ukázala výhodnější substituce rozvětveným krátkým substituentem ve srovnání s dlouhým alifatickým řetězcem<sup>86</sup>.



## 7. SUMMARY

During the dissertation I have managed to prepare various compounds of phthalocyanine (Pc) structures and measure their production of singlet oxygen. The synthesis of Pc is not overly problematic, however complications arise during purification. Phthalocyanines are known for their instability in visible light spectrum and their aggregation in more concentrated solutions. The singlet oxygen quantum yield is usually low at the aggregates, thus further work is limited. The aim of my work was to create new Pcs with both increased solubility and functional groups suitable for conjugation with biomolecules.

First experiments were performed with silicon complex of Pc (SiPc). However, synthesis of axially substituted SiPc was not successful. Similar compounds with peripheral alkylsulphanyl substitution were also not obtained. These compounds disintegrated during synthesis. Another method that I have tried to insert a central aluminium atom into a Pc platform that was soluble into common organic solvents. Not all peripheral substituents were suitable (**5**, **6**). Even by this method I haven't achieved satisfactory reactions yields.

We have then turned our attention to zinc and magnesium complexes of Pc (ZnPc, MgPc). These synthesis methods are already known. Their reaction conditions are less aggressive. We have studied the influence of substituent on shift in Q band, the production of singlet oxygen and aggregation. Peripheral substitution should ensure water solubility, required for cell testing. Preparation of compounds with peripheral sulphur bound substituents resulted in better quantum yields. The singlet oxygen quantum yield ( $\Phi_{\Delta}$ ) was measured by the method of decomposition of DPBF in pyridine. The singlet oxygen production of ZnPc was twice as high as that of MgPc. The solution of (**9**, **10**, **11**) resulted in very low quantum yield. During the studies of peripheral substituent influence on prevention of aggregation and increase of the solubility the bulky substituents were found more effective than the long aliphatic chains.

## 8. SEZNAM PUBLIKOVANÝCH PRACÍ

M. Kostka, P. Zimcik, M. Miletin, P. Klemera, K. Kopecky, Z. Musil (2006). Comparison of aggregation properties and photodynamic activity of phthalocyanines and azaphthalocyanines. *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.***178**, 16-25.

P. Zimcik, M. Miletin, M. Kostka, J. Schwarz, Z. Musil, K. Kopecký (2004). Synthesis and comparison of photodynamic activity of alkylheteroatom substituted azaphthalocyanines. *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.***163**, 21-28.

P. Zimcik, M. Miletin, J. Ponec, M. Kostka and Z. Fiedler (2003). Synthesis and studies on photodynamic activity of new water-soluble azaphthalocyanines. *J. Photochem. Photobiol. A-Chem.* **155**, 127-131.

M. Kostka, M. Miletin. Syntéza, spektrální a fotodynamické vlastnosti nových ftalocyaninů. Sborník příspěvků 32.konference Syntéza a analýza léčiv, 16.-19.9.2003, Velké Karlovice, str.144; ISBN 80-900306-5-3

M. Kostka, J. Ponec, M. Miletin. Potenciální fotodynamicky aktivní látky ze skupiny ftalocyaninů. Sborník příspěvků 30.konference Syntéza a analýzy léčiv, 17.-19.9.2001, Brno, str. 78; ISBN 80-7305-416-7

J. Ponec, M. Kostka. Syntéza azaftalocyaninů a hodnocení jejich fotodynamické aktivity. Sborník příspěvků 31. konference Syntéza a analýza léčiv, 11.-13.9.2002, Bratislava, str.99

## 9. LITERATURA

- 
- <sup>1</sup> J. M. Epstein (1990) Phototherapy and photochemotherapy. *N. Engl. J. M.* **32**, 1149-1151.
- <sup>2</sup> N. R. Finsen (1901) *Phototherapy*. Edward Arnold, London. In: A. Ackroyd, C. Kelty, N. Brown and M. Reed (2001) The History of Photodetection and Photodynamic Therapy. *Photochem. Photobiol.* **74**, 656-669.
- <sup>3</sup> E. D. Sternberg, D. Dolphin and Ch. Brückner (1998) Porphyrin-based photosensitizers for use in photodynamic therapy. *Tetrahedron* **54**, 4151-4202.
- <sup>4</sup> B. Henderson and T. J. Dougherty (1992) How does photodynamic therapy work? *Photochem. Photobiol.* **55**, 145-157.
- <sup>5</sup> R. L. Lipson, E. J. Baldes and A. M. Olsen (1961) Hematoporphyrin derivative: a new aid for endoscopic detection of malignant disease. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **42**, 623-629.
- <sup>6</sup> O. Raab (1900) Über die Wirkung fluoreszierender Stoffe auf Infusorien. *Z. Biol.* **39**, 524-546.
- <sup>7</sup> J. Prime (1900) *Les accidents toxique par l'eosinate de sodium*. Jouve and Boyer, Paris
- <sup>8</sup> H. von Tappeiner and A. Jesionek (1903) Therapeutische Versuche mit fluoreszierender Stoffe. *Muench. Med. Wochenschr.* **47**, 2042-2044.
- <sup>9</sup> H. von Tappeiner, A. Jodlbauer : Die Sensibilisierende Wirkung fluoreszierender Substanzen. Gesamte Untersuchungen über die photodynamische Erscheinung, F. C. W. Vogel, Leipzig 1907.
- <sup>10</sup> W. Hausmann (1911) Die sensibilisierende Wirkung des Hematoporphyrins. *Biochem. Z.* **30**, 276-316.
- <sup>11</sup> Emma S. Nyman, Paavo H. Hynninen (2004) Research advances in the use of tetrapyrrolic photosensitizers for photodynamic therapy. *J. Photochem. Photobiol. B: Biology* **73**, 1-28
- <sup>12</sup> F. Meyer-Betz (1913) Untersuchungen über die Biologische (photodynamische) Wirkung des Hematoporphyrin und anderer Derivative des Blut- und Galenfarbstoff. *Dtsch. Arch. Klin. Med.* **112**, 476-503.
- <sup>13</sup> I. Diamond, S. G. Granelli, A. F. McDonagh, S. Nielsen, C. B. Wilson and R. Jaenicke (1972) Photodynamic therapy of malignant tumours. *Lancet* **2**, 1175-1177.
- <sup>14</sup> T. J. Dougherty, G. B. Grinday, R. Fiel, K. R. Weishaupt and D. G. Boyle (1975) Photoradiation therapy II: cure of animal tumours with haematoporphyrin and light. *J. Natl. Cancer Inst.* **55**, 115-121.
- <sup>15</sup> J. F. Kelly, M. E. Snell and M. C. Berenbaum (1975) Photodynamic destruction of human bladder carcinoma. *Br. J. Cancer* **31**, 237-244.
- <sup>16</sup> J. F. Kelly and M. E. Snell (1976) Hematoporphyrin derivative: a possible aid in the diagnosis and treatment of carcinoma of the bladder. *J. Urol.* **115**, 150-151.
- <sup>17</sup> T. J. Dougherty (1978) Photoradiation therapy for the treatment of malignant tumours. *Cancer Res.* **36**, 2628-2635.
- <sup>18</sup> Y. Hayata, H. Kato, C. Konaka, J. Ono and N Takaziwa (1982) Hematoporphyrin derivative and laser photoradiation in the treatment of lung cancer. *Chest* **81**, 8.
- <sup>19</sup> J. S. McCaughan, W. Hicks, L. Laufman, E. May and R. Roach (1984) Palliation of oesophageal malignancy with photoradiation therapy. *Cancer* **54**, 2905-2910.
- <sup>20</sup> H. Barr, N. Krasner, P. B. Boulos, P. Chatlani and S. G. Bown (1990) Photodynamic therapy of colorectal cancer: a quantitative pilot study. *Br. J. Surg.* **77**, 93-96.
- <sup>21</sup> W. M. Sharman, C. M. Allen and J. E. van Lier (2000) Role of Activated Oxygen Species in Photodynamic Therapy. *Methods Enzymol.* **319**, 376-400.
- <sup>22</sup> D. Jori and J. D. Spikes (1990) Photothermal sensitizers: Possible use in tumor therapy. *J. Photochem. Photobiol., B: Biol.* **6**, 93-101.

- 
- <sup>23</sup> T. Takemura, N. Ohta, S. Nakajima and I. Sakata (1989) Critical importance of the triplet lifetime of photosensitizer in photodynamic therapy of tumor. *Photochem. Photobiol.* **50**, 339-344.
- <sup>24</sup> I. J. Macdonald and T. J. Dougherty (2001) Basic principles of photodynamic therapy. *J. Porphyrins Phthalocyanines* **5**, 105-129.
- <sup>25</sup> J. Moan and K. Berg (1991) The photodegradation of porphyrins in cells can be used to estimate the lifetime of singlet oxygen. *Photochem. Photobiol.* **53**, 549-553.
- <sup>26</sup> B. C. Wilson, M. S. Patterson (1985) *Phys. Med. Biol.* **3**, 327
- <sup>27</sup> R. Hilleegersberg, J. W. Kort, J. H. P. Wilson (1994) *Drugs*, **48**, 510
- <sup>28</sup> Ana P. Castano, Tatiana N. Demidova, Michael R. Hamblin (2005) Mechanisms in photodynamic therapy: Part three-Photosensitizer pharmacokinetics, biodistribution, tumor localization and modes of tumor destruction. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* **2**, 91-106
- <sup>29</sup> R. J. Fiel, N. Datta-Gupt, E. Mark and J. C. Howard (1981) Induction of DNA damage by porphyrin photosensitizer. *Cancer Res.* **41**, 3543-3545.
- <sup>30</sup> F. L. McNair, B. Marples, C. M. L. West and J. V. Moore (1997) A comet assay of DNA damage and repair in K562 cells after photodynamic therapy using hematoporphyrin derivative, methylene blue and *meso*-tetrahydroxyphenylchlorin. *Br. J. Cancer* **75**, 1721-1729.
- <sup>31</sup> K. Berg, and J. Moan (1994) Lysosomes as photochemical targets. *Int. J. Biochem.* **59**, 814-822.
- <sup>32</sup> B. B. Noodt, K. Berg, T. Stokke, Q. Peng and J. M. Nesland (1999) Different apoptotic pathways are induced from various intracellular sites by tetraphenylporphyrins and light. *Br. J. Cancer* **79**, 72-81.
- <sup>33</sup> A. C. E. Moor (2000) Signaling pathways in cell death and survival after photodynamic therapy. *J. Photochem. Photobiol., B: Biol.* **57**, 1-13.
- <sup>34</sup> R. Hilf, N. W. Warne, D. B. Smail, S. L. Smail and S. L. Gibson (1984) Photodynamic inactivation of selected intracellular enzymes by hematoporphyrin derivative and their relationship to tumor cell viability *in vitro*. *Cancer Lett.* **24**, 165-172.
- <sup>35</sup> D. E. Dolmans (2002) Vascular accumulation of a novel photosensitizer, MV6401, causes selective thrombosis in tumor vessels after photodynamic therapy. *Cancer Res.* **62**, 2151-5156.
- <sup>36</sup> K. B. Trauner, R. Gandour-Edwards, M. Bamberg, S. Shortkroff, C. Sledge and T. Hasan (1998) Photodynamic synovectomy using benzoporphyrin derivative in an antigen-induced arthritis model for rheumatoid arthritis. *Photochem. Photobiol.* **67**, 133-139.
- <sup>37</sup> M. Korbelik (1996) Induction of tumor immunity by photodynamic therapy. *J. Clin. Laser Med. Surg.* **14**, 329-334.
- <sup>38</sup> S. O. Gollnick, L. Vaughan and B. W. Henderson (2002) Generation of effective antitumor vaccines using photodynamic therapy. *Cancer Res.* **62**, 1604-1608.
- <sup>39</sup> R. R. Allison, G. H. Downie, R. Cuenca, Xin-Hua Hu, Carter JH Childs, Claudio H Sibata (2004) Photosensitizers in clinical PDT. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* **1**, 27-42.
- <sup>40</sup> R. Bonnett and G. Martínez (2001) Photobleaching of sensitizers used in photodynamic therapy. *Tetrahedron* **57**, 9513-9547
- <sup>41</sup> D. G. Boyle and W. R. Potter (1987) Photobleaching Photofrin II as a means of eliminating skin photosensitivity. *Photochem. Photobiol.* **46**, 997-1001.
- <sup>42</sup> S. K. Schwartz, K. Absolon and H. Vermud (1955) Some relationships of porphyrins, x-rays and tumours. *Univ. Minn. Med. Bull.* **27**, 7-8.
- <sup>43</sup> DUSA Pharmaceuticals, inc. [online] (2003) [cit. 2003-10-06]. Dostupné z: [www.dusapharma.com](http://www.dusapharma.com)

- 
- <sup>44</sup> W. M. Sharman, C. M. Allen and J. E. van Lier (1999) Photodynamic therapeutics: basic principles and clinical applications. *Drug Discov. Today* **4**, 507-517.
- <sup>45</sup> T. J. Dougherty, C. J. Gomez, B. W. Henderson, G. Jori, D. Kessel, M. Korbelik, J. Moan and Q. Peng (1998) Photodynamic therapy. *J. Natl. Cancer Inst.* **90**, 889-905.
- <sup>46</sup> S. W. Taber, V. H. Fingar, C. T. Coats and T. J. Wieman (1998) Photodynamic therapy using mono-L-aspartyl chlorin e6 (Npe6) for the treatment of cutaneous disease: a phase I clinical study. *Clin. Cancer Res.* **4**, 2741-2746.
- <sup>47</sup> Jonathan L. Sessler and Richard A. Miller (2000) New drug with diverse clinical applications in radiation and photodynamic therapy, *Biochemical Pharmacology*, **59**, 733-739
- <sup>48</sup> K. Lang, J. Mosinger a D. M. Wagnerová (2006) Singletový kyslík v praxi – současnost a perspektiva. *Chem. Listy* **100**, 169-177
- <sup>49</sup> J. C. Reddan, C. Y. Anderson, H. Xiu, S. Hrabovsky, K. Freye, R. Fairchild, K. A. Tubesing and C. A. Elmetts (1999) Immunosuppressive effects of silicon phthalocyanine photodynamic therapy. *Photochem. Photobiol.* **70**, 72-77.
- <sup>50</sup> H. Mohr, B. Lambrecht and H. Schmitt (1995) Photodynamic virus inactivation of blood components. *Immunol. Invest.* **24**, 73-85.
- <sup>51</sup> J. Lenard, A. Rabson and R. Vanderoef (1993) Photodynamic inactivation of infectivity of human immunodeficiency virus and other enveloped viruses using hypericin and rose bengal: Inhibition of fusion and syncytia formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**, 158-162.
- <sup>52</sup> R.-M. Szeimies, S. Karrer, Ch. Abels, P. Steinbach, S. Fickweiler, H. Messmann, W. Bäumlner and M. Landthaler (1996) 9-Acetoxy-2,7,12,17-tetrakis(β-methoxyethyl)-porphycene (ATMPn), a novel photosensitizer for photodynamic therapy: uptake kinetics and intracellular localization. *J. Photochem. Photobiol., B: Biol.* **34**, 67-72.
- <sup>53</sup> V. Král, J. Davis, A. Andrievski, J. Kralova, A. Synytsya, P. Pouckova and J. L. Sessler (2002) Synthesis and biolocalization of water-soluble sapphyrins. *J. Med. Chem.* **45**, 1073-1078.
- <sup>54</sup> R. L. Juliano (1988) Factors affecting the clearance kinetics and tissue distribution of liposomes, microspheres and emulsions. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2**, 31-54.
- <sup>55</sup> Wesley M. Sharman, Johan E. van Lier, Cynthia M. Allen (2004) Targeted photodynamic therapy via receptor mediated delivery systems. *Advanced Drug Delivery Reviews* **56**, 53-76
- <sup>56</sup> R. T. Dorr (1994) Pharmacology and toxicology of cremophor EL eluent. *Ann. Pharmacother.* **28**, S11-S14.
- <sup>57</sup> J. Taillefer, N. Brasseur, J. E. Van Lier and J. C. Leroux (2001) In-vitro and in-vivo evaluation of pH-responsive polymeric micelles for the delivery of photosensitizing anticancer drugs. *J. Pharm. Pharmacol.* **53**, 166.
- <sup>58</sup> V. Lenaerts, A. Labib, F. Chouinard, J. Rousseau, H. Ali and J. E. Van Lier (1995) Nanocapsules with a reduce liver uptake: targeting of phthalocyanines to EMT-6 mouse mammary tumour in vivo. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **41**, 38-43.
- <sup>59</sup> R. H. Müller and K. H. Wallis (1993) Surface modification of i.v. injectable biodegradable nanoparticles with poloxamer polymers and poloxamine 908. *Int. J. Pharm.* **89**, 25-31.
- <sup>60</sup> A. Mori, A. L. Klivanov, V. P. Torchilin and L. Huang (1991) Influence of the steric barrier activity of amphiphilic poly(ethylene glycol) and ganglioside GM1 on the circulation time of liposomes and on the target binding of immunoliposomes in vivo. *FEBS Lett.* **284**, 263-266.
- <sup>61</sup> E. Schmidt-Erfurt, H. Diddens, R. Birngruber and T. Hasan (1997) Photodynamic targeting of human retinoblastoma cells using covalent low-density lipoprotein conjugates. *Br. J. Cancer* **75**, 54-61.
- <sup>62</sup> C. Kosmas, H. Linardou and A. A. Epenetos (1993) Review: Advances in monoclonal antibody tumour targeting. *J. Drug Targ.* **1**, 81-91.

- 
- <sup>63</sup> D. Mew, C. K. Wat, G. H. N. Towers and J. G. Levy (1983) Photoimmunotherapy: treatment of animal tumors with tumor-specific monoclonal antibody-hematoporphyrin conjugates. *J. Immunol.* **130**, 1473-1477.
- <sup>64</sup> Y. N. Konan, R. Gurny and E. Alléman (2002) State of the art in the delivery of photosensitizers for photodynamic therapy. *J. Photochem. Photobiol., B: Biol.* **66**, 89-106.
- <sup>65</sup> J. L. Sessler, P. I. Sansom, V. Kral, D. O'Connor and B. L. Iverson (1996) Sapphyrin-oligonucleotide conjugates. Novel sequence-specific DNA photomodifying agents with increased binding affinity. *J. Am. Chem. Soc.* **118**, 12322-12330.
- <sup>66</sup> J. Gagnebin, M. Brunori, M. Otter, L. Juillerat-Jeanneret, P. Monnier and R. Iggo (1999) A photosensitizing adenovirus for photodynamic therapy. *Gene Ther.* **6**, 1742-1750.
- <sup>67</sup> T. J. Nyokong (1994). *Chem. Soc. Dalton Trans.*, 1359
- <sup>68</sup> V. Ahsen, E. Yilmazer, M. Ertas (1988). *J. Chem. Soc., Dalton Trans*, 401
- <sup>69</sup> V. M. Derkacheva, E. A. Luk'yanets (1980). *Zh. Obsch. Khim.*, **50**, 2313; *J. Gen. Chem. USSR (Engl. Transl.)*, 1980; **50**, 1874
- <sup>70</sup> J. H. Weber, D. H. Busch (1965). *Inorg. Chem.*, **4**, 469
- <sup>71</sup> S. E Maree and T. Nyokong (2001) Syntheses and photochemical properties of octasubstituted phthalocyaninalo zinc complexes. *J. Porphyrins and Phthalocyanines*, **5**, 782-789
- <sup>72</sup> Methods of organic chemistry (Houben-Weyl), Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 1998, volume E 9d (Hetarenes IV), ed. E. Schaumann, 717.
- <sup>73</sup> W. E. Ford, M. A. J. Rodgers, L. A. Scheetman (1992). *Inorg. Chem.*, **31**, 3371
- <sup>74</sup> G. Schmid, E. Witke, U. Schlick et al. (1995). *J. Mater. Chem*, **5**, 855
- <sup>75</sup> Svetlana V. Kudrevich, Johan E. van Lier (1996). *Can. J. Chem.*; **74**, 1718-1723
- <sup>76</sup> B. L. Wheeler, G. Nagasubramanian, A. J. Bard et al. (1984). *J. Am. Chem. Soc.*, **106**, 7404
- <sup>77</sup> R. W. Redmond and J. N. Gamlin (1999) A compilation of singlet oxygen yields from biologically relevant molecules. *Photochem. Photobiol.* **70**, 391-475.
- <sup>78</sup> F. Wilkinson, W. P. Helman and A. B. Ross (1993) Quantum yields or the photosensitized formation of the lowest electronically excited singlet state of molecular oxygen in solution. *J. Phys. Chem. Ref. Data* **22**, 113-262.
- <sup>79</sup> S. Nonell and R. W. Redmond (1994) On the determination of quantum yields for singlet molecular oxygen photosensitization. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **22**, 171-172.
- <sup>80</sup> Maria C. deRosa, Robert J. Crutchley (2002) Photosensitized singlet oxygen and its applications. *Coordination Chemistry Reviews*, **233-234**, 351-371.
- <sup>81</sup> I. Rosenthal (1991). *Photochem. Photobiol.* **53**, 859
- <sup>82</sup> P. Zimcik, M. Miletin, M. Kostka, J. Schwarz, Z. Musil, K. Kopecký (2004). Synthesis and comparison of photodynamic activity of alkylheteroatom substituted azaphthalocyanines, . *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* **163**, 21-28
- <sup>83</sup> B. N. Achar, P. K. Jakasree (1999). *Indian J. Chem.*, **38A**, 1164-1168.
- <sup>84</sup> M. T. M. Choi, P.P.S. Li and D. K. P. Ng (2000) A Direct Comparison of the Aggregation Behavior of Phthalocyanines and 2,3-Naphthalocyanines. *Tetrahedron* **56**, 3881-3887
- <sup>85</sup> D. Wöhrle, M. Eskes, K. Shigehara, A. Yamada (1992) A Simple Synthesis of 4,5-Disubstituted 1,2-Dicyanobenzenes and 2,3,9,10,16,17,23,24-Octasubstituted Phthalocyanines. *Synthesis*; **2**; 194-196
- <sup>86</sup> M. Kostka, P. Zimcik, M. Miletin, P. Klemra, K. Kopecky, Z. Musil (2006). Comparison of aggregation properties and photodynamic activity of phthalocyanines and azaphthalocyanines. *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* **178**, 16-25.
- <sup>87</sup> P. Zimčík (2003) Dusíkaté analogy ftalocyaninů jako fotosenzitizéry ve fotodynamické terapii. Disertační práce, Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy, Hradec Králové

---

## 10. PŘÍLOHA č. 1