

Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Wydział Farmaceutyczny

Katedra i Zakład Technologii Chemicznej Środków Leczniczych

Dariusz T. Młynarczyk

**Tribenzoporfirazyne o potencjalnym zastosowaniu w terapii
fotodynamicznej - synteza i charakterystyka fizykochemiczna**

rozprawa na stopień doktora nauk farmaceutycznych

promotor: prof. dr hab. Tomasz Gośliński

promotor pomocniczy: dr n. farm. Wojciech Szczęsny

Poznań, 2019

Poznan University of Medical Sciences
Faculty of Pharmacy
Department of Chemical Technology of Drugs

Dariusz T. Młynarczyk

**Tribenzoporphyrazines of potential use in photodynamic therapy
– synthesis and physico-chemical characterization**

PhD thesis

supervisor: prof. dr hab. Tomasz Gośliński
auxiliary supervisor: dr n. farm. Wojciech Szczółko

Poznań, 2019

Słowa kluczowe:

fotosensybilizatory

ftalocyjanina

porfirazyna

terapia fotodynamiczna

terapia fotodynamiczna skierowana przeciwko mikroorganizmom

tlen singletowy

Badania zawarte w niniejszej rozprawie doktorskiej zostały częściowo sfinansowane z grantów Narodowego Centrum Nauki (2012/05/E/NZ7/01204 i 2016/21/B/NZ9/00783).

Wyniki badań wchodzących w zakres rozprawy doktorskiej opublikowano:

1. Piskorz J., **Młynarczyk D.T.**, Szczolko W., Konopka K., Düzgüneş N., Mielcarek J. Liposomal formulations of magnesium sulfanyl tribenzoporphyrazines for the photodynamic therapy of cancer. *J. Inorg. Biochem.* 2018, 184, 34-41. DOI: 10.1016/j.jinorgbio.2018.04.010 (3.348 IF, 35 pkt MNiSW)
2. Wieczorek E., **Młynarczyk D.T.**, Kucinska M., Długaszewska J., Piskorz J., Popenda L., Szczolko W., Jurga S., Murias M., Mielcarek J., Goslinski T. Photophysical properties and photocytotoxicity of free and liposome-entrapped diazepinoporphyrazines on LNCaP cells under normoxic and hypoxic conditions. *Eur. J. Med. Chem.* 2018, 150, 64-73. DOI: 10.1016/j.ejmech.2018.02.064 (4.519 IF, 40 pkt MNiSW)
3. **Młynarczyk D.T.**, Kocki T., Goslinski T. Dendrimer structure diversity and tailorability as a way to fight infectious diseases. Rozdział w książce *Nanostructured Materials - Fabrication to Applications*, Prof. Mohindar Sehra (Ed.), wyd. InTech Open. ISBN 978-953-51-5244-6. DOI: 10.5772/67660 (5 pkt MNiSW)
4. Tillo A., **Młynarczyk D.T.**, Popenda L., Wicher B., Kryjewski M., Szczolko W., Jurga S., Mielcarek J., Gdaniec M., Goslinski T., Tykarska E. Synthesis and singlet oxygen generation of pyrazinoporphyrazines containing dendrimeric aryl substituents. *New J. Chem.*, 2017, 41, 3586-3594. DOI: 10.1039/C6NJ03886G (3.277 IF, 30 pkt MNiSW)
5. **Młynarczyk D.T.**, Lijewski S., Falkowski M., Piskorz J., Szczolko W., Sobotta L., Stolarska M., Popenda L., Jurga S., Konopka K., Düzgüneş N., Mielcarek J., Goslinski T. Dendrimeric sulfanyl porphyrazines: synthesis, physico-chemical characterization, and biological activity for potential applications in photodynamic therapy. *ChemPlusChem* 2016, 81, 460. DOI: 10.1002/cplu.201600051 (2.836 IF, 30 pkt MNiSW)

Część badań zawartych w pracy doktorskiej wykonano we współpracy z:

- Katedrą i Zakładem Chemii Nieorganicznej i Analitycznej Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu – w zakresie pomiarów fizykochemicznych otrzymanych związków makrocyklicznych,
- Katedrą i Zakładem Toksykologii Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu – w zakresie badań aktywności fotodynamicznej wybranych związków makrocyklicznych na liniach komórkowych ludzkich nowotworów,
- Katedrą i Zakładem Genetyki i Mikrobiologii Farmaceutycznej Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu – w zakresie badań aktywności fotodynamicznej wybranych związków makrocyklicznych na szczepach bakteryjnych i grzybiczych,
- Katedrą i Zakładem Chemii Farmaceutycznej Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu – w zakresie wykonania pomiarów widm w podczerwieni,
- Microbiology Department, University of the Pacific, Arthur A. Dugoni School of Dentistry, San Francisco, USA – w zakresie badań aktywności fotodynamicznej wybranych związków makrocyklicznych na liniach komórkowych ludzkich nowotworów jamy ustnej,
- Centrum NanoBioMedycznym, Uniwersytetu Adama Mickiewicza w Poznaniu – w zakresie zarejestrowania widm magnetycznego rezonansu jądrowego.

*Panu prof. dr. hab. **Tomaszowi Goślińskiemu** serdecznie dziękuję za umożliwienie wykonania pracy doktorskiej, troskę i pomoc na każdym etapie jej powstawania. Za Jego zaangażowanie, niesłabnący entuzjazm i „zaraźliwą” pasję w pracy naukowej. Dziękuję za cały poświęcony dla mnie czas.*

*Panu dr. **Wojciechowi Szczolko** dziękuję za wprowadzenie mnie w tajniki pracy eksperymentalnej, zapoznanie mnie z „magią” izolacji i oczyszczania tribenzoporfirazy. Za dobre słowo i radę w każdej sytuacji.*

*Pani mgr **Ewelinie Wieczorek**, Panu mgr. **Michałowi Falkowskiemu**, Panu dr. **Sebastianowi Lijewskiemu** i Panu mgr. **Adamowi Tillo** za związki chemiczne przekazane do badań oraz za niezapomnianą atmosferę pracy.*

*Grupie badawczej Pani prof. dr. hab. **Jadwigi Mielcarek** dziękuję za pomoc, dzielenie się spostrzeżeniami i doświadczeniami. Panu dr. **Michałowi Kryjewskiemu**, Panu dr. **Jarosławowi Piskorzowi** i Panu dr. **Łukaszowi Sobotta** za wykonanie i udostępnienie analiz HPLC oraz wyników generowania tlenu singletowego.*

*Panu prof. dr. hab. **Stefanowi Jurdze** i Panu dr. **Łukaszowi Pependzie** dziękuję za udostępnienie wyników pomiarów spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego.*

*Pani prof. dr. hab. **Marzenie Gajęckiej** dziękuję za umożliwienie wykonania badań mikrobiologicznych w Katedrze i Zakładzie Genetyki i Mikrobiologii Farmaceutycznej.*

*Pani dr **Jolancie Długaszewskiej** dziękuję za pomoc w przeprowadzeniu badań mikrobiologicznych oraz interpretacji wyników tych badań.*

*Pani prof. **Krystynie Konopce**, Panu prof. **Nejat Düzgünesowi** oraz Panu dr. **Jarosławowi Piskorzowi** za udostępnienie wyników badań aktywności przeciwnowotworowej.*

*Panu prof. dr. hab. **Markowi Muriasowi** i Pani dr **Małgorzacie Kucińskiej** dziękuję za udostępnienie wyników badań aktywności przeciwnowotworowej.*

*Wszystkim **Pracownikom Katedry** dziękuję za okazaną życzliwość, miłą atmosferę i pomoc w trakcie wykonywania badań.*

Pracę dedykuję wszystkim, dzięki którym jestem tym, kim jestem.

SPIS TREŚCI

1.	WSTĘP.....	1
2.	CEL PRACY.....	3
3.	CZĘŚĆ LITERATUROWA	5
3.1.	Porfirynoidy	5
3.1.1.	Porfirazyny.....	6
3.1.2.	Niesymetryczne aza-porfirynoidy.....	8
3.1.3.	Tribenzoporfirazyny.....	11
3.1.3.1.	S-tribenzoporfirazyny (tribenzoporfirazyny siarkowe)	13
3.1.3.2.	N-tribenzoporfirazyny (tribenzoporfirazyny azotowe).....	16
3.1.3.3.	O-tribenzoporfirazyny (tribenzoporfirazyny tlenowe).....	22
3.2.	Dendrymery.....	23
3.2.1.	Budowa dendrymerów	23
3.2.2.	Zastosowania dendrymerów w chemii medycznej i farmacji.....	25
3.2.2.1.	Dendrymery w terapii przeciwnowotworowej.....	25
3.2.2.2.	Aktywność przeciwdrobnoustrojowa dendrymerów	26
3.3.	Terapia fotodynamiczna chorób nowotworowych oraz skierowana przeciw drobnoustrojom	26
3.3.1.	Aza-porfirynoidy w terapii przeciwnowotworowej.....	32
3.3.2.	Wykorzystanie dendrymerów w terapii fotodynamicznej	33
3.4.	Podsumowanie	34
4.	WYNIKI I Dyskusja	36
4.1.	Tribenzoporfirazyny z grupami sulfanylowymi – synteza i charakterystyka fizykochemiczna	36
4.1.1.	Ocena reaktywności pochodnych dimerkaptomaleonitryla w warunkach reakcji makrocyklizacji.....	36
4.1.2.	Reakcje modyfikacji części peryferyjnej tribenzoporfirazyny 2	43
4.1.3.	Synteza i charakterystyka S-secotribenzoporfirazyny	49
4.2.	Diazipinotribenzoporfirazyny– synteza i charakterystyka fizykochemiczna.....	54
4.2.1.	Rekonesansowe reakcje cyklotetrameryzacji pochodnych 1,4-diaza-2,3-dicyjanocyklohept-2-enu.....	54
4.2.2.	Rekonesansowe reakcje makrocyklizacji pochodnych 1,2-dicyjano-6H-1,4-diazipiny z podstawnikami styrylowymi.....	55
4.2.3.	Rekonesansowe reakcje cyklotetrameryzacji pochodnych 1,2-dicyjano-6H-1,4-diazipiny z podstawnikami aryłowymi.....	56

4.3.	Pirazynotribenzoporfirazy – synteza i charakterystyka fizykochemiczna.....	58
4.3.1.	Pirazynotribenzoporfirazy z podstawnikami aryłowymi	58
4.3.2.	Pirazynotribenzoporfirazy z podstawnikami alkoksylowymi.....	62
4.4.	Badania fotochemiczne tribenzoporfirazy – ocena generowania tlenu singletowego	64
4.5.	Ocena aktywności biologicznej <i>in vitro</i> wybranych pochodnych tribenzoporfirazy	66
4.5.1.	Ocena fotocytotoksyczności względem linii komórek nowotworowych	66
4.5.2.	Ocena fotocytotoksyczności względem mikroorganizmów chorobotwórczych.	69
5.	PODSUMOWANIE I WNIOSKI.....	73
6.	CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA.....	77
6.1.	Ogólne procedury.....	77
6.2.	Stosowane odczynniki i rozpuszczalniki	78
6.3.	Synteza chemiczna	79
6.4.	Metodyka oceny aktywności przeciwdrobnoustrojowej.....	84
7.	STRESZCZENIE.....	86
8.	ABSTRACT.....	88
9.	SPIS STOSOWANYCH SKRÓTÓW	90
10.	SPIS RYCIŃ, SCHEMATÓW ORAZ TABEL.....	92
10.1.	Spis rycin.....	92
10.2.	Spis schematów	94
10.3.	Spis tabel	95
11.	ODNOŚNIKI LITERATUROWE.....	96
12.	SUPLEMENT.....	108

1. Wstęp

Do jednego z głównych problemów znajdujących się w nurcie zainteresowań współczesnej medycyny należy terapia chorób nowotworowych. Spore wyzwanie stanowi także leczenie chorób bakteryjnych, grzybiczych i pasożytniczych, przy wzrastającej oporności mikroorganizmów na stosowane leki [1,2]. Grupy badawcze na całym świecie poświęcają dużą uwagę tym właśnie zagadnieniom. Opracowywane są nowe typy terapii, nowe leki, nowe możliwości walki z infekcjami i nowotworami.

Wydaje się, że paradoksalnie problemy medycyny może rozwiązać prosta cząsteczka, jaką jest tlen singletowy, który jako czynnik fizyczny działa destrukcyjnie na struktury komórkowe, komórki i tkanki, w których otoczeniu się znajduje. Na działaniu tlenu singletowego i innych reaktywnych form tlenu opiera się terapia fotodynamiczna (PDT) oraz terapia fotodynamiczna skierowana przeciw drobnoustrojom (PACT). Tlen singletowy nie może być jednak magazynowany i podawany pacjentowi, pojawia się zatem konieczność jego wytworzenia *in situ* w organizmie. Procedura odbywa się na drodze zaaplikowania fotouczulacza (Ps), który – po osiągnięciu docelowego miejsca działania – jest naświetlany światłem o odpowiedniej długości fali. Wyjątkowe właściwości fotouczulaczy stosowanych w PDT i PACT sprawiają, że są one w stanie przekształcać tlen rozpuszczony w komórkach lub tkankach (tlen trypletowy o niższym stanie energetycznym) w tlen singletowy. Uszkodzenia powstałe w komórkach w wyniku działania tlenu singletowego mogą być na tyle poważne, że uniemożliwiają dalsze ich funkcjonowanie, skutkując śmiercią komórki na drodze apoptozy lub nekrozy [3].

Do związków, które wykazują zdolność do generowania tlenu singletowego pod wpływem światła należą porfirynoidy, a wśród nich dużym zainteresowaniem ze względu na korzystne właściwości spektralne cieszą się syntetyczne aza-pochodne porfiryn – porfirazyny (Pz) i ftalocyjaniny (Pc) [4]. Pierścień porfirazynowy składa się z czterech pierścieni pirolu połączonych mostkami aza-metinowymi. Z kolei analogi porfirazyn – ftalocyjaniny – swoją strukturę opierają na rozbudowanym pierścieniu makrocyclicznym porfirazyny, dodatkowo skondensowanym przy każdym pierścieniu pirolowym z pierścieniem benzenowym. Możemy również wyróżnić porfirazyny sprzężone jedynie przy trzech pierścieniach pirolu pierścieniami benzenu – takie związki określane są mianem tribenzoporfirazyn. Należy podkreślić, że pochodne niesymetryczne wykazują bogatsze od pochodnych symetrycznych właściwości fizykochemiczne. Pz i Pc mogą być modyfikowane na różne sposoby, w szczególności poprzez wymianę jonu metalu w centrum koordynacyjnym, a także poprzez podstawienie pierścieni pirolu lub benzenu.

Podstawniki peryferyjne mogą mieć różny charakter, od prostych łańcuchów alkilowych, po rozbudowane podstawniki peptydowe i polimerowe. Typem polimeru, który ostatnio zyskuje na popularności w systemach dostarczania substancji czynnych i w terapii fotodynamicznej są dendrymery. Dendrymery to szczególny typ polimerów, które nie tworzą wspólnej grupy pod względem chemicznym. Kryterium przynależności związku do dendrymerów jest szczególny układ wchodzących w jego skład monomerów, które silnie się rozgałęziają tworząc kolejne generacje dendrymeru. Dendrymery są znanymi solubilizatorami leków, stąd mogą być również wykorzystywane w terapii przeciwnowotworowej, w tym PDT [5].

Mimo, że terapie oparte na tlenie singletowym wciąż są rozwijane i udoskonalane, to obecnie stosowane klinicznie fotouczulacze są dalekie od ideału. Sprawia to, że wciąż kontynuowane są prace w zakresie usprawnienia procedury terapii fotodynamicznej, w tym badania nowych fotosensybilizatorów. Ta idea stała się motywem przewodnim do wykonania badań przedstawionych w ramach niniejszej pracy doktorskiej.

W części literaturowej dokonano analizy literatury na temat dotychczasowego stanu wiedzy o aza-porfirynoidach, ze szczególnym uwzględnieniem tribenzoporfirazyn, możliwości ich zastosowania w terapii fotodynamicznej oraz w terapii fotodynamicznej skierowanej przeciw mikroorganizmom. Dodatkowo, zebrano informacje na temat sposobów funkcjonalizacji dendrymerów i możliwości ich wykorzystania w terapii przeciwnowotworowej oraz skierowanej przeciw drobnoustrojom. Na zakończenie, przeprowadzono przegląd stanu wiedzy na temat PDT i PACT, a także współcześnie stosowanych fotosensybilizatorów i możliwych kierunków rozwoju terapii fotodynamicznej.

Część eksperymentalna pracy zawiera opis wykonanych eksperymentów i badań tribenzoporfirazyn, sposobów ich syntezy i modyfikacji oraz charakterystykę fizykochemiczną. Ta część została omówiona z uwzględnieniem podstawników przyłączonych do pierścienia pirolowego tribenzoporfirazyny – tribenzoporfirazyny sulfanylowe, diazepinotribenzoporfirazyny i pirazynotribenzoporfirazyny. Na koniec części eksperymentalnej przedstawiono wyniki badań aktywności fotodynamicznej *in vitro* dla najbardziej obiecujących porfirynoidów, które wykonano na liniach komórek nowotworowych oraz szczepach wybranych drobnoustrojów.

2. Cel pracy

W ramach poszukiwania nowych metod leczenia chorób nowotworowych i chorób zakaźnych duże nadzieje wiąże się z terapią fotodynamiczną. Czynnikiem działającym w tej terapii jest tlen singletowy i wolne rodniki powstające w wyniku naświetlania fotosensybilizatora (fotouczulacza) w obecności tlenu rozpuszczonego w płynach fizjologicznych. To właśnie reaktywne formy tlenu (ROS, ang. *reactive oxygen species*) wykazują aktywność w terapii fotodynamicznej prowadząc do śmierci komórek nowotworowych i mikroorganizmów. Obecnie stosowane klinicznie fotouczulacze, niejednokrotnie nie wykazują wystarczającej skuteczności terapeutycznej, dlatego konieczne jest poszukiwanie nowych związków o lepszych parametrach fizykochemicznych, chociażby w aspekcie rozpuszczalności i zmniejszonej agregacji.

W części literaturowej niniejszej pracy zaplanowano zebranie i opracowanie stanu wiedzy na temat następujących zagadnień:

1. Porfirynoidy, a zwłaszcza aza-porfirynoidy, ze szczególnym uwzględnieniem tribenzoporfirazyn oraz możliwości ich funkcjonalizacji.
2. Dendrymery, metody ich modyfikacji i możliwości zastosowania w zakresie chemii medycznej i farmacji.
3. Terapia fotodynamiczna, obecnie stosowane fotouczulacze i nowe pochodne wraz ze stawianymi im wymaganiami. Uwzględniono także aktualne badania dotyczące aza-porfiryn i dendrymerów w terapii nowotworów.

Kierując się stanem wiedzy, zaplanowano syntezę nowych fotouczulaczy z grupy tribenzoporfirazyn funkcjonalizowanych w części peryferyjnej wraz z oceną ich potencjalnej użyteczności w PDT i PACT.

Zamierzony główny cel pracy w części eksperymentalnej miał zostać zrealizowany poprzez podjęcie następujących badań:

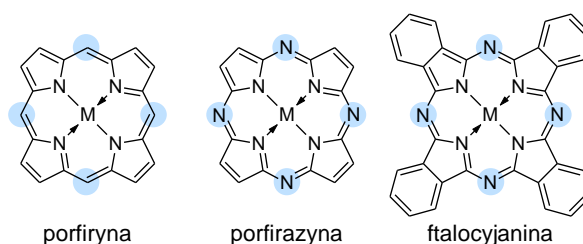
1. Opracowanie syntezy chemicznej i przeprowadzenie charakterystyki fizykochemicznej nowych pochodnych sulfanylotribenzoporfirazyn z podstawnikami peryferyjnymi, w tym dendrymerami.
 2. Opracowanie syntezy chemicznej i przeprowadzenie charakterystyki fizykochemicznej nowych pochodnych azotowych tribenzoporfirazyn z podstawnikami peryferyjnymi, w tym dendrymerami.
 3. Dokonanie oceny uzyskanej funkcjonalizacji peryferyjnej makrocykli pod względem rozpuszczalności, agregacji, zdolności do generowania tlenu singletowego, a tym samym potencjalnej użyteczności w PDT i PACT.
-

4. Wybór najbardziej obiecujących związków na podstawie ich właściwości fizykochemicznych oraz zdolności generowania tlenu singletowego do oceny aktywności biologicznej w warunkach terapii fotodynamicznej *in vitro* względem wybranych linii komórek nowotworowych.
5. Wybór najbardziej obiecujących związków na podstawie ich właściwości fizykochemicznych oraz zdolności generowania tlenu singletowego do oceny właściwości biologicznych w warunkach terapii fotodynamicznej *in vitro* względem komórek bakterii i grzybów.

3. Część literaturowa

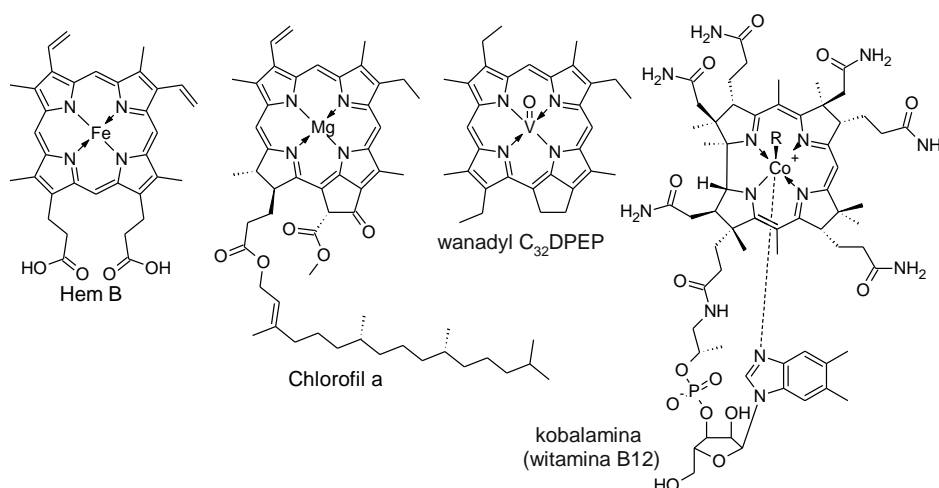
3.1. Porfirynoidy

Porfirynoidy to związki makrocykliczne zwykle składające się z czterech pierścieni pirolu połączonych przeważnie mostkami metinowymi i azametinowymi łączącymi pozycje α pirolu. W zależności od struktury tych mostków możemy rozróżnić porfiryny (mostki metinowe, $-C=$) oraz aza-porfiryny lub porfirazyny (mostki aza-metinowe, $-N=$) (**Ryc. 1**). Natomiast ftalocyjaniny są szczególnym typ porfirazyn sprzężonych dodatkowo w pozycjach β, β pirolu z pierścieniami benzenowymi.



Ryc. 1. Struktury chemiczne porfiryn i aza-porfiryn. M – jon metalu lub 2H.

Najprostszą porfiryne jest porfina – niepodstawiona porfiryne. Porfiryny i chloryny występują powszechnie w środowisku naturalnym, gdzie spełniają ważne funkcje biologiczne, jako kluczowy fragment cząsteczki chlorofilu (**Ryc. 2**), jako grupa prostetyczna wielu ważnych metaloprotein (m.in. hemoglobiny czy cytochromu P450). Różne porfiryny są także składnikami ropy naftowej, najprawdopodobniej jako produkty rozkładu roślin i obecnego w nich chlorofilu. Przykładami porfiryn naftowych są etioporfiryne (ETIO) i deoksyfioerytoporfiryne (DPEP) [6,7].



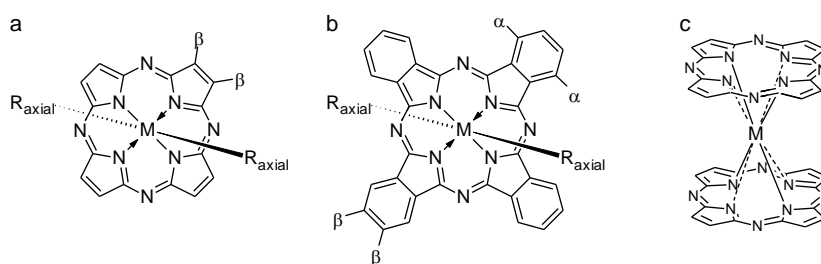
Ryc. 2. Reprezentatywne struktury chemiczne naturalnie występujących porfirynoidów.

Pochodne porfiryn modyfikowane azotem w mostkach metinowych, nie występują w przyrodzie i mogą być jedynie otrzymane na drodze syntezy chemicznej.

3.1.1. Porfirazyny

Historycznie trudno jest umiejscowić w czasie datę pierwszej syntezy porfirazyny, gdyż związki te otrzymywano co najmniej kilkakrotnie w podobnym okresie w pierwszej połowie XX wieku. Dopiero grupa badawcza sir Reginalda Patricka Linstead'a uzyskała ftalocyjaninę i określiła jej strukturę chemiczną w latach 30-tych XX wieku [8,9]. Od wielu lat ftalocyjaniny były szeroko wykorzystywane ze względu na intensywną barwę w przemyśle odzieżowym, drukarskim i farbiarskim do barwienia w kolorze niebieskim lub zielonym. Intensywna barwa tej grupy barwników, podobnie jak porfiryń, wynika z rozbudowanego pierścienia aromatycznego i niezwykle wysokiej zdolności absorpcji światła. Dalsze badania w zakresie aza-porfirynoidów pozwoliły zauważyć ich inne interesujące właściwości spektroskopowe i elektrochemiczne. Obecnie ftalocyjaniny i porfirazyny, a także inne aza-pochodne bada się celem wykorzystania w fotowoltaice, medycynie i katalizie.

Porfirazyny (Pz) mogą być modyfikowane na drodze podstawienia w pozycji β pierścienia pirolu (**Ryc. 3**), podczas gdy ftalocyjaniny (Pc) mogą być podstawiane zarówno w pozycjach α (tzw. pozycje nieperyferyjne) oraz β (tzw. pozycje peryferyjne). W przypadku obu makrocykli – Pz i Pc – możliwe jest wprowadzenie jonu metalu do centrum koordynacyjnego pierścienia [4]. Dodatkowo, w zależności od użytego jonu metalu (trójwartościowego bądź wyższej wartościowości), możliwe jest także uzyskanie podstawienia tych związków w pozycjach aksjalnych względem pierścienia. W niektórych, szczególnych przypadkach, kiedy koordynowanym jonem jest metal z grupy lantanowców, uzyskuje się także tak zwane kompleksy kanapkowe, w których jon metalu w rdzeniu jest koordynowany przez dwa pierścienie makrocykliczne.

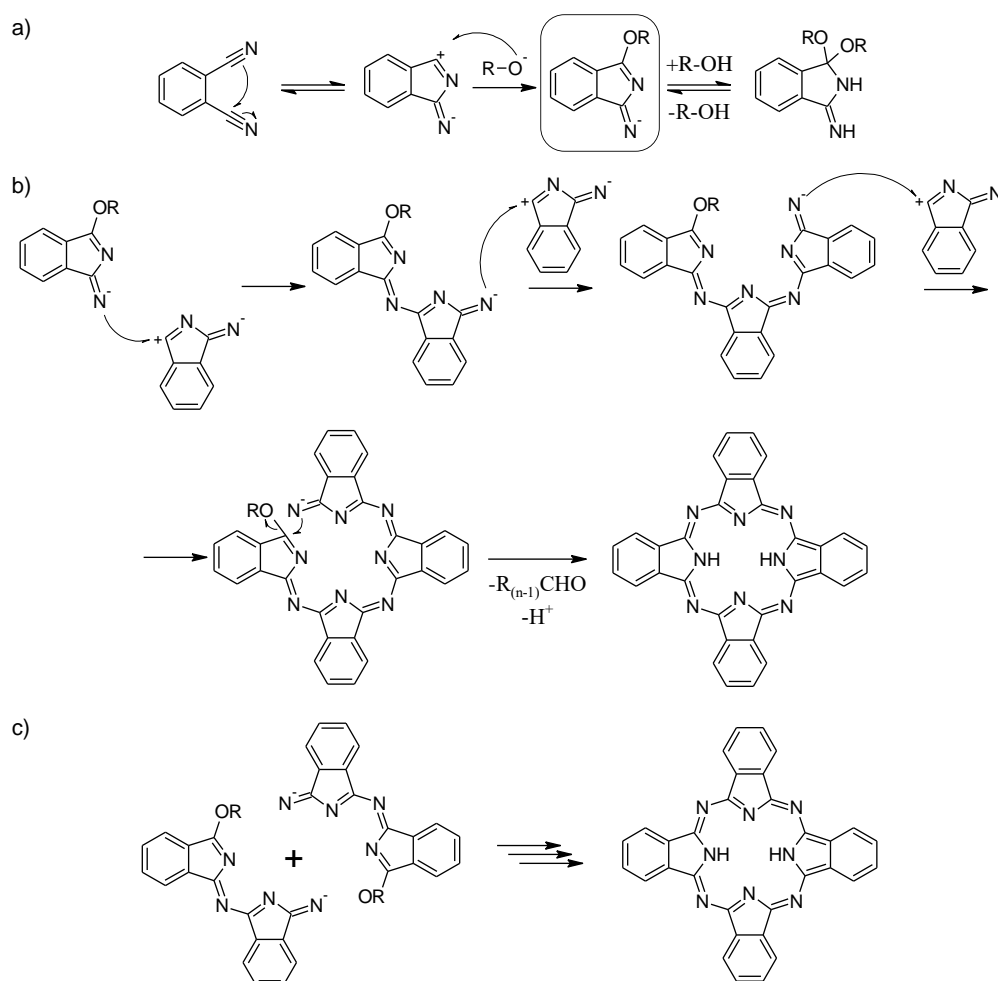


Ryc. 3. Możliwości modyfikacji (a) porfirazyn i (b) ftalocyjanin; (c) kompleks kanapkowy porfirazyny. M – jon metalu. R_{axial} – podstawnik aksjalny.

Znane są ponadto porfirazyny sprzężone w pozycjach β,β z (i) pierścieniami aromatycznymi innymi niż pierścień benzenowy, jak na przykład naftalen (tzw. naftocyjaniny), antracen, inne wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne,

(ii) aromatycznymi i antyaromatycznymi pierścieniami heterocyklicznymi, jak 1,4-diazepina (diazepinoporfirazyny), pirazyna (pirazynoporfirazyny, aza-ftalocyjaniny), pirydyna, pirol, ale także selenadiazol oraz (iii) pierścieniami niearomatycznymi jak cykloheksan, 1,4-ditiacykloheksan, 1,4-dioksan, a niejednokrotnie również tioeterami i eterami koronowymi [4].

Najpopularniejszym sposobem otrzymywania aza-porfirynoidów jest wykorzystanie reakcji cyklotetrameryzacji, tzw. reakcji makrocyklizacji Linstead, w której odpowiednio podstawione pochodne maleonitryla bądź *o*-ftalonitryla są ogrzewane w środowisku roztworu alkoholu metalu w alkoholu. Mechanizm tej reakcji został przedstawiony na **Schemacie 1**.

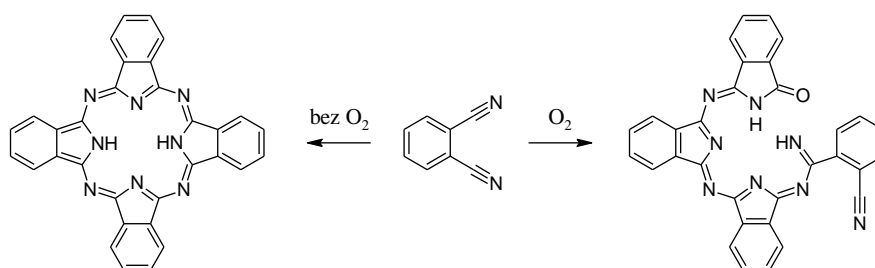


Schemat 1. Mechanizm reakcji makrocyklizacji na przykładzie ftalocyjaniny: (a) przekształcenie *o*-ftalonitryla, (b) i (c) zamykanie pierścienia makrocyklicznego (na podstawie [10]).

W pierwszym etapie reakcji tetrameryzacji następuje przekształcenie *o*-ftalonitryla do pochodnej izoindolu (**Schemat 1a**) [10]. Powstały półprodukt może następnie wejść w reakcję z kolejną cząsteczką *o*-ftalonitryla, co z kolei prowadzi do dimeru. Ten może dalej

ulegać przekształceniom w dwójnasób: (i) wchodzić kolejno w dalsze reakcje z kolejnymi cząsteczkami *o*-ftalonytryli do utworzenia pierścienia ftalocyjaniny (**Schemat 1b**) lub alternatywnie (ii) wejść w reakcję z drugim dimerem, co prowadzi do identycznego efektu (**Schemat 1c**). W obu przypadkach ostatni etap reakcji polega na zamknięciu tetramerycznego pierścienia z jednoczesną eliminacją grupy alkoksylowej. Tak powstały makrocykl jest nietrwały, gdyż nie spełnia reguły Hückla i ulega dalszej redukcji poprzez pozbycie się z układu dwóch elektronów. Proces ten odbywa się poprzez ich przeniesienie na eliminowaną cząsteczkę alkoholu i jej dalsze utlenienie do aldehydu. Powstały pierścień ftalocyjaninowy stanowi trwały układ aromatyczny.

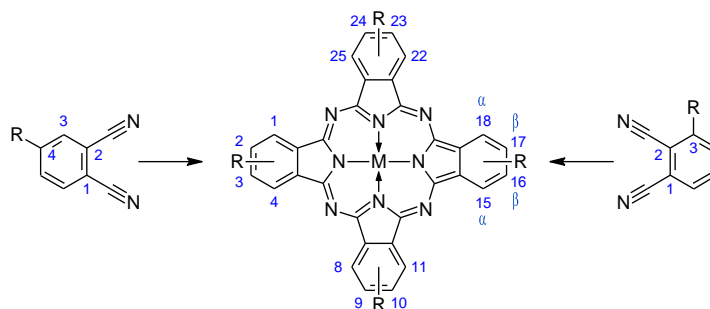
Znaczący wpływ na przebieg reakcji makrocyklizacji ma sposób jej prowadzenia. Wymagane są warunki bezwodne i zasadowe. Ponadto obserwuje się zwykle wyższe wydajności syntezy prowadzonej w warunkach gazu obojętnego (niższa wydajność jest efektem interakcji tlenu na etapie zamknięcia pierścienia makrocyklicznego, **Schemat 2**). Wang i wsp. zaobserwowali „niedomykanie” się pierścienia ftalocyjaniny w przypadku prowadzenia tetrameryzacji w warunkach tlenowych [11]. Zdołali także wyizolować produkt tej reakcji, a dzięki zastosowaniu gazowego tlenu $^{18}\text{O}_2$ wykazali, że atom tlenu w powstałym ketonie pochodzi z cząsteczki alkoholu. Ta sama reakcja, prowadzona w warunkach bez dostępu tlenu, przebiegała standardowo.



Schemat 2. Wpływ obecności tlenu na reakcję tetrameryzacji (za [11]). Dla przejrzystości pominięto podstawniki.

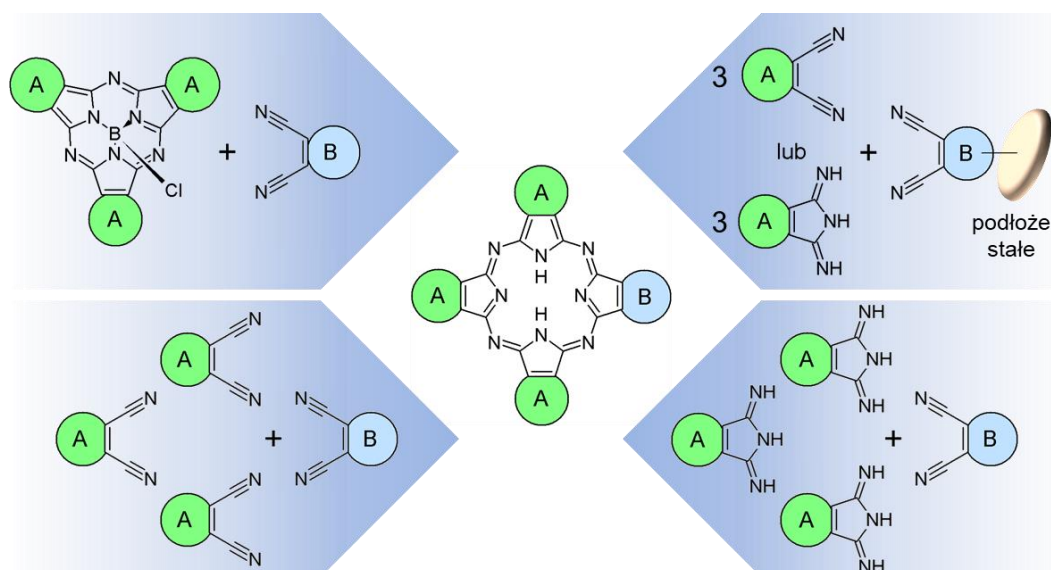
3.1.2. Niesymetryczne aza-porfirynoidy

W zależności od podstawienia porfirazyny i ftalocyjaniny w pozycjach aksjalnych i peryferyjnych można wyróżnić różne symetryczne i niesymetryczne pochodne i izomery, różniące się ilością płaszczyzn symetrii lub nieposiadające punktu symetrii. W przypadku zastosowania w reakcji makrocyklizacji niesymetrycznych pochodnych maleonitrylowych lub monopodstawionych *o*-ftalonytryli, symetria powstałego produktu jest w dużym stopniu zależna od rozmiarów podstawników i wprowadzanej zawady przestrzennej (**Schemat 3**).



Schemat 3. Synteza ftalocyjaniny z monopodstawionego *o*-ftalonitryla. Powstająca ftalocyjanina może być podstawiona w jednej z dwóch pozycji α lub β w każdym pierścieniu benzenowym, jeśli stosowane są odpowiednio 3-podstawione i 4-podstawione pochodne 1,2-dycyanobenzenu. M – jon metalu.

Jeżeli w reakcji przedstawionej na **Schemacie 3** zostaną zastosowane pochodne *o*-ftalonitryla o odpowiednio dużych rozmiarach, możliwe jest wymuszenie powstania makrocykla symetrycznego, tj. 1,8,15,22- lub 2,9,16,23-tetrapodstawionej ftalocyjaniny z odpowiednio 3- i 4-podstawionego *o*-ftalonitryla. W skrajnych przypadkach, kiedy stosowane są bardzo duże podstawniki o małej możliwości rotacji, zawada przestrzenna uniemożliwia zamknięcie pierścienia makrocyklicznego.

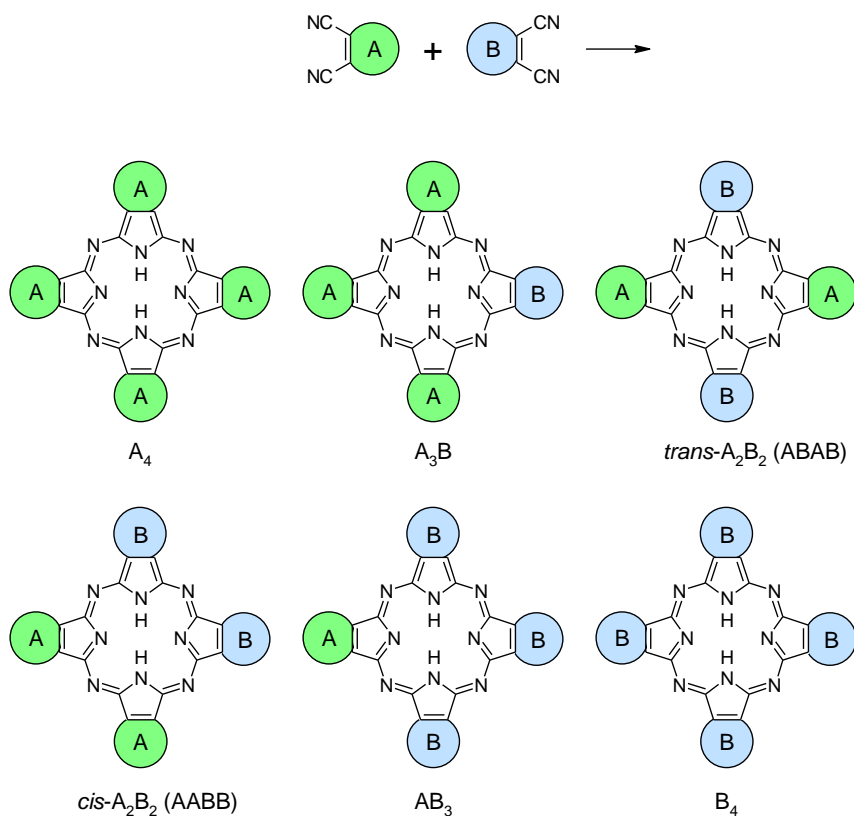


Ryc. 4. Metody syntezy aza-porfirynoidów typu A_3B .

Na przestrzeni lat opracowano kilka sposobów syntezy tribenzoporfirazyń, a więc porfirazyń typu A_3B (**Ryc. 4**) [12]. Najczęściej stosowana metoda oparta jest na kondensacji dwóch maleonitryli (lub pochodnych diiminoizoindoliny) A i B. Ograniczeniem tej metody jest uzyskiwanie mieszaniny produktów np. A_4 , B_4 , *cis*- A_2B_2 , *trans*- A_2B_2 , A_3B oraz AB_3 . Kolejny sposób polega na zastosowaniu reakcji powiększania pierścienia subporfirazyń (lub subftalocyjaniny). Obie wspomniane metody mogą być wzbogacone o wykorzystanie

metody syntezy na podłożach stałych, co dodatkowo ułatwia izolację pożądanego produktu. Inne sposoby otrzymywania niesymetrycznych makrocykli porfirazynowych nie są specyficzne i w znacznym stopniu zależą od struktury chemicznej peryferium porfirynoidu [13]. Bardzo ciekawym przykładem zmiany symetrii jest oksydacyjne otwarcie pierścienia porfirazynowego do *seco*-porfirazyny.

W przypadku wspomnianej wcześniej kondensacji dwóch (lub więcej) pochodnych maleonitrylowych możliwe jest uzyskanie sześciu różnych makrocykli charakteryzujących się różnym stopniem symetrii (**Ryc. 5**).



Ryc. 5. Schematyczne przedstawienie produktów reakcji makrocyklizacji. W reakcji tetrameryzacji przy założonej identycznej reaktywności pochodnych maleo- i *o*-ftalonitryli powstaje zgodnie z regułami statystyki mieszanina 6 produktów makrocyklicznych.

Metoda otrzymywania porfirazyn typu A_3B , choć jest łatwa do przeprowadzenia i wydajna, posiada jednak pewne ograniczenia. Powstające mieszaniny produktów są zwykle trudne do rozdzielania ze względu na zbliżone współczynniki retencji. Najtrudniejsze pod tym względem do izolacji są regioizomery *cis*- i *trans*- A_2B_2 , które charakteryzują się niemal identycznymi współczynnikami retencji. Ich rozdzielenie jest często niemożliwe, nawet przy użyciu bardziej zaawansowanych metod separacji, jak chromatografia wykluczenia (*size-exclusion chromatography*). Metoda otrzymywania porfirazyn typu A_3B

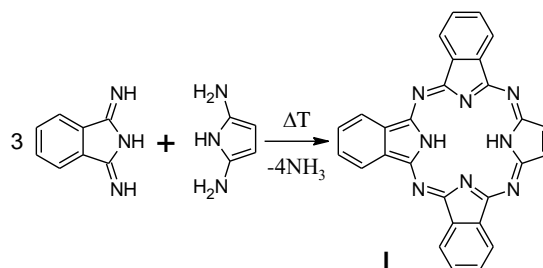
z wykorzystaniem dwóch różnych maleonitryli A i B, przy zastosowaniu odpowiedniego nadmiaru jednej pochodnej maleonitrylowej, prowadzi do pochodnych typu A_3B i A_4 lub AB_3 i B_4 . Przy znaczących różnicach rozpuszczalności rozdzielanych makrocykli, ich wielkości lub mobilności w konkretnych fazach stacjonarnych, możliwe jest wyizolowanie pożądanego produktu. Co ciekawe, ta technika w teorii pozwala na syntezę pochodnych ABCD, jednak w praktyce każdy kolejny maleonitryl dodany do mieszaniny reakcyjnej komplikuje jej obraz i tym samym utrudnia izolację pożądanego produktu [14].

Reakcję rozszerzenia (tzw. ekspansji) pierścienia subporfirazyny i subftalocyjaniny opracowano w grupie prof. T. Torresa. W reakcji tej pokładano wielkie nadzieje, jako metodzie otrzymywania porfirazyn typu A_3B bez równoległego powstawania produktu A_4 [15]. W warunkach tej reakcji, odpowiadającym typowym dla tetrameryzacji, otwarciu ulega pierścień subporfirazyny, do którego następnie jest dobudowywany czwarty pierścień pirolowy. Niestety, z biegiem czasu okazało się, że selektywność tej reakcji jest w bardzo dużym stopniu zależna od podstawników peryferyjnych subporfirazyny i reaktywności pochodnej maleonitrylowej. Stwierdzono ponadto, że w niektórych przypadkach otwarcie pierścienia subporfirazyny jest na tyle gwałtowne, że zamiast trimeru, w reakcji biorą udział trzy tworzące go elementy składowe, a efektem tego jest w powstawanie mieszaniny produktów, jak w przypadku typowej reakcji makrocyklizacji z wykorzystaniem dwóch pochodnych maleonitrylowych.

3.1.3. Tribenzoporfirazyny

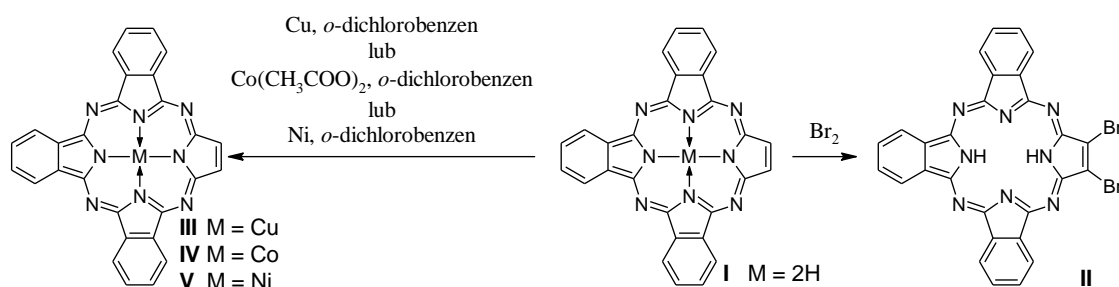
Tribenzoporfirazyny (czasem określane także jako norftalocyjaniny) to specyficzny typ porfirazyn typu A_3B , w których trzy pierścienie pirolowe porfirazyny są sprzężone z pierścieniami benzenu. Po raz pierwszy otrzymanie i wyizolowanie niesymetrycznej porfirazyny A_3B , a jednocześnie tribenzoporfirazyny, zostało opisane w 1955 roku przez Elvidge'a i Linstead [16]. Wspomniany związek, niepodstawiony peryferyjnie, został przez nich zsyntezowany poprzez ogrzewanie mieszaniny imidu kwasu bursztynowego wraz z diiminoizindoliną w stosunku 1:3 (mol/mol) (**Schemat 4**, związek **I**). Omówione przez autorów trudności związane z izolacją tribenzoporfirazyny były częściowo spowodowane zwiększoną rozpuszczalnością obu makrocyklicznych produktów reakcji, zarówno tribenzoporfirazyny, jak i ftalocyjaniny, w przypadku gdy znajdowały się one w mieszaninie (w porównaniu do stwierdzonej rozpuszczalności dla każdego z wyizolowanych związków osobno). Wyraźnie zaznaczona była również ich tendencja do kokryształizacji. Dodatkowo, autorzy zwrócili uwagę na dużo wyższą rozpuszczalność

tribenzoporfirazy w porównaniu z ftalocyjaniną. Poza syntezą i oceną właściwości fizykochemicznych **I**, przeprowadzono również badania stabilności i podatności na rozkład w warunkach utleniających badanego makrocykla z użyciem H₂O₂. Badania te miały także na celu potwierdzenie struktury nowego makrocykla. Produktem rozkładu tribenzoporfirazy **I** był ftalimid, który wyizolowano, oraz niemożliwy do identyfikacji „gumowaty osad” – złożony najprawdopodobniej ze spolimeryzowanych pochodnych aminopirolowych.



Schemat 4. Reakcja syntezy tribenzoporfirazy w oparciu o procedurę Elvidge’a i Linstead’a [16].

Badania tribenzoporfirazy były kontynuowane przez tę grupę badawczą, a w 1957 r. Elvidge i wsp. opublikowali artykuł, w którym opisali próbę optymalizacji syntezy **I** z wykorzystaniem innych substratów, między innymi *o*-ftalonitryla oraz butanodinitryla. Niestety zaproponowane metody syntetyczne, nie wniosły istotnej poprawy względem poprzednio stosowanych [17]. Bardzo ważnym elementem pracy była optymalizacja izolacji i oczyszczania makrocykla, co bardzo obrazowo przedstawiono, stwierdzając: „obecnie jeden pracownik jest w stanie uzyskać 200 miligramów **I** w trzy tygodnie, podczas gdy uprzednio otrzymanie 10-20 miligramów związku zajmowało 7-8 tygodni”. Dodatkowo, wyizolowano jedno z zanieczyszczeń, które okazało się być – również niesymetryczną – monobenzoporfirazyną. W dalszej części artykułu autorzy skupili się na ocenie reaktywności **I** (**Schemat 5**). W tym celu przeprowadzili substytucję atomów wodoru w pierścieniu pirolu **I** z wykorzystaniem wody bromowej (nasycony wodny roztwór bromu), co w efekcie pozwoliło na uzyskanie **II** (podstawieniu nie uległy pierścienie fenylowe). Inna metoda modyfikacji **I** polegała na wprowadzeniu jonu metalu do centrum koordynacyjnego makrocykla, co doprowadziło do uzyskania pochodnych miedzi(II), kobaltu(II) oraz niklu(II) – odpowiednio **III**, **IV** i **V**. W artykule przedstawiono także charakterystykę spektroskopową otrzymanych związków z użyciem spektrofotometrii UV-Vis.

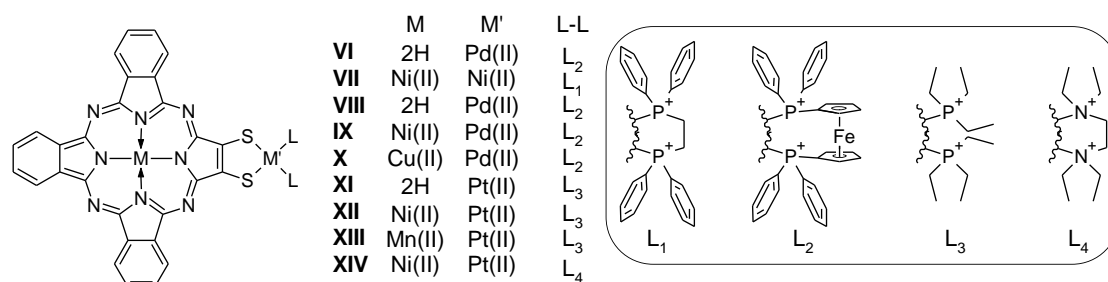


Schemat 5. Przebieg oceny reaktywności tribenzoporfirazy **I** zaproponowany w publikacji [17].

Ze względu na podstawniki peryferyjne, można wyróżnić porfirazyny sulfanyłowe (połączone z pierścieniem Pz poprzez atom siarki), azotowe (przez atom azotu – aminy, iminy) oraz tlenowe. Ze względu na łatwą dostępność i możliwą modyfikację dimerkaptomaleonitryla i diaminomaleonitryla najwięcej doniesień literaturowych dotyczy właśnie S-tribenzoporfirazy i N-tribenzoporfirazy, co omówiono w kolejnych podrozdziałach.

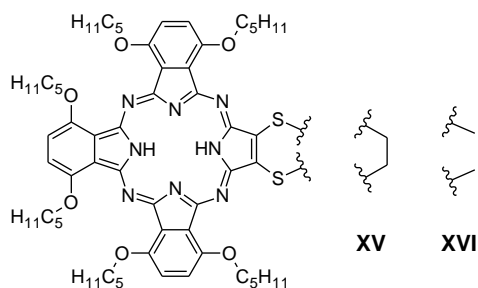
3.1.3.1. S-tribenzoporfirazy (tribenzoporfirazy siarkowe)

Tematyka niesymetrycznych aza-porfirynoidów była rozwijana w grupie Kobayashiego i wsp. [18], a także w grupie badawczej profesorów A. G. M. Barretta i B. M. Hoffmana [19]. Wykorzystali oni tribenzoporfirazy do otrzymania **VI**, przedstawiciela tzw. *solitaire porphyrazines* (ang. *solitaire* oznacza pojedynczy kamień szlachetny lub grę karcianą dla jednej osoby; brak dokładnego odpowiednika w języku polskim [20]), czyli porfirazy chelatujących jony metali nie tylko w obrębie centrum koordynacyjnego pierścienia porfirazy, ale również w obrębie jednej z grup peryferyjnych. Są to analogi tzw. gwiazdzistych porfirazy (ang. *star porphyrazines*) [21], które są pochodnymi symetrycznymi A₄, zdolnymi do koordynowania jonów metali przy każdym, odpowiednio podstawionym heteroatomami pierścieniu pirolowym.



Ryc. 6. Budowa chemiczna tribenzoporfirazy typu *solitaire* **VI-XIV** otrzymanych przez Baumana i wsp. [19,22].

Do badań Bauman i wsp. wybrali porfirazyny siarkowe, które charakteryzują się dobrą rozpuszczalnością i – co podkreślono w artykule – możliwe było ich łatwe wydzielenie z mieszaniny produktów po reakcji tetrameryzacji [19,22]. Pierwszym etapem była synteza pochodnej dimerkaptomaleonitryla z ugrupowaniami 4-butoksykarbonylobenzylowymi, który następnie poddano reakcji makrocyklizacji z nadmiarem 1,2-dicyjanobenzenu otrzymując w efekcie peryferyjnie funkcjonalizowaną tribenzoporfirazynę magnezową. W kolejnych reakcjach produkt makrocykliczny poddano kolejno reakcjom: wymiany jonu metalu na drodze demetalacji i remetalacji, a następnie deprotekcji grup tiolowych. Ta ostatnia była możliwa po poddaniu makrocykla reakcji z metalicznym sodem w warunkach ciekłego amoniaku. Uzyskana tribenzoporfirazyna z dwiema grupami tiolowymi okazała się wrażliwa na tlen z powietrza, dlatego po wstępnym oczyszczeniu została poddana dalszej modyfikacji w części peryferyjnej do porfirazyn typu *solitaire* VI-XIV (Ryc. 6). Badania porfirazyn typu *star* i *solitaire* skłoniły w tym czasie Guo i wsp. do wykonania prac obliczeniowych w zakresie porfirazyn niklu(II) tworzących chelaty peryferyjne z innymi jonami metali [23]. Do badań zastosowano oktatiolową porfirazynę, jako związek modelowy typu A₄ i peryferyjnie zmodyfikowaną 2,3,9,10,16,17,23,24-oktahydroksyftalocyjaninę, jako związek modelowy typu B₄. W badaniach wykorzystano dane krystalograficzne o ftalocyjaninach z wcześniejszych publikacji (z pominięciem podstawników), a obliczenia prowadzono poprzez stopniowe wymienianie poszczególnych „merów” makrocykli (A₃B, A₂B₂, AB₃). Badania dały pewien pogląd na efekty elektronowe w obrębie pierścienia makrocyklicznego pochodnych niesymetrycznych.

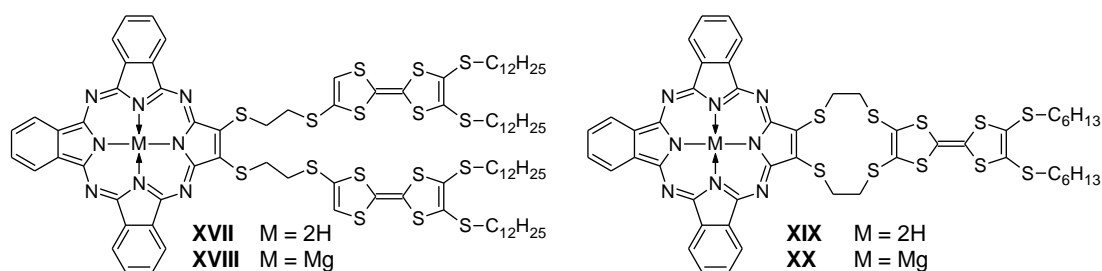


Ryc. 7. Budowa chemiczna tribenzoporfirazyn siarkowych **XV** i **XVI** otrzymanych przez Nikolaeva i wsp.[24]

Następnym znaczącym doniesieniem naukowym dotyczącym tematyki tribenzoporfirazyn sulfanylowych jest praca opublikowana przez Nikolaeva i wsp., w której przedstawiono syntezę dwóch nowych związków **XV** i **XVI** [24]. Jednak w tym przypadku pierścienie benzenowe ftalonitryla użytego w nadmiarze zostały podstawione grupami *n*-pentoksyłowymi, co w efekcie doprowadziło do uzyskania heksapodstawionej

tribenzoporfirazy siarkowej (pozycje 2,3) (**Ryc. 7**). Wybór substratu wynikał z interesującej właściwości, a mianowicie takiej, że 3,6-dipentoksyftalonitryl nie ulega reakcji autotetrameryzacji do ftalocyjaniny typu A_4 , a jedynie współtworzy makrocykle typu A_2B_2 i A_3B , w obecności drugiej, mniej zatłoczonej przestrzennie pochodnej maleonitryla lub *o*-ftalonitryla. Jest to bardzo ważny substrat do syntezy związków typu A_3B , ponieważ, ze względu na to, że nie ulega reakcji makrocyklizacji do ftalocyjaniny typu A_4 , dużo łatwiejsze jest oczyszczenie i izolacja pożądanego makrocykla. Ciekawą właściwością spektroskopową uzyskanych tribenzoporfirazyn jest to, że mimo jedynie drobnych różnic strukturalnych, **XV** i **XVI** różnią się znacząco w zakresie pasma Q. Związek **XVI** wykazuje trzy wyraźnie zaznaczone maksima absorpcji, podczas gdy **XV** posiada jedynie dwa maksima. Celem określenia, czy jest to spowodowane wymuszoną planarnością w tym fragmencie cząsteczki (grupy metylowe są połączone ze sobą w **XV**, przez co uniemożliwiona jest ich rotacja) autorzy wykonali eksperyment obliczeniowy. Wykazano, że grupy metylowe w obu przypadkach przyjmują niemal identyczne położenie w przestrzeni i są tylko minimalnie odchyłone od płaszczyzny makrocykla, a różnice w ich widmach absorpcji są spowodowane różnicami w symetrii zajętych orbitali molekularnych.

W związku z rozwojem techniki, poszukuje się nowych związków o interesujących właściwościach elektronowych, w tym donorowo-akceptorowych. W ten trend wpisują się poszukiwania nowych tribenzoporfirazyn siarkowych **XVII–XX** z przyłączonymi do peryferium podstawnikami posiadającymi w swojej strukturze tetratiafulwalen (**Ryc. 8**).



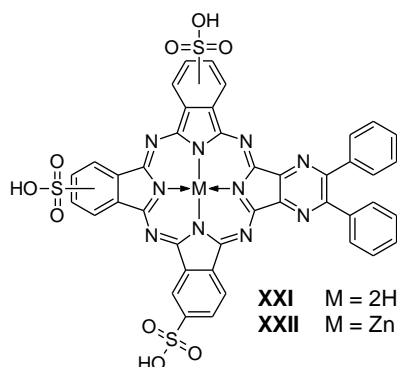
Ryc. 8. Budowa chemiczna tribenzoporfirazyn z tetratiafulwalenem **XVII–XX**.

Yin i wsp. uzyskali tribenzoporfirazynę sulfanylową, w strukturze której znajdują się dwie takie grupy [25]. Poza dość rozbudowaną syntezą pochodnej dimerkaptomaleonitryla, w pracy przedstawiono charakterystykę fizykochemiczną, w szczególności elektrochemiczną tribenzoporfirazyn **XVII** i **XVIII**. Ponadto, magnezowa pochodna **XVIII** została poddana ocenie podatności na agregację w tetrahydrofuranie (THF) i *N,N*-dimetyloformamidzie (DMF), nie wykazując podatności na ten proces. Zbliżone badania przeprowadził także zespół badawczy Guo i wsp. [26]. Autorzy uzyskali magnezową i demetalowaną siarkową

tribenzoporfirazyne połączoną z jedną jednostką tetratriafulwalenu poprzez tioeter 12-korona-4. Związki **XIX** i **XX** zostały scharakteryzowane fizykochemicznie, a ze względu na ciekawe właściwości elektrochemiczne **XX**, autorzy dodatkowo przeprowadzili prace obliczeniowe celem lepszego zrozumienia struktury elektronowej i wyjaśnienia uzyskanych wyników.

3.1.3.2. N-tribenzoporfirazy (tribenzoporfirazy azotowe)

W latach 90. Kudrevich i wsp. poszukując nowych fotosensybilizatorów dla potencjalnych zastosowań w PDT, poddali trisulfonowaną subftalocyjaninę reakcji ekspansji pierścienia w reakcji z pochodnymi diiminoizoindoliny [27]. Jednym z otrzymanych produktów była pirazynotribenzoporfirazy **XXI** i jej pochodna metaliczna ze skoordynowanym jonem cynku **XXII** (Ryc. 9). Co jest interesujące, obecność grup sulfonowych sprawiła, że uzyskane produkty charakteryzowały się rozpuszczalnością w wodzie, metanolu i DMF.

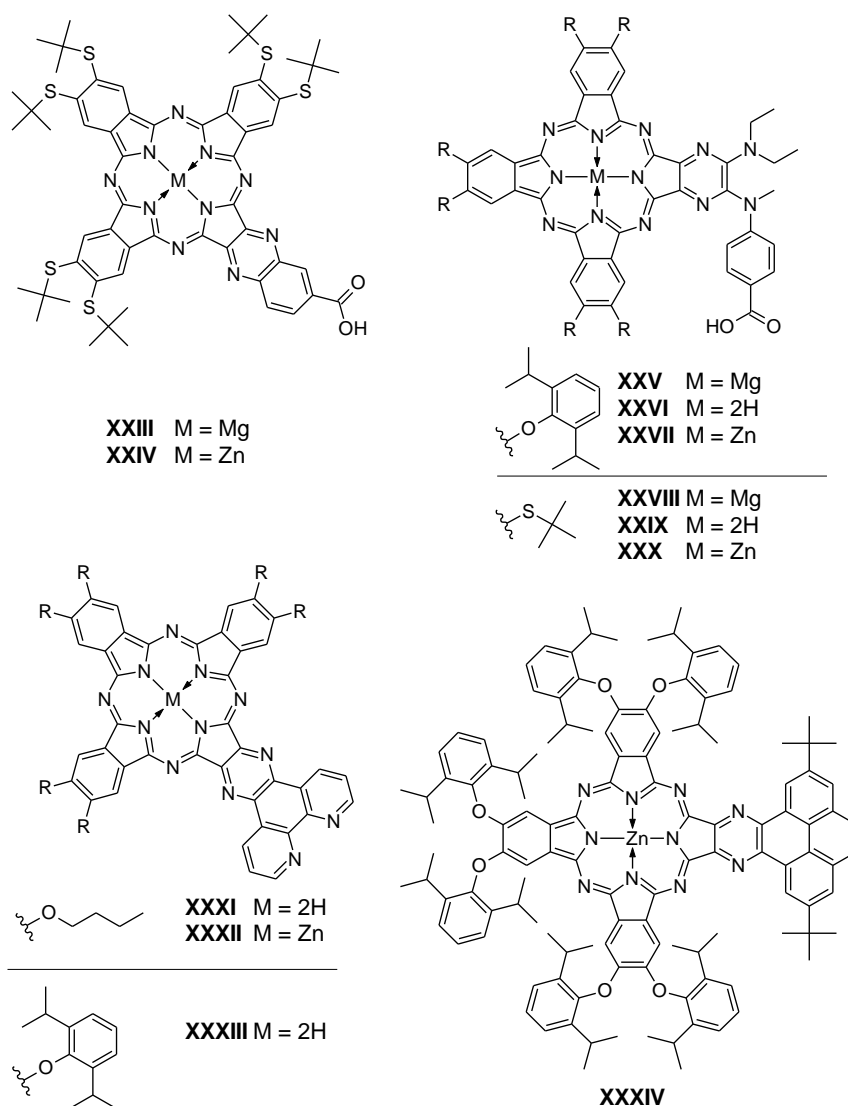


Ryc. 9. Budowa chemiczna rozpuszczalnych w wodzie porfirazyn **XXI** i **XXII** otrzymanych przez Kudrevich i wsp. [27].

Ze względu na obiecującą rozpuszczalność oraz amfifilowy charakter, **XXII** wraz z innymi pochodnymi asymetrycznymi został poddany badaniom biologicznym mającym na celu ocenę potencjalnego zastosowania w PDT – zarówno w warunkach *in vitro* (linia komórkowa EMT-6, mysz rak sutka), jak i *in vivo* na modelu zwierzęcym (myszy). Pewnym mankamentem badań okazało się słabe przełożenie uzyskanych wyników aktywności fotodynamicznej *in vitro* i *in vivo*.

Pirazynotribenzoporfirazy były także obiektem zainteresowania Zimcika i wsp., którzy otrzymali magnezowe i cynkowe kompleksy **XXIII** i **XXIV** [28]. W tym jednak przypadku, pierścień pirazynowy został dodatkowo sprzężony z pierścieniem fenylowym (Ryc. 10). Poza syntezą, w pracy przedstawiono charakterystykę fizykochemiczną i ocenę właściwości spektralnych makrocykli. Makrocykl **XXIV** został także poddany modyfikacji

w obrębie grupy kwasowej, celem sprawdzenia możliwości jego zastosowania w ewentualnej terapii celowanej [29,30].

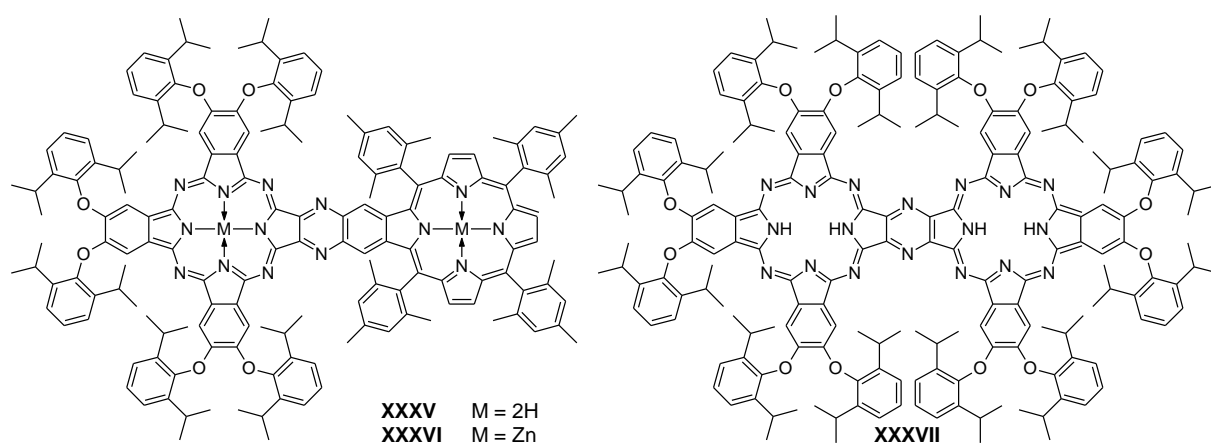


Ryc. 10. Budowa chemiczna pochodnych pirazynotribenzoporfirazy **XXIII-XXXIV**.

Tribenzoporfirazy pirazynowe były przedmiotem badań Vachovej i wsp., którzy otrzymali serię związków zawierających różne kationy metali **XXV-XXX** [31]. Ważną właściwością uzyskanej serii porfirazy, wynikającą z ich charakterystyki fotochemicznej, okazała się lepsza zdolność do generowania tlenu singletowego przez pochodne tribenzoporfirazy w porównaniu do analogicznych tetrapirazyloporfirazy.

Kan i wsp. otrzymali pirazynotribenzoporfirazy z rozbudowanym układem sprzężonych pierścieni aromatycznych [32]. W reakcji makrocyklizacji 4,5-dibutoksy-1,2-dicyjanobenzenu i 10,12-diimino-11*H*-pirolo[3,4-*b*]dipirydo[3,2-*f*:2',3'-*h*]chinoksaliny uzyskali tribenzoporfirazy **XXXI** i **XXXII** sprzężone z układem fenantroliny (**Ryc. 10**). Warto dodać, że **XXXI** uzyskano w postaci kryształów (z mieszaniny chloroform/metanol),

które w zdjęciu pozyskanym z mikroskopu elektronowego przybrały strukturę nanodrutów. Powyższe nanostruktury w kolejnych badaniach wykazały się właściwościami półprzewodnikowymi. Związek zbliżony pod względem budowy chemicznej, jednak z podstawnikami 2,6-di(propan-2-ylo)fenoksyłowymi otrzymali Martynov i wsp. (związek **XXXIII** na **Ryc. 10**) [33]. Ze względu na interesujące właściwości spektralne (nietypowe widmo absorpcyjne w zakresie fal widzialnych), autorzy wykonali także obliczenia teoretyczne. Stwierdzono, że w roztworze występuje tylko jeden tautomer o równocennych grupach NH w rdzeniu makrocykla. Pochodne pirazynotribenzoporfirazyń z silnie skoniugowanym układem elektronowym były również obiektem badań Pan i wsp. [34], którzy otrzymali między innymi **XXXIV**, tribenzoporfirazyń zawierającą w strukturze układ pirenu sprzężony z pierścieniem pirazyny (**Ryc. 10**). Poza pełną charakterystyką fizykochemiczną, obejmującą także elektrochemiczną, autorzy uzyskali monokryształ **XXXIV**, który poddali także rentgenostrukturalnej.

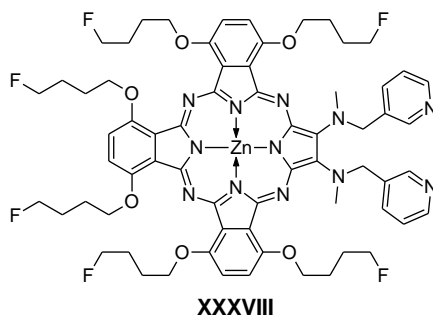


Ryc. 11. Budowa chemiczna dimerów porfirazyńo-porfirynowych **XXXV**, **XXXVI** i bisporfirazyńowego **XXXVII**.

Dążenie do rozbudowy układu makrocyklicznego zaowocowało syntezą dimeru porfirazyńo-porfirynowego **XXXV** i jego dicynkowej pochodnej **XXXVI** (**Ryc. 11**) [35]. Tak duże struktury planarne są w znacznym stopniu narażone na agregację, czemu przeciwdziałać miał w zamyśle autorów dobór podstawników peryferyjnych charakteryzujących się zawadą steryczną. Oba związki zostały scharakteryzowane pod względem fizykochemicznym, a ich właściwości elektrochemiczne i optyczne porównano z niepołączonymi cząsteczkami porfirazyńy i porfiryny. Zbliżoną strukturę, jednak składającą się z dwóch jednostek tribenzoporfirazyńowych sprzężonych wspólnym pierścieniem pirazynowym **XXXVII** uzyskali Wang i wsp. [36]. Synteza tego związku została zaprojektowana technikami obliczeniowymi DFT (*density functional theory* - ang. teoria

funkcjonału gęstości). Połączenie technik eksperymentalnych i obliczeniowych otworzyło drogę do pełniejszego zrozumienia mechanizmu powstawania dimeru **XXXVII**.

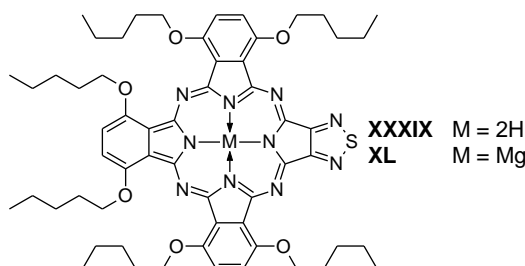
Gośliński i wsp. otrzymali tribenzoporfirazynę podstawioną łańcuchami ω -fluoroalkilowymi [37] (**Ryc. 12**).



Ryc. 12. Budowa chemiczna tribenzoporfirazyny fluorowanej **XXXVIII**.

Podczas syntezy pochodnej diaminomaleonitryla, substratu do otrzymania **XXXVIII**, napotkano na interesujący problem preparatywny. W ostatnim etapie ścieżki syntetycznej, podczas metylowania drugorzędowych atomów azotu 2,3-bis[(pirydyn-3-ylometylo)amino]but-2-enodinitryla, siarczan(IV) dimetylu zamiast działać metylująco okazał się akceptorem jonu wodorkowego, prowadząc do odwodornienia wspomnianej aminy drugorzędowej do iminy. Celem wyjaśnienia tego zjawiska zastosowano techniki chemii obliczeniowej. Dodatkowo, porfirazynę **XXXVIII** poddano ocenie zdolności koordynacji jonów palladu przez heteroatomy peryferyjnych ugrupowań pirydylowych oraz zbadano jej właściwości solwatochromowe.

Donzello i wsp. użyli również w reakcjach makrocyclizacji wspomnianego wcześniej 3,6-dipentoksyftalonitryla. Poddanie tego związku reakcji kondensacji z 3,4-dicyjano-1,2,5-tiadiazyną pozwoliło na izolację serii makrocycli sprzężonych z pierścieniem tiadiazynowym [38], w tym tribenzoporfirazyn **XXXIX** oraz **XL** (**Ryc. 13**).

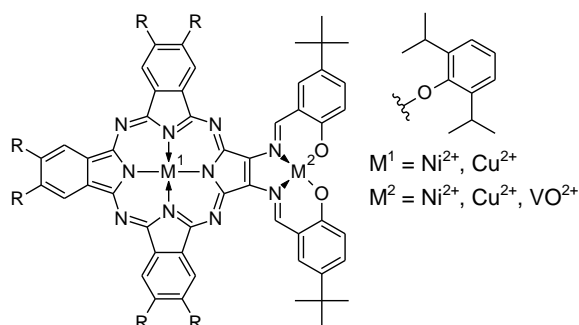


Ryc. 13. Budowa chemiczna tribenzoporfirazyn ze sprzężonym z pierścieniem 1,2,5-tiadiazyny **XXXIX** i **XL**.

Ze względu na różną naturę podstawników – pierścienie: z ugrupowaniami *n*-pentoksyłowymi (właściwości elektronodonorowe), tiadiazol (właściwości

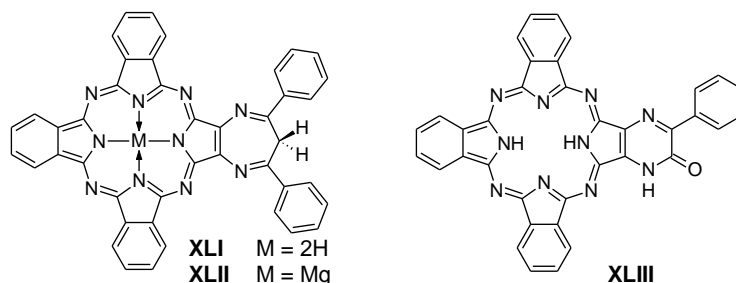
elektronoakceptorowe) – zaobserwowano bardzo ciekawe właściwości spektralne i kwasowo-zasadowe, a uzyskane struktury krystalograficzne dodatkowo wzbogaciły pracę. Uzyskana seria porfirazyn, a między nimi również **XXXIX**, zostały poddane dalszym badaniom z wykorzystaniem technik spektropotencjometrycznych oraz technik obliczeniowych przez Sheinin i Ivanovą [39].

Do tematyki syntezy porfirazyn typu *solitaire* dołączyła też grupa badawcza Ikeue i wsp. [40]. Poprzez otwarcie pierścienia selenadiazolowego (deselenacja) w strukturze tribenzoporfirazyny i dalszą modyfikację chemiczną wolnych grup aminowych, uzyskali oni szereg pochodnych chelatujących jony niklu i miedzi, a także wanadu w peryferium makrocykla, przy jednoczesnym wiązaniu jonu metalu w centrum koordynacyjnym – takiego samego lub innego niż w peryferium (**Ryc. 14**).



Ryc. 14. Budowa chemiczna porfirazyn typu *solitaire* otrzymanych przez Ikeue i wsp. [40].

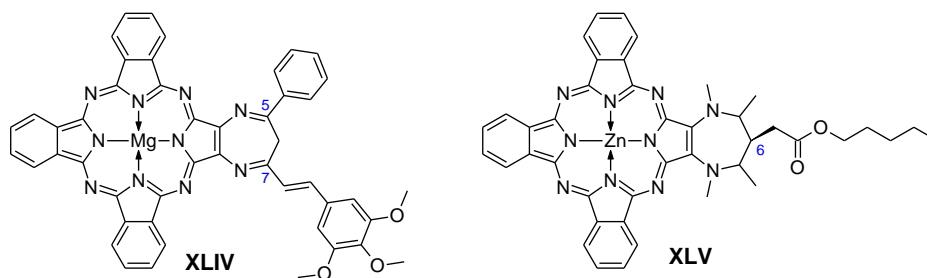
Z kolei grupa Donzello i wsp. podjęła się prac syntetycznych zmierzających do otrzymania tribenzoporfirazyny sprzężonej z pierścieniem 1,4-diazepinowym [41]. Uzyskanie tej pochodnej możliwe było poprzez reakcję kondensacji pochodnej 2,3-dicyjano-1,4-diazepiny z dziesięciokrotnym molowym nadmiarem 1,2-dicyjanobenzenu (**Ryc. 15**). Autorzy zastosowali różne warunki reakcji, co pozwoliło na otrzymanie i scharakteryzowanie diazepinotribenzoporfirazyny **XLI** i jej kompleksu magnezowego **XLII**.



Ryc. 15. Budowa chemiczna diazepinotribenzoporfirazyn **XLI**, **XLII** otrzymanych przez Donzello i wsp. wraz z produktem ubocznym tetrameryzacji **XLI**, czyli **XLIII** [41,42].

Zastosowanie w tym przypadku tak znaczącego nadmiaru 1,2-dicyjanobenzenu pozwoliło na otrzymanie niemal wyłącznie pochodnej A₃B (poza niepodstawioną ftalocyjaniną), jedynie śladowe ilości pochodnych typu A₂B₂ były obecne w mieszaninie poreakcyjnej, ale możliwe było ich usunięcie metodami chromatograficznymi. Uzyskany związek występował po krystalizacji jako monohydrat. Autorzy poszerzyli dodatkowo swoje badania o spektrometrię mas. Ze względu na naturę pierścienia 1,4-diazepiny może ona występować w postaci dwóch tautomerów: enaminy (1*H*) i diiminy (6*H*). Obliczenia chemiczne podjęte dla zgłębienia tego zagadnienia wykazały, że forma diiminy jest termodynamicznie bardziej stabilnym tautomerem, co potwierdzono także eksperymentem NMR w podwyższonej temperaturze, gdzie odnotowano pojawienie się dwóch sygnałów od atomu wodoru aksjalnego i ekwatorialnego grupy CH₂ w pozycji 6. Podczas syntezy związku **XLII**, Malyasova i wsp. uzyskali dodatkowo inny związek makrocykliczny [42], który na podstawie analizy NMR i spektrometrii mas został zidentyfikowany jako pochodna **XLIII**. W strukturze tego związku można zauważyć pierścień pirazynowy, który jest wynikiem kontrakcji pierścienia diazepiny z jednoczesną eliminacją podstawnika fenyłowego.

Gośliński i wsp. kontynuując tę tematykę badawczą, otrzymali nową pochodną diazepinotribenzoporfirazy **XLIV** (**Ryc. 16**) [43], która w pozycjach 5 i 7 pierścienia diazepiny posiada podstawniki fenyłowy i 3,4,5-trimetoksystrylowy. W pracy omówiono także syntezę i właściwości fizykochemiczne tribenzoporfirazy cynkowej podstawionej ugrupowaniem estrowym w pozycji C6 pierścienia uwodornionej 1,4-diazepiny **XLV**.



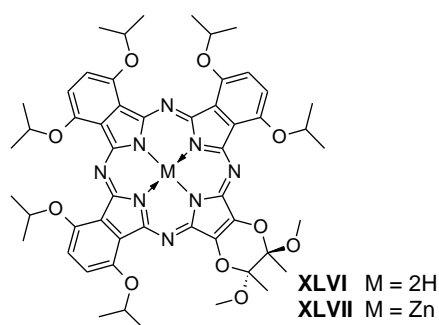
Ryc. 16. Budowa chemiczna pochodnych diazepinotribenzoporfirazy **XLIV** i **XLV** [43].

Badania syntetyczne ograniczono do porfirazy **XLIV**, gdyż użycie w reakcji makrocyklizacji niesymetrycznego diazepinodinitryla prowadziło najprawdopodobniej do mieszaniny izomerów podstawienia (tzw. randomerów) typu A₄, trudnych do rozdzielenia podczas chromatografii kolumnowej. W przypadku **XLV** wybór związku do badań typu A₃B był podyktowany pojawieniem się chiralności centrosymetrycznej węgla w pozycji C6.

Tribenzoporfirazyne **XLIV** została użyta przez Piskorza i wsp. do oceny aktywności fotodynamicznej na liniach komórek nowotworowych raka kolczystokomórkowego jamy ustnej HSC-3 i H413 [44]. Eksperymenty te wykazały wysoką aktywność fotodynamiczną tribenzoporfirazyne w stanie wolnym przy jednoczesnej niskiej toksyczności bez naświetlania – wartość IC_{50} względem HSC-3 wyniosła $129 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$. Ze względu na słabą rozpuszczalność makrocykla w wodzie, autorzy zwrócili się w kierunku zastosowania różnych formułacji liposomalnych jako nośnika dla tribenzoporfirazyne. Dzięki wykorzystaniu liposomów, możliwe było uzyskanie niższych wartości IC_{50} (aż do $0,045 \mu\text{mol}/\text{l}$) przy stwierdzonej jednoczesnej niskiej toksyczności bez naświetlania. Dodatkowo, na podstawie fluorescencji możliwa była ocena lokalizacji tribenzoporfirazyne w komórkach nowotworowych – przede wszystkim w obrębie mitochondriów.

3.1.3.3. O-tribenzoporfirazyne (tribenzoporfirazyne tlenowe)

Ostatnią – i najmniej liczną – grupą związków są tribenzoporfirazyne łączące się z podstawnikami części peryferyjnej przez atom tlenu. Wartą wspomnienia jest publikacja Trivedi i wsp. [45], wykonana w ramach prac grupy badawczej profesorów A. G. M. Barretta i B. M. Hoffmana. W pracy przedstawiono metodę oczyszczenia i charakterystykę fizykochemiczną prawie wszystkich możliwych makrocykli powstających w reakcji mieszanej tetrameryzacji pochodnej maleonitryla i pochodnej *o*-ftalonytryla [45], z których jeden jest związkiem chiralnym. Wśród tych pochodnych znalazła się również tribenzoporfirazyne demetalowana **XLVI** oraz koordynująca jon cynku **XLVII** (Ryc. 17).



Ryc. 17. Budowa chemiczna pochodnych tribenzoporfirazyne tlenowych **XLVI** i **XLVII** [45].

Autorzy otrzymali i rozwiązyli strukturę krystalograficzną **XLVII**, w której występuje deformacja pierścienia makrocyklicznego ze względu na zawadę steryczną wywoływaną przez podstawniki izopropoksyłowe przy pierścieniach benzenowych. Fakt ten wyjaśnia także, dlaczego zastosowanie 1,2-dicyjano-3,6-bis(2-propoksy)benzenu faworyzuje powstawanie pochodnych typu *trans*-A₂B₂. Wszystkie otrzymane makrocykle próbowano wbudować w liposomy i ocenić ich aktywność w badaniach *in vitro* względem komórek A549

(ludzki gruczolakorak) oraz WI-38 VA13 (nienowotworowe fibroblasty). Stwierdzono jednak, że tribenzoporfirazy charakteryzowały się bardzo słabym generowaniem tlenu singletowego, niską rozpuszczalnością w wodzie oraz niemożnością zastosowania w formulacji liposomalnej. Warto jednak podkreślić, że makrocykle **XLVI** i **XLVII** wykazywały najwyższą fluorescencję wśród serii badanych porfiryroidów.

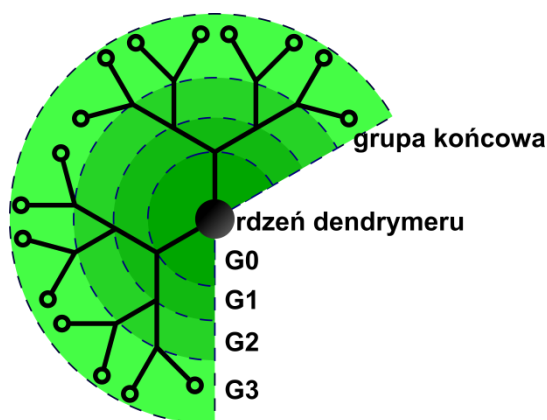
3.2. Dendrymery

Jak już wspomniano wcześniej, podstawniki peryferyjne z dużą zawadą przestrzenną zmniejszają prawdopodobieństwo wystąpienia agregacji związków makrocyklicznych. Pod tym względem korzystne wydaje się wykorzystanie dendrymerów, które poza budową chemiczną charakteryzują się również bardzo ciekawymi właściwościami o potencjalnym zastosowaniu w chemii medycznej.

Dendrymery to rodzaj polimerów, które wyróżniają się tym, że są silnie rozgałęzione, mają kształt w przybliżeniu kulisty, a ich struktura jest ściśle zdefiniowana. Po raz pierwszy zostały zsyntezowane w 1978 roku [46], wzbudzając zainteresowanie w naukach chemicznych i w obszarze chemii medycznej. Poza znaczącymi zdolnościami do tworzenia kompleksów (tzw. dendripleksów) z innymi cząsteczkami – w tym z lekami – same dendrymery *per se* również wykazują aktywność biologiczną [47]. Możliwość niemal nieograniczonej modyfikacji ich struktury i szeroki wachlarz potencjalnych zastosowań sprawiają, że cieszą się one niesłabnącym zainteresowaniem naukowców z całego świata pracujących w wielu dziedzinach nauki.

3.2.1. Budowa dendrymerów

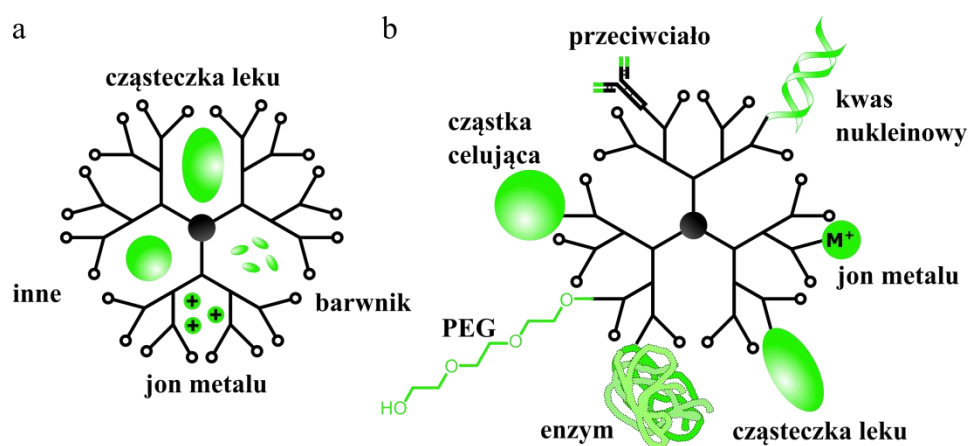
W budowie chemicznej dendrymerów można wyróżnić trzy podstawowe fragmenty: rdzeń dendrymeru, dendrony, czyli poszczególne „gałęzie” odchodzące od rdzenia oraz grupy końcowe (**Ryc. 18**).



Ryc. 18. Schemat budowy dendrymeru.

Rdzeń dendrymeru może stanowić jedynie rusztowanie, na którym wsparte są dendrony – na przykład atom azotu w dendrymerach poli(amidoaminowych) (PAMAM) – ale też sam w sobie może być też cząsteczką aktywną biologicznie [48,49]. W przypadku farmakologicznie aktywnego rdzenia, przyłączone do niego dendrony mogą pełnić kilka funkcji, na przykład zapewniać lepszą rozpuszczalność, osłaniać rdzeń przed czynnikami, które wpływają na jego trwałość, pełnić funkcję biologiczną i inne. W przypadku użycia jako rdzenia dendrymeru makrocykla porfirynoidowego, porfiryny lub ftalocyjaniny, zastosowanie dendronów wpływa na poprawę jego rozpuszczalności, a także ograniczenie agregacji związanej z rozbudowanym planarnym pierścieniem bogatym w sprzężone wiązania π [50].

Poszczególne dendrony są zbudowane z monomerów w ten sposób, że każde kolejne rozgałęzienie daje w efekcie nową generację dendrymeru (poczynając od generacji zerowej, G0), przy jednoczesnej multiplikacji liczby grup terminalnych. W przypadku dendronu typu AB₂ każda rozbudowa o jedną generację zwiększa liczbę grup końcowych dwukrotnie, w dendronach AB₃ – trzykrotnie. Ten wykładniczy wzrost umożliwia szybkie wzbogacenie struktury dendrymeru w określoną liczbę – możliwych do sfunkcjonalizowania – grup końcowych. W przypadku zastosowania biodegradowalnych połączeń monomerów (np. grupy estrowe), dendrymer może być pomocny jako system do przedłużonego uwalniania danego leku. Inne potencjalne zastosowania dendrymerów obejmują terapię celowaną, kiedy to lek lub inna cząsteczka są uwalniane z przestrzeni między dendronami w środowisku o określonych właściwościach, np. pH albo w obecności określonych enzymów.



Ryc. 19. Metody funkcjonalizacji dendrymeru i możliwości jego wykorzystania jako nośnika wykorzystując (a) wewnętrzne przestrzenie i (b) peryferyjne grupy funkcyjne. PEG – polietylenoglikol.

Grupy końcowe dendrymeru występują na zakończeniach dendronów i mogą być w niemal dowolny sposób modyfikowane (**Ryc. 19**). Co bardzo ważne – niejednokrotnie

do grup końcowych dendrymerów są przyłączane kowalencyjnie związki aktywne, które ulegają uwolnieniu w określonych warunkach. Dobrym przykładem takiego działania jest dendrymer z 18 cząsteczkami kwasu 5-aminolewulinowego przyłączonymi do peryferyjnych grup terminalnych, co ułatwia jego podanie i ewentualną dystrybucję w organizmie [51]. Znane są także procedury syntetyczne umożliwiające modyfikację nie wszystkich, a jedynie części grup końcowych, dzięki czemu możliwe jest otrzymanie dendronów sfunkcjonalizowanych zarówno substancjami aktywnymi, cząstkami do terapii celowanej a także związkami fluoryzującymi, co próbuje się wykorzystywać zarówno w terapii, jak i w diagnostyce [52].

3.2.2. Zastosowania dendrymerów w chemii medycznej i farmacji

3.2.2.1. Dendrymery w terapii przeciwnowotworowej

Dendrymery w związku ze swoimi wyróżniającymi się właściwościami tworzenia dendripleksów są brane pod uwagę jako nośniki leków, w tym leków przeciwnowotworowych [5,53]. Wykorzystanie dendrymerów jako nośników leków albo jako postaci leku wiąże się z dłuższym czasem uwalniania substancji leczniczej z ich połączeń (kompleksów) z lekami i możliwym w związku z tym do uzyskania przedłużonym działaniem. Dodatkowo, dendrymery wykazują właściwość solubilizowania wielu związków, z którymi znajdują się w mieszaninach w roztworze, umożliwiając sporządzanie bardziej stężonych formułacji. Wykorzystanie różnych cząsteczek celujących, ukierunkowanych na komórki nowotworowe (np. kwasu foliowego), zwiększa selektywność tych połączeń w terapiach przeciwnowotworowych. W wielu przypadkach dało się również zaobserwować wyższą biogodność formułacji dendrymerycznych w porównaniu z wolnym lekiem, co w znaczący sposób zmniejsza toksyczność takiej terapii dla zdrowych komórek i ogranicza działania niepożądane. Również zastosowanie połączeń kowalencyjnych dendrymerów z lekami z użyciem wiązań estrowych pozwoliło na uzyskanie form prolekowych i ich aktywacji w miejscu działania.

Spośród dendripleksów, które zostały jak dotąd najlepiej przebadane, wyróżniają się przede wszystkim kompleksy dendrymerów z lekami, takimi jak doksorubicyna, cisplatyna i metotreksat. W przypadku tych substancji aktywnych zastosowanie formułacji dendrymerycznej spowodowało obniżenie toksyczności oraz zwiększało aktywność działania [47].

3.2.2.2. Aktywność przeciwdrobnoustrojowa dendrymerów

Tak, jak w przypadku terapii nowotworowej, również w poszukiwaniach nowych efektywnych związków o potencjalnym zastosowaniu w terapii chorób zakaźnych, dużym zainteresowaniem cieszą się dendrymery jako nośniki leków przeciwdrobnoustrojowych. W tym właśnie celu przebadano wiele kompleksów dendrymer-lek, przy czym badane leki wykazywały różnorodną aktywność – przeciwbakteryjną (np. tobramycyna [54], azytromycyna [55], nanosrebro [56]), przeciwgrzybiczą (np. nystatyna [57], przeciwgrzybicze azole [58]), przeciw pasożytniczą (np. Amfoterycyna B [59]). W przypadku terapii chorób zakaźnych, dużo silniej zaznaczała się aktywność własna dendrymerów. Najlepiej przebadanym i najlepiej poznanym jest działanie przeciwwirusowe dendrymerów, które dzięki odpowiedniej strukturze i wysokiemu ładunkowi zgromadzonemu na powierzchni są w stanie neutralizować wirusy i zapobiegać zakażeniom przez nie wywoływanym [60]. Ta właściwość została wykorzystana w *VivaGel*[®] – jedynym jak dotąd leku na bazie dendrymerów, który obecnie pomyślnie zakończył drugą fazę badań klinicznych, jako miejscowy preparat zapobiegający zakażeniu wirusem HIV.

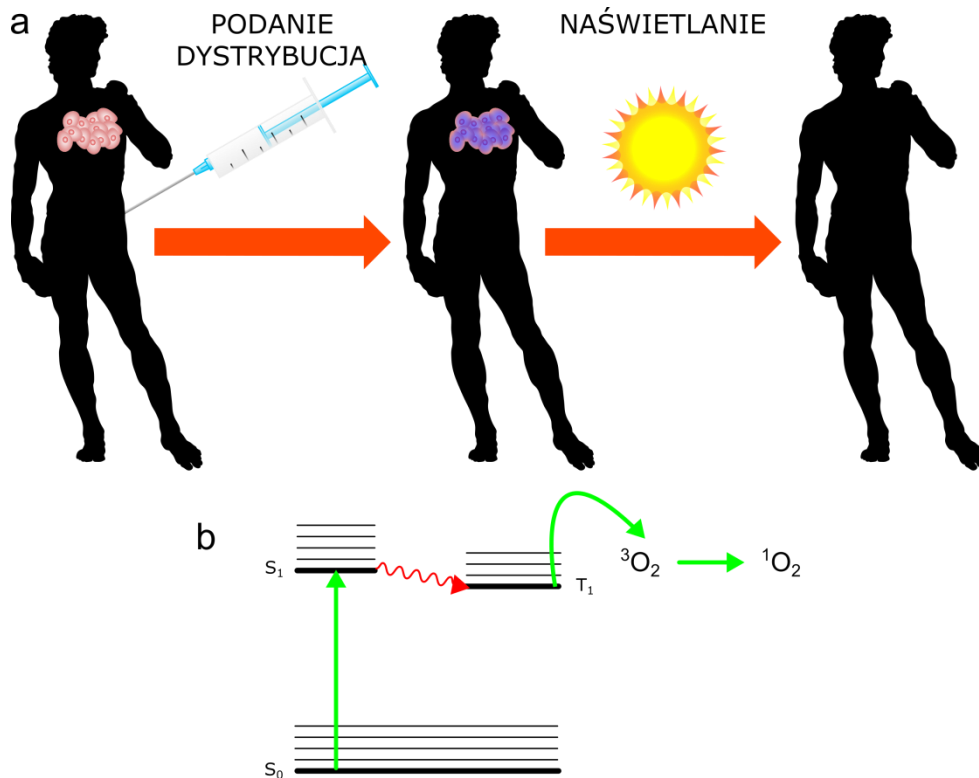
Równie intensywne są prace w zakresie aktywności własnej dendrymerów przeciwko bakteriom [61], a w mniejszym stopniu względem grzybów i pasożytów [62,63]. W dendrymerach, dzięki wielu powtórzeniom fragmentu strukturalnego o określonej aktywności przeciwdrobnoustrojowej, możliwe jest osiągnięcie w badaniach *in vitro* efektu terapeutycznego dorównującego handlowo dostępnym preparatom, a nawet je pod tym względem przewyższającym.

3.3. Terapia fotodynamiczna chorób nowotworowych oraz skierowana przeciw drobnoustrojom

Terapia fotodynamiczna (PDT, ang. *photodynamic therapy*) jest metodą leczenia chorób nowotworowych, która opiera się na działaniu fotosensybilizatora, światła, tlenu singletowego ($^1\text{O}_2$) i wolnych rodników na tkanki, komórki i składniki komórkowe (**Ryc. 20a**) [3]. ROS wykazują silnie utleniające działanie względem związków organicznych (w komórce i poza), niejednokrotnie degradując je i uniemożliwiając ich ponowne wykorzystanie. Niestety, tlen singletowy charakteryzuje się bardzo krótkim czasem życia i niemożliwe jest jego przechowywanie. Z tego też powodu zastosowanie PDT jest możliwe jedynie wtedy, kiedy $^1\text{O}_2$ jest wytwarzany *in situ* wewnątrz organizmu pacjenta.

Tlen singletowy tworzy się w reakcji fotodynamicznej po zadziałaniu trzech czynników: (i) fotouczulacza (Ps, ang. *photosensitizer*) o odpowiednich właściwościach, (ii) światła

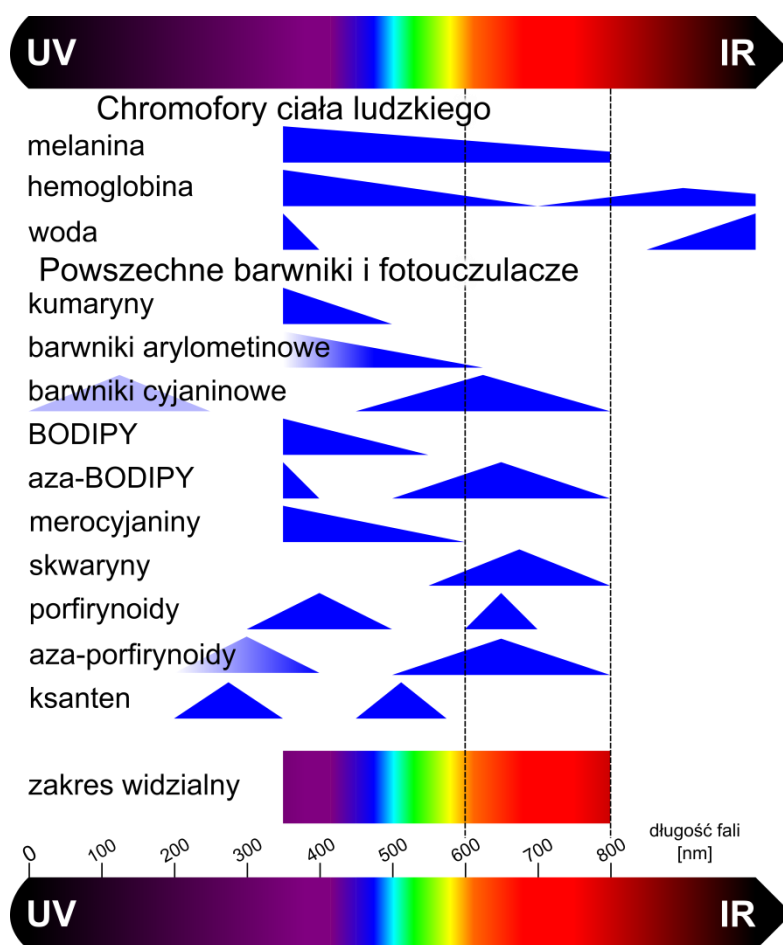
o długości fali zdolnej do wzbudzenia Ps, (iii) tlenu rozpuszczonego w tkankach. W terapii fotodynamicznej, gdy Ps (pierwszy czynnik) jest ordynowany pacjentowi, a następnie ulega dystrybucji, w założeniu, co jest najbardziej pożądane, do komórek nowotworowych. Nawet w najbardziej złośliwych nowotworach, przy bardzo silnej hipoksji, tlen (drugi czynnik) jest obecny w około 1-2% w postaci rozpuszczonej jako tlen trypletowy $^3\text{O}_2$ (tlen w podstawowej formie) [64]. Po naświetleniu (trzeci czynnik) odpowiednią długością fali elektromagnetycznej, następuje wzbudzenie fotouczulacza, który przechodzi na wyższy energetycznie singletowy stan wzbudzony, a niekiedy po przejściu międzysystemowym na stan wzbudzony trypletowy. Energia wzbudzonego Ps może być uwolniona na kilka sposobów, ale najważniejsza dla PDT jest możliwość przeniesienia jej na tlen trypletowy, przez co z kolei $^3\text{O}_2$ przechodzi na wyższy energetycznie stan singletowy – dając w efekcie tlen singletowy ($^1\text{O}_2$) (Ryc. 20b).



Ryc. 20. Schematyczne przedstawienie (a) terapii fotodynamicznej i (b) reakcji fotodynamicznej.

Jak wspomniano wcześniej, energia zaabsorbowana przez Ps może zostać przez niego oddana na kilka sposobów, m.in. na drodze fluorescencji, fosforescencji, drgań (wytwarzania ciepła), dlatego bardzo ważną właściwością Ps badanych w kierunku PDT jest ich zdolność do generowania tlenu singletowego. Poza tym, ważną cechą fotouczulacza jest jego widmo absorpcji światła – maksimum absorpcji powinno znajdować się w zakresie pomiędzy 600

a 800 nm. Jest to związane z tym, że w tym zakresie światło charakteryzuje się największą przenikalnością przez tkanki (**Ryc. 21**). Światło o długości fali poniżej 600 nm jest absorbowane przez naturalnie występujące w organizmie ludzkim chromofory porfiryne – przede wszystkim hem i inne metaloproteiny [3]. Wraz ze wzrostem długości fali światła powyżej 800 nm, następuje wzmożona jego absorpcja przez cząsteczki wody, co również zmniejsza jego przenikalność do tkanek leżących głębiej. Szacuje się, że światło w zakresie 600-800 nm może przenikać nawet do 2 cm w głąb tkanek. Dlatego też ten zakres w PDT określa się często mianem *okna terapeutycznego*.



Ryc. 21. Schematyczna kompilacja absorpcji światła przez różne chromofory. Linia przerywana przedstawia tzw. *okno terapeutyczne* w zakresie 600-800 nm.

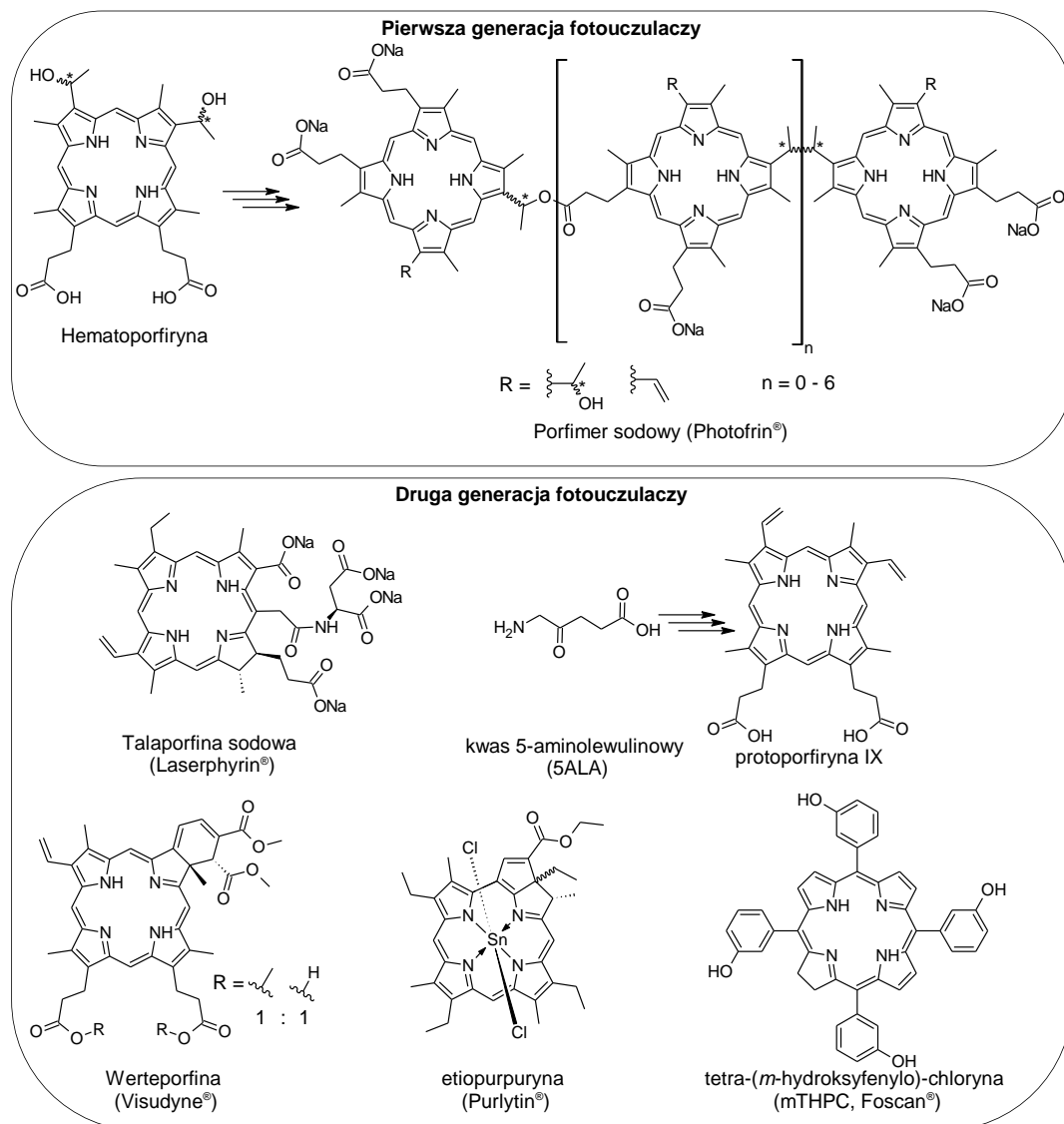
Czynnikiem odpowiedzialnym za powodzenie PDT, który można najłatwiej modyfikować, jest fotosensybilizator. Dlatego też tak wiele uwagi poświęca się syntezie fotosensybilizatorów celem późniejszego wykorzystania w terapii fotodynamicznej. Mimo znacznych wysiłków nie zdołano jak na razie zsyntezować idealnego fotosensybilizatora, którego najbardziej pożądanymi właściwościami są [65]: (i) czystość chemiczna, dobrze zdefiniowana struktura, łatwa do przeprowadzenia synteza; (ii) wysoka

wydajność kwantowa generowania tlenu singletowego (najlepiej powyżej 0,50); (iii) absorpcja światła w oknie terapeutycznym (preferencyjnie posiadania w tym zakresie maksimum absorpcji); (iv) kumulacja w miejscu docelowym (komórkach nowotworowych); (v) niewykazywanie toksyczności bez naświetlania, dotyczy również metabolitów; (vi) trwałość podczas przechowywania, a także w organizmie przed naświetlaniem; (vii) pożądany charakter hydrofilowo-lipofilowy, przekładający się na drogę podania i wydalanie z organizmu po zakończonej terapii.

Na podstawie tak sformułowanych właściwości idealnego fotouczulacza, obecnie wyróżnia się dwie generacje fotouczulaczy w PDT [66]. Podział ten jest w znacznym stopniu umowny, podobnie jak również ewentualne wyróżnianie leków trzeciej generacji. Do generacji pierwszej zalicza się fotouczulacze, pochodne hematoporfiryny, jak stosowany obecnie w lecznictwie *Photofrin*[®], który nie ma sprecyzowanej struktury (**Ryc. 22**), ale jest mieszaniną pochodnych hematoporfiryny otrzymanych w procesie technologicznym przez kolejno następujące po sobie procesy acetylowania i hydrolizy [65]. *Photofrin*[®], Ps pierwszej generacji, wykazuje słabą absorpcję światła w zakresie okna terapeutycznego, dlatego może być stosowany do terapii sięgającej w głąb tkanki nie więcej niż na 3 mm. Silnie zaznaczona jest też jego niska specyficzność względem komórek nowotworowych skutkująca fotouczulającym działaniem na skórę pacjenta utrzymującym się do 10 tygodni po terapii. Wady te jednak nie powstrzymały przed wprowadzeniem tego leku do leczenia nowotworów m.in. pęcherza moczowego, raka szyjki macicy i nowotworów głowy i szyi, a to przede wszystkim ze względu na niewiele działań niepożądanych (poza wspomnianym działaniem fotouczulającym) oraz wysoką wydajność generowania tlenu singletowego (0,89), co zapewnia w konsekwencji skuteczność i bezpieczeństwo stosowania.

Druga generacja fotosensybilizatorów jest zdecydowanie liczniejsza. Nie ogranicza się jedynie do pochodnych porfiryny, ale obejmuje również inne grupy chemiczne [65]. Wybrane leki drugiej generacji przedstawiono na **Ryc. 22**. Ogólną cechą drugiej generacji fotosensybilizatorów i tym, co je odróżnia od generacji pierwszej, jest ściśle zdefiniowana struktura chemiczna, zwiększona selektywność względem komórek nowotworowych i lepsze właściwości spektralne. Bardzo ciekawym podejściem w tej kwestii jest stosowanie 5-ALA (kwas 5-aminolewulinowy), który jest związkiem naturalnie występującym w organizmie ludzkim. Fizjologicznie związek ten jest prometabolitem, który przekształcany jest do protoporfiryny IX, a dalej do hemu i w przypadku dostarczenia go do komórek nowotworowych powoduje powstanie nadmiernych ilości protoporfiryny IX, która w przypadku niedoboru jonów żelaza w środowisku komórkowym nie może ulec

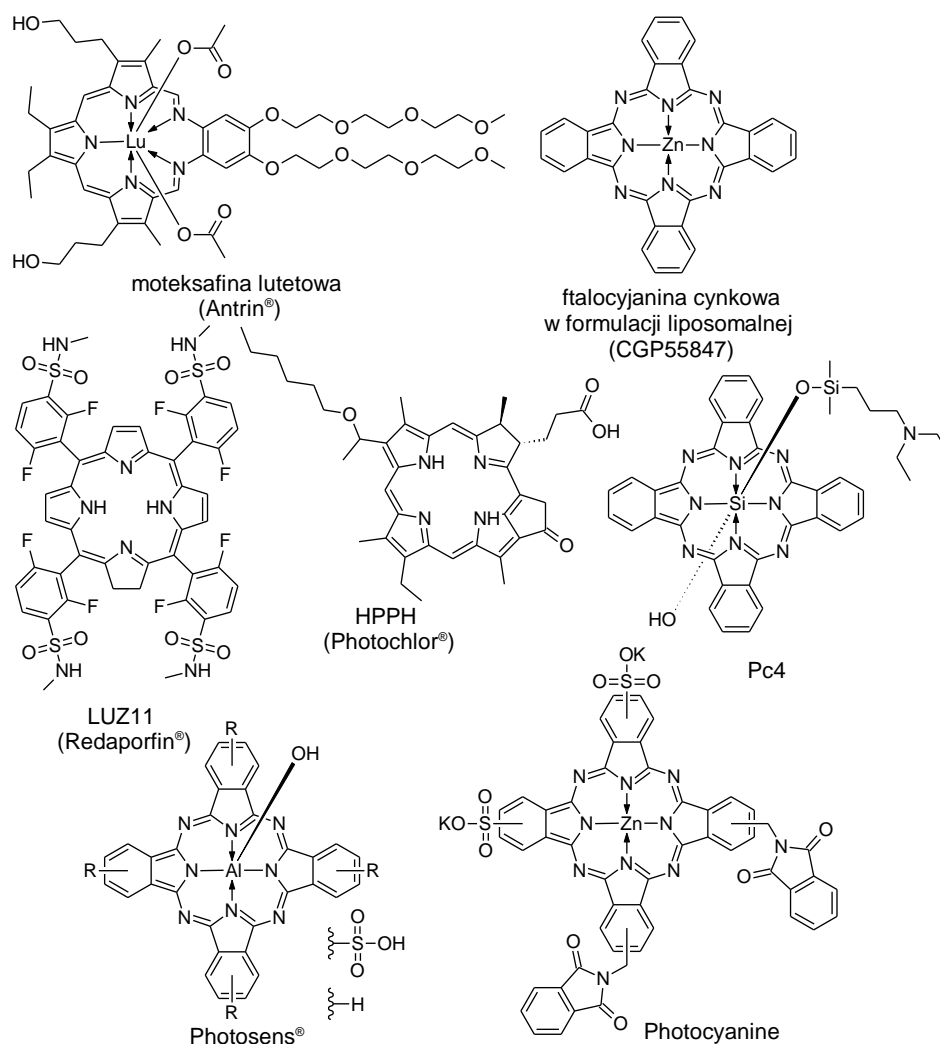
dalszym przemianom. Protoporfiryna IX może być z kolei wykorzystana do prowadzenia terapii fotodynamicznej. Dodatkowo wykazuje silną fluorescencję, co umożliwia wykorzystanie 5-ALA do diagnostyki. Fakt, że oba te związki występują również naturalnie w organizmie ludzkim sprawia, że ich stosowanie nie jest obarczone tak silnymi działaniami niepożądanymi. Z drugiej strony, niestety, protoporfiryna IX charakteryzuje się mało korzystnymi właściwościami spektralnymi, co ogranicza jej wykorzystanie w PDT.



Obserwując, jakie kluczowe znaczenie mają właściwości farmakodynamiczne fotosensybilizatorów, nie można nie zauważyć, jak wiele fotosensybilizatorów „utknęło” w trakcie prób klinicznych [67]. Wiele jest związków chemicznych, które literaturowo charakteryzują się bardzo dobrymi właściwościami predysponującymi je do stania się fotosensybilizatorami w PDT [68,69]. Niestety, po pierwszej lub drugiej fazie badań

klinicznych dalsze studia kliniczne są zarzucane. Kilka takich związków przedstawiono na **Ryc. 23**.

Obecnie prowadzone badania dotyczą także opracowania fotosensybilizatorów trzeciej generacji. Postuluje się, że Ps trzeciej generacji muszą charakteryzować się wysoką specyficnością (najlepiej dla potrzeb terapii celowanej), prostym i szybkim metabolizmem ułatwiającym ich wydalanie, odpowiednimi właściwościami spektralnymi i rozpuszczalnością w wodzie [66,70].



Ryc. 23. Wybrane fotouczulacze będące w trakcie badań klinicznych.

PDT, tak jak każda terapia, ma swoje blaski i cienie. Mimo że komórki nowotworowe nie są w stanie wykształcić bardziej skutecznych mechanizmów obronnych na tlen singletowy, terapia fotodynamiczna może nie wykazać swojej skuteczności i aplikacyjności. Związane jest to, poza niedoskonałościami obecnie stosowanych fotosensybilizatorów, przede wszystkim z innymi niespecyficznymi właściwościami komórek nowotworowych, do których zaliczyć możemy efekty detoksykacyjne pomp efluksowych, niską zawartość tlenu

w komórkach, czy też ograniczony dostęp światła do komórek w przypadku czerniaka (melanoma). Szerokie spektrum mechanizmów wpływających na skuteczność PDT omówiono już w piśmiennictwie [71].

Ze względu na silne działanie tlenu singletowego na komórki, zaproponowano również ukierunkowanie terapii fotodynamicznej na drobnoustroje – taką terapię określa się jako PACT (*photodynamic antimicrobial chemotherapy* – ang. fotodynamiczna chemioterapia przeciwdrobnoustrojowa). Mechanizm działania fototoksycznego PACT jest identyczny, jak w przypadku PDT, a sama metoda znalazła zastosowanie do leczenia powierzchniowych zakażeń w dermatologii [72]. Wykazano, że PACT jest skuteczną metodą działającą na bakterie, grzyby, wirusy oraz pierwotniaki. Atutem PACT jest brak możliwości wykształcenia mechanizmu oporności na czynnik fizyczny, jakim jest tlen singletowy, przez drobnoustroje.

3.3.1. Aza-porfirynoidy w terapii przeciwnowotworowej

Ze względu na silną absorpcję światła i umiejscowienie maksimów absorpcji, aza-porfirynoidy od dawna interesowały badaczy zajmujących się tematem PDT. Znaczącą wadą tej grupy związków jest ich słaba rozpuszczalność w wodzie, zwłaszcza niepodstawionych Pz i Pc, silna lipofilowość pierścieni makrocyklicznych, a także podatność na agregację podstawionych pochodnych pod wpływem wody [73]. Głównymi kierunkami badawczymi w obszarze porfirazyn i ftalocyjanin stały się modyfikacje części peryferyjnej makrocykli celem poprawy ich rozpuszczalności w wodzie i zahamowania agregacji oraz sporządzenia odpowiednich formułacji dla już istniejących związków. Znaczna część badań opiera się na wykorzystaniu jako nośników różnych typów nanocząstek, między innymi nanocząstek polimerowych [74,75], micelarnych [76], czy też liposomalnych [77]. W każdym przypadku, zastosowanie odpowiedniego nośnika pozwala na uzyskanie lepszego efektu terapeutycznego niż w przypadku zastosowania samego związku. Powodem tego jest przede wszystkim poprawa (lub eliminacja problemu) rozpuszczalności porfirynoidu w wodzie, a dodatkowo lepsza dystrybucja fotouczulacza *in vivo*, dzięki dłuższemu czasowi dystrybucji i większej specyficzności względem komórek nowotworowych.

Do nowych pochodnych aza-porfirynoidów możemy zaliczyć między innymi pochodne A₃B, które opracowali i przebadali Kandela i wsp. [78]. Pochodna porfirazyna została wybrana specjalnie do eksperymentów ze względu na niskie generowanie tlenu singletowego (<0,01) i działanie cytostatyczne *per se*. Po przebadaniu związku *in vitro* na komórkach linii komórkowej MDA-MB-231 (rak sutka) i po potwierdzeniu aktywności, rozszerzono badania

o eksperymenty na myszach z przeszczepionymi nowotworami tej samej linii komórkowej uzyskując wyniki przeżywalności zbliżone do doksorubicyny.

Jeszcze innym podejściem była taka modyfikacja Pz, aby mogła ona pełnić funkcję systemu terapeutycznego – działać zarówno w zakresie PDT, jak i wykazywać właściwości użyteczne w diagnostyce. Takie badania przeprowadzili Yuzhakova i wsp., którzy zsyntezowali nową tetrapodstawioną porfirazynę kompleksującą w centrum koordynacyjnym jon Gd^{3+} [79]. Otrzymany makrocykl charakteryzuje się bardzo szeroką potencjalną użytecznością, z uwagi na trzy zastosowania, obejmujące: (i) terapię fotodynamiczną, wpływając po naświetleniu w warunkach *in vitro* na spadek przeżywalności komórek linii komórkowej CT26 (mysi nowotwór okrężnicy); (ii) diagnostykę, opierającą się na fluorescencji wykazywanej przez porfirazynę i (iii) diagnostykę kontrastową, jako środek kontrastowy w rezonansie magnetycznym dzięki obecności jonu gadolinu w cząsteczce.

3.3.2. Wykorzystanie dendrymerów w terapii fotodynamicznej

Badania dotyczące użyteczności dendrymerów w terapii fotodynamicznej nie ograniczają się jedynie do wykorzystania ich zdolności do solubilizowania fotouczulaczy lub przenoszenia w postaci dendripleksów. Alternatywnym podejściem jest możliwość kowalencyjnego połączenia sfunkcjonalizowanych dendrymerów z cząsteczką Ps. Poniżej zebrano kilka nowszych, interesujących badań z zakresu tej tematyki, natomiast szeroko ten temat został opisany w przeglądzie autorstwa Klajnert i wsp. [80].

Setaro i wsp. zsyntezowali serię ftalocyjanin podstawionych ugrupowaniami dendrymerycznymi generacji G0 – G2, celem oceny możliwości ich ewentualnego wykorzystania w PDT [50]. Z wyników badań wynika, że wraz ze wzrostem generacji dendrymeru następuje wzrost wydajności kwantowej generowania tlenu singletowego, co autorzy przypisali zawadzie przestrzennej podstawników i poprzez to zmniejszeniu agregacji makrocykla. Dodatkowo, dzięki funkcjonalizacji grup końcowych dendronów, możliwe okazało się uzyskanie makrocykla rozpuszczalnego w wodzie.

Ideę wspomnianego już wcześniej dendrymeru przenoszącego 5-ALA [51] podjęli Zhou i wsp., którzy dodatkowo udoskonalili ten pomysł przez dodanie chelatora żelaza do struktury makrocykla [81]. Związek kompleksujący jony żelaza, jak i cząsteczki 5-ALA, zostały wbudowane jako grupy terminalne dendrymeru. Dzięki tak zaprojektowanej cząsteczce, możliwe było osiągnięcie kilku celów jednocześnie, w szczególności zwiększenia stężenia 5-ALA w miejscu docelowym, zmniejszenia zawartości żelaza w komórce, co hamuje dalsze przemiany protoporfiryny IX i umożliwia bardziej wydajną terapię przy tej samej ilości

5-ALA w komórce. Celem potwierdzenia tych teoretycznych założeń w praktyce, autorzy przebadali serię zmodyfikowanych dwufunkcyjnych dendrymerów i porównali je z wynikami uzyskanymi dla samego 5-ALA, jako obiekt badań wybierając dwie linie komórkowe: KB (nowotwór szyjki macicy) i MCF-7 (gruczolakorak sutka). Dzięki tym badaniom okazało się możliwe uwidocznienie wyższego stężenia protoporfiryny IX w komórkach, na które zadziało dendrymerem, w porównaniu do tych, na których użyto samego 5-ALA.

Celem zwiększenia rozpuszczalności fotouczulacza, Narsireddy i wsp. zmodyfikowali handlowo dostępne dendrymery PAMAM [82]. Do grup końcowych dendrymeru podłączono sfunkcjonalizowane pochodne porfiryn oraz cząstki celujące – specyficzne białka pozyskane z *E. coli*. Zakładano, że tak skonstruowany system pozwoli na uzyskanie wyższych stężeń fotouczulacza w miejscu docelowym. Jako model badawczy wybrano najpierw w badaniach *in vitro* linię komórkową SK-OV-3 (nowotwór jajnika), a wyniki porównano z otrzymanymi dla linii komórkowej pozbawionej odpowiednich receptorów (MCF-7). Eksperyment pozwolił na uzyskanie informacji, że cząstki celujące rzeczywiście osiągają odpowiednie stężenie badanych cząsteczek w komórkach nowotworowych. Kolejny eksperyment obejmował badania *in vivo* na myszach z przeszczepionymi guzami SK-OV-3. Dla modelu zwierzęcego zaobserwowano większą regresję guza prowadząc PDT z wykorzystaniem nowego dendrymeru, niż w przypadku stosowania samej pochodnej porfiryny.

Hutnick i wsp. skupili się na PACT z wykorzystaniem dendrymerów jako nośnika i znanego fotouczulacza – Pc4 (**Ryc. 23**) [83]. Pc4 jest skutecznym fotouczulaczem, jednak jest słabo rozpuszczalny w wodzie, przez co musi być stosowany w odpowiedniej formulacji. Handlowo dostępny PAMAM został poddany częściowemu PEGyłowaniu, co zmniejszyło jego toksyczność a zwiększyło możliwości tworzenia dendripleksu z Pc4. Na podstawie wyników badań, uzyskano efekt fotodynamiczny przeciw strzępkom i blastosporom *C. albicans*, porównywalny z samą Pc4, a dzięki zastosowanemu nośnikowi, znaczącą poprawą rozpuszczalności w wodzie. Warto podkreślić, że formulacja dendrymeryczna działała jako promotor wchłaniania, umożliwiając przenikanie Pc4 przez skórę do głębszych tkanek.

3.4. Podsumowanie

Dotychczas prowadzone badania porfiryroidów wskazują, że makrocykle typu A₃B, w tym tribenzoporfirazy, wykazują największe możliwości modyfikacji właściwości fizykochemicznych. Właściwości te (takie jak hydro- i lipofilowość, widmo absorpcji UV-Vis, generowanie tlenu singletowego) mają kluczowe znaczenie dla aktywności

biologicznej porfirynoidów względem nowotworów i patogenów. Również ocena aktualnego stanu piśmiennictwa na temat PDT uwidacznia jak ważne jest zachowanie optymalnych właściwości farmakodynamicznych dla rozwoju tej metody terapii, co jest nierozdzielnie związane z właściwościami fizykochemicznymi fotouczulaczy.

Dendrymery oferują szeroki zakres modyfikacji struktury, w tym rdzenia, dendronów i grup końcowych. Dzięki temu możliwe jest uzyskanie optymalnych właściwości pożądaných dla danego zastosowania. Nie bez znaczenia dla celów tej pracy jest również możliwość uzyskiwania połączeń dendrymerów z fotosensybilizatorami, a nawet synteza dendrymerów z fotouczulaczami w strukturze.

Zgromadzone w części teoretycznej dane literaturowe, w tym na temat PDT, niezbyt dobrze przebadany obszar tribenzoporfirazyń oraz wschodzący temat dendrymerów w obszarze chemii medycznej, wraz z perspektywami dla nauk farmaceutycznych, stały się bodźcem do podjęcia badań w ramach pracy doktorskiej. Połączenia tribenzoporfirazyń z dendrymerami i możliwości ich potencjalnego wykorzystania w terapii fotodynamicznej wydają się stwarzać perspektywy dla rozwoju terapii fotodynamicznej w leczeniu chorób nowotworowych i skierowanej przeciw mikroorganizmom.

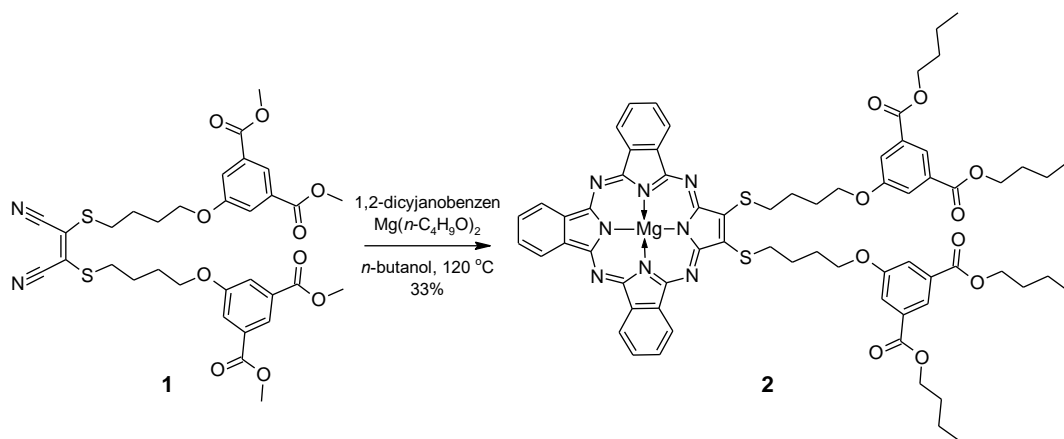
4. Wyniki i dyskusja

Celem większej klarowności opisu wyników, w części eksperymentalnej w funkcji separatora dziesiętgo zastosowano kropkę zamiast przecinka.

4.1. Tribenzoporfirazy z grupami sulfanylowymi – synteza i charakterystyka fizykochemiczna

4.1.1. Ocena reaktywności pochodnych dimerkaptomaleonitryla w warunkach reakcji makrocyklizacji

Prace eksperymentalne rozpoczęto od syntezy tribenzoporfirazy posiadającej w peryferium ugrupowania 3,5-alkoksykarbonylofenoksybutylosulfanylowe **2**, która jest związkiem typu A₃B, a zarazem pochodną wcześniej uzyskanej porfirazy symetrycznej typu A₄ otrzymanej przez Lijewskiego i wsp. [84]. Schemat reakcji przedstawiono na **Schemacie 6**. Wyjściowa pochodna maleonitryla **1** została zsyntezowana na podstawie procedury [84].



Schemat 6. Synteza tribenzoporfirazy **2**.

W procedurze syntetycznej prowadzącej do **2** zastosowano warunki reakcji makrocyklizacji Linstead'a, a mianowicie *n*-butanolan magnezu we wrzącym *n*-butanolu przez 20 godzin (**Schemat 6**). Podczas reakcji powstały znaczne ilości ftalocyjaniny magnezu(II) (MgPc) oraz pożądaný produkt **2**, który został wyizolowany z mieszaniny poreakcyjnej przy użyciu technik chromatograficznych z dobrą wydajnością 33%. Budowa chemiczna tribenzoporfirazy **2** została potwierdzona z wykorzystaniem technik spektrofotometrii UV-Vis (z zakresu światła ultrafioletowego-widzialnego – ang. *ultraviolet-visible*), MS (spektrometria mas – ang. *mass spectrometry*), NMR (jądrowy rezonans magnetyczny – ang. *nuclear magnetic resonance*).

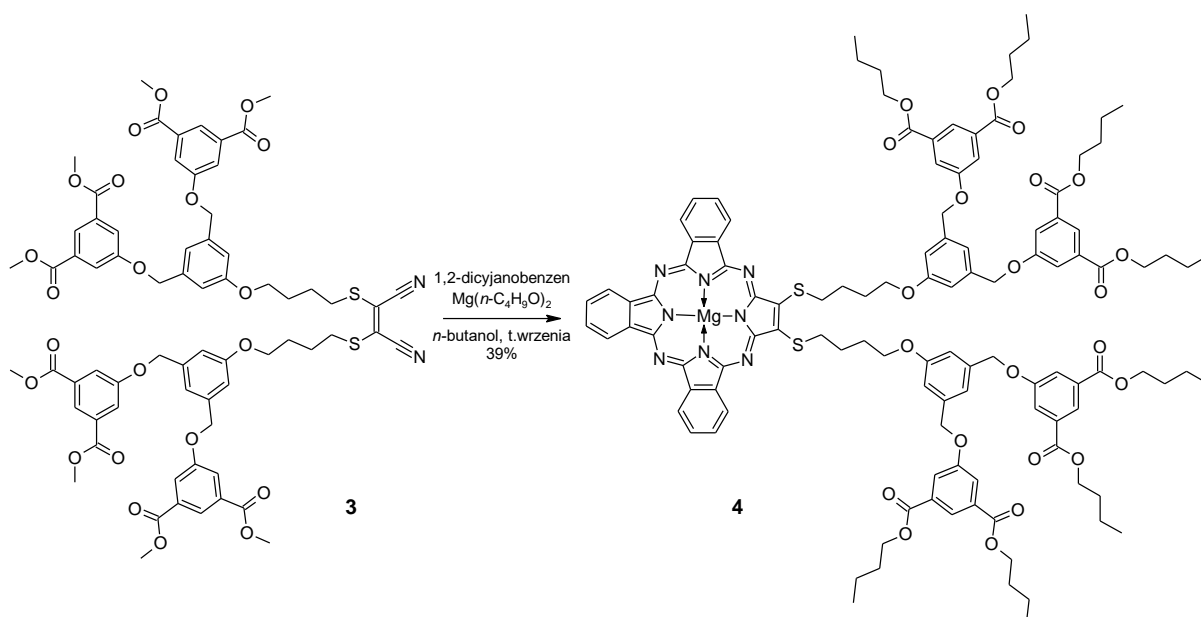
Stwierdzono, że przebieg widma absorpcji w zakresie UV-Vis związku **2** jest charakterystyczny dla tribenzoporfirazyn. W przebiegu widma występują dwa maksima

absorpcji w obrębie pasma Q (przy 721 i 626 nm) i pojedyncze maksimum w obrębie pasma B przy 357 nm. W widmie MS ESI (jonizacja przez elektrorozpylanie – ang. *electrospray ionization*) znaleziono sygnał m/z jonu protonowanego związku 1247.45862 (wartość obliczona teoretycznie dla $[M+H]^+$ 1247.45795).

W widmie ^1H - ^1H COSY tribenzoporfirazy **2** odnotowano pojawienie się sygnałów alifatycznych grup metylenowych (dwie grupy sprzężonych wicynalnych wodorów grup metylenowych w obrębie grupy butylowej i butylenowej, odpowiednio przy 3.85, 1.35, 1.16, 0.74 ppm i 4.32, 3.75 1.97 ppm). Eksperymenty ^1H - ^{13}C HMBC i ^1H - ^{13}C HSQC przeprowadzono celem jednoznacznego przypisania sygnałów jąder wodoru (protonów) w zakresie alifatycznym i aromatycznym z widm ^1H NMR i sygnałów jąder węglowych z widm ^{13}C NMR, a związanych z ugrupowaniami izoftaloksyalkilosulfanylowymi znajdującym się na peryferium cząsteczki. Widma dwuwymiarowe pozwoliły ustalić, że sygnały przy 4.32 i 3.75 ppm pochodzą od odpowiednio atomów wodoru $-\text{OCH}_2$ i $-\text{SCH}_2$ z łańcucha alifatycznego znajdującego się pomiędzy pierścieniem fenyłowym, a pierścieniem makrocyklicznym. Grupa sygnałów pochodzących od 12 atomów wodoru przyłączonych bezpośrednio do pierścienia makrocyklicznego pojawiła się w rejonie 9.29-8.10 ppm. Ze względu na brak sprzężeń dalekiego zasięgu w widmie ^1H - ^{13}C HMBC nie przypisano tych sygnałów do konkretnych fragmentów układu tribenzoporfirazy. Trudności z przypisaniem sygnałów w tribenzoporfirazach zostały podjęte w piśmiennictwie [41].

W reakcji **1** i dziesięciokrotnego nadmiaru molowego 1,2-dicyjanobenzenu we wrzącym *n*-pentanolu z dodatkiem octanu cynku(II) i 1,8-diazabicyklo[5.4.0]undec-7-enu jako zasady nie zaobserwowano powstania pochodnej tribenzoporfirazy, natomiast w dużych ilościach uzyskano produkt uboczny, którym jest niepodstawiona ftalocyjanina cynku(II). Wyniki eksperymentu MS wskazywały jedynie na obecność dużych ilości ftalimidu we wstępnie oczyszczonej mieszaninie poreakcyjnej, co mogło wskazywać na nietrwałość i rozpad powstałego produktu lub niezachodzenie do końca reakcji makrocyklizacji.

W kolejnym podejściu syntetycznym jako substrat zastosowano pochodną dimerkaptomaleonitryla **3** podstawioną dendrymerem G1, otrzymaną przez dr. Sebastiana Lijewskiego [85]. Związek ten poddano reakcji tetrameryzacji w warunkach wrzącego *n*-butanolu w obecności nadmiaru 1,2-dicyjanobenzenu i *n*-butanolanu magnezu w ciągu 20 godzin (**Schemat 7**).



Schemat 7. Synteza tribenzoporfirazyny **4**.

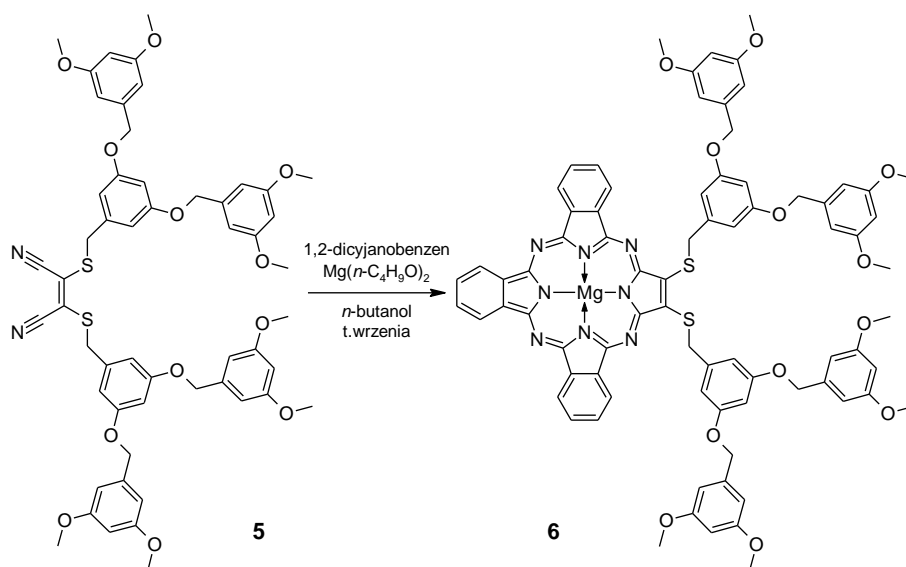
Po zakończeniu reakcji, wyizolowano chromatograficznie związek **4**. Warto podkreślić, że uzyskana wydajność reakcji makrocyklizacji (39%) okazała się najwyższą wydajnością spośród wszystkich reakcji makrocyklizacji prowadzących do sulfanylowych tribenzoporfirazyn przeprowadzonych w ramach pracy doktorskiej.

Związek **4** poddano charakterystyce fizykochemicznej obejmującej spektrofotometrię UV-Vis i eksperymenty MS oraz NMR. Przebieg widma absorpcji UV-Vis **4** charakteryzuje się obecnością czterech maksimów, dwóch w obrębie pasma Q (694 i 651 nm) oraz dwóch w obrębie pasma B (przy 359 i 316 nm). Eksperymenty MS pozwoliły na potwierdzenie masy utworzonego makrocykla. Stwierdzono pojawienie się sygnałów m/z odpowiadających wartościom obliczonym. W widmie MALDI zaobserwowano sygnał m/z 2071.871 odpowiadający wartości obliczonej dla $[M+H]^+$ – 2071.835, a w widmie ESI sygnał m/z 2070.84590 odpowiadający wartości obliczonej dla $[M]^+$ – 2070.82786.

W widmach ^1H NMR oraz ^{13}C NMR **4** stwierdzono pojawienie się sygnałów odpowiadających odpowiednio 126 atomom wodoru (występującym jako 10 grup sygnałów) oraz 116 jądrom węglowym (widocznym jako 35 niezależnych sygnałów). Sygnały w zakresach 0.86-0.75 i 4.36-4.23 ppm korespondują odpowiednio z grupami CH_3 i OCH_2 estru butylowego. Sygnały pochodzące od grup $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$, zarówno linkera butylenowego, jak i estru butylowego, nie były rozróżnialne ze względu na małą ilość sprzężeń w widmach dwuwymiarowych. Ponadto, z powodu małej ilości sprzężeń obserwowanych w widmach dwuwymiarowych ^1H - ^1H COSY i ^1H - ^{13}C HMBC, nie zdołano rozróżnić sygnałów protonów pochodzących od pierścieni aromatycznych G0 i G1 w części

peryferyjnej dendrymeru. Sygnały protonów występujące w zakresach 8.61-8.47, 8.12 i 7.84 ppm zostały przypisane do wodorów pierścieni aromatycznych w podstawnikach peryferyjnych.

Następnie podjęto syntezę tribenzoporfirazy z ugrupowaniem dendrymerycznym G1 typu Fréchet **6**, stosując w reakcji tetrameryzacji pochodną maleonitrylową podstawioną ugrupowaniami 3,5-bis(3,5-dimetoksybenzyloksy)benzylosulfanyłowymi **5**, uzyskaną w badaniach mgr. Michała Falkowskiego [85]. Związek **5** poddano reakcji makrocyklizacji z nadmiarem *o*-ftalonitryla w obecności *n*-butanolanu magnezu we wrzącym *n*-butanolu podczas 20 godzin (**Schemat 8**).

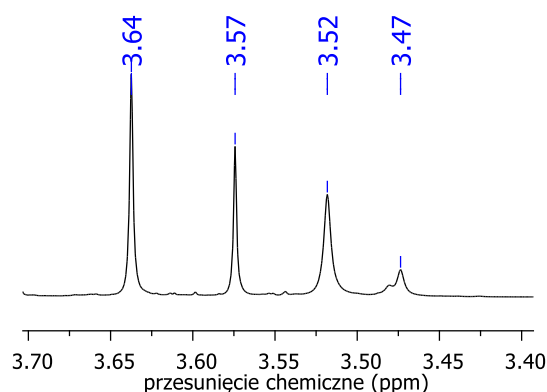


Schemat 8. Synteza tribenzoporfirazy **6**.

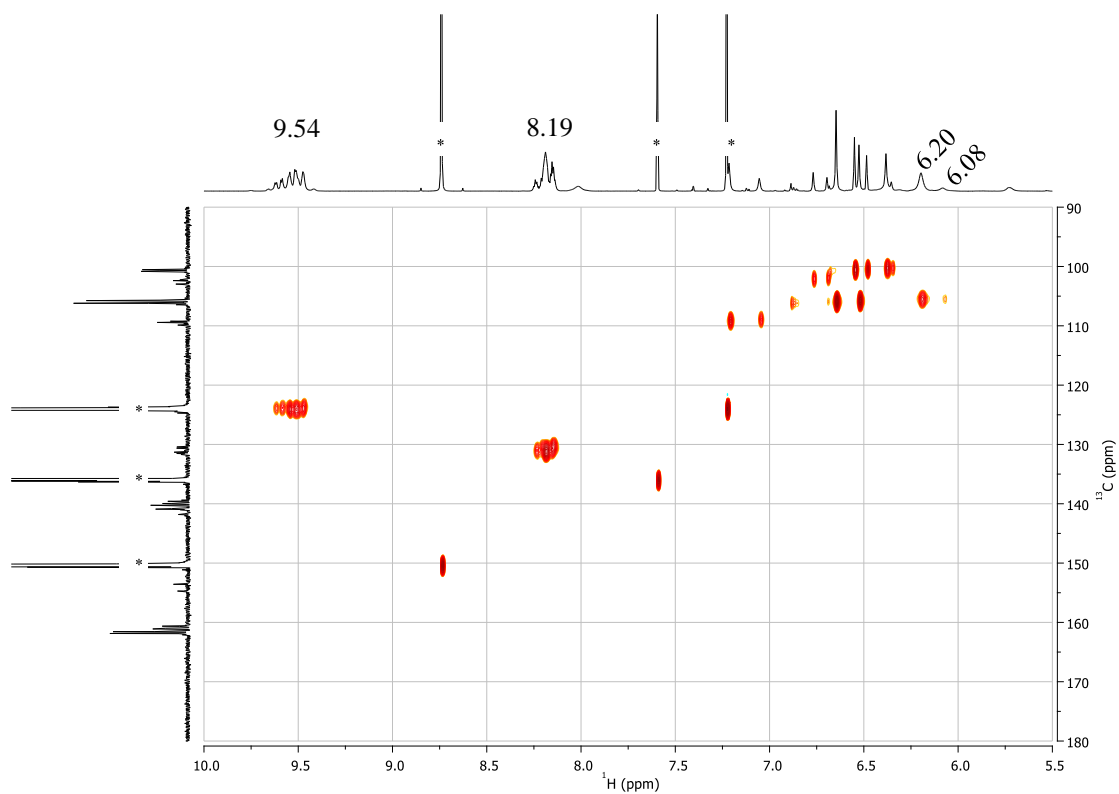
Podczas prób izolacji tego makrocykla napotkano na trudności preparatywne. Mieszanina reakcyjna – poza **6** i MgPc – zawierała również trzeci związek makrocykliczny, którego jednak nie zdołano wyizolować w ilości pozwalającej na pełną identyfikację. Celem wydzielenia związku **6** z mieszaniny poreakcyjnej, konieczne okazało się zastosowanie procedur chromatograficznych z wykorzystaniem żelu krzemionkowego, żelu krzemionkowego modyfikowanego grupami oktadecylowymi (odwrócona faza C₁₈), Al₂O₃, a także kilkakrotnie powtórnego preparatywnego TLC. Konieczność wielokrotnego powtórzenia rozdziałów przy użyciu chromatografii kolumnowej złożyła się na ostateczną niską 7% wydajność tej reakcji (każda dodatkowa chromatografia kolumnowa wiąże się z pewnymi stratami związku rozdzielanego).

Charakterystyka związku **6** z użyciem NMR wymagała również rozwiązania wielu problemów. Widmo ¹H NMR zarejestrowane dla **6** wskazało na agregację tribenzoporfirazy, pomimo zastosowanego rozpuszczalnika (pirydyna-*d*₅), który posiada

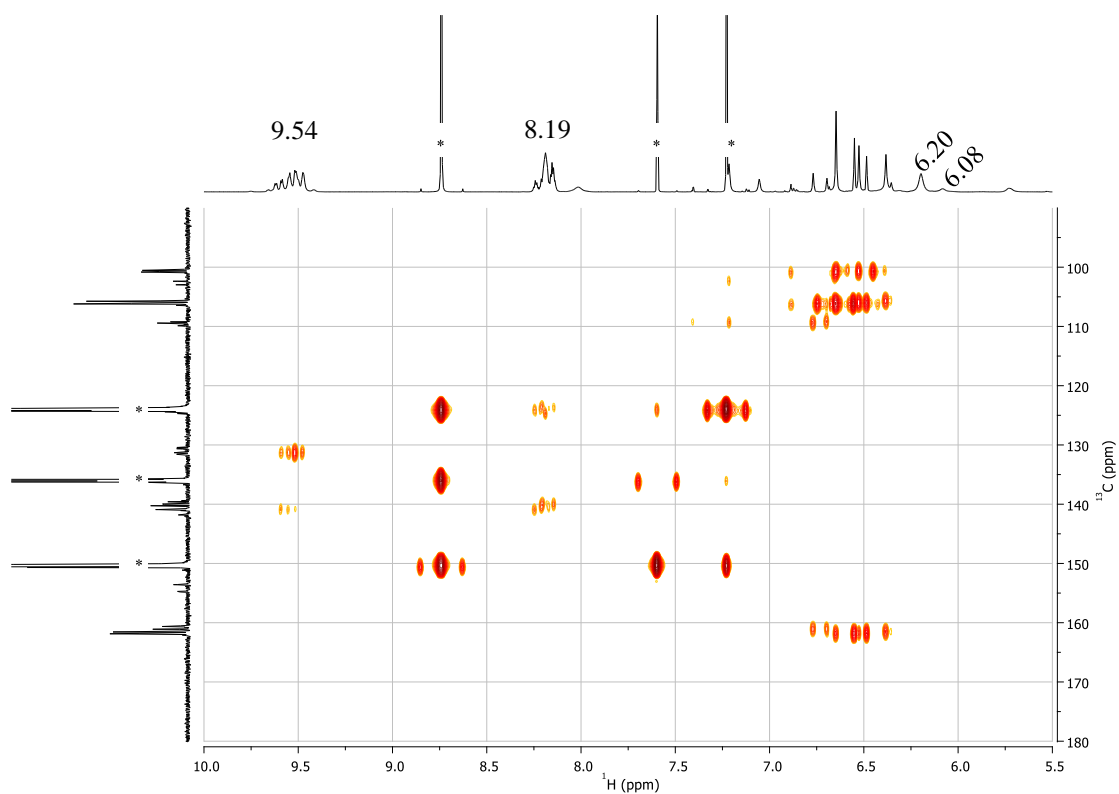
właściwości zmniejszające agregację lub jej zapobiegającym [86]. Zjawisko agregacji spowodowało, że w widmie pojawiła się większa liczba sygnałów obok sygnałów właściwych pożądanemu makrocyklowi. Jako diagnostyczną dla agregacji można przyjąć analizę sygnałów przy 3.64, 3.57, 3.52 oraz 3.47 ppm, które zostały przypisane terminalnym grupom metoksyłowym i – teoretycznie – powinny występować w postaci pojedynczego singletu (**Ryc. 24**). Sygnały odpowiadające atomom wodoru alifatycznych grup metylenowych w obrębie grup benzyłowych również nie pojawiły się jako singlety, ale jako grupy blisko siebie położonych sygnałów. Zaobserwowano także sygnały od grupy SCH₂ przy 3.73 ppm oraz dwa multiplety od grupy OCH₂ przy 4.86 i 4.72 ppm. W widmie ¹H-NMR związku **6** sygnały w niższym polu spektrum odpowiadają grupie singletów pochodzących od atomów wodoru w pozycjach C2(C6) i C4 przy 6.77, 6.70, 6.65, 6.55, 6.53, 6.49, 6.38, 6.35, 6.20 oraz 6.08 ppm. Na podstawie analizy widm z eksperymentów 2D NMR (**Ryc. 25** i **Ryc. 26**) można wywnioskować, że sygnały przy 6.20 i 6.08 ppm pochodzą od pierścieni aromatycznych najbliższych układowi makrocyklicznemu, a znajdujących się w podstawnikach generacji G0. Jak już wcześniej wspomniano, atomy wodoru części tribenzo samego makrocykla często są nierozróżnialne. W przypadku związku **6**, sygnały odpowiadające atomom wodorów fragmentu tribenzo przy 9.54 i 8.19 ppm pojawiły się jako szerokie multiplety. Zjawisko agregacji związku **6** obserwowano również podczas analizy HPLC. Na chromatogramie tribenzoporfirazyny odnotowano kilka pików przy różnych wartościach czasów retencji R_f, ale o identycznych widmach absorpcji UV-Vis, co jest dowodem potwierdzającym zjawisko agregacji.



Ryc. 24. Fragment widma ¹H NMR tribenzoporfirazyny **6**.

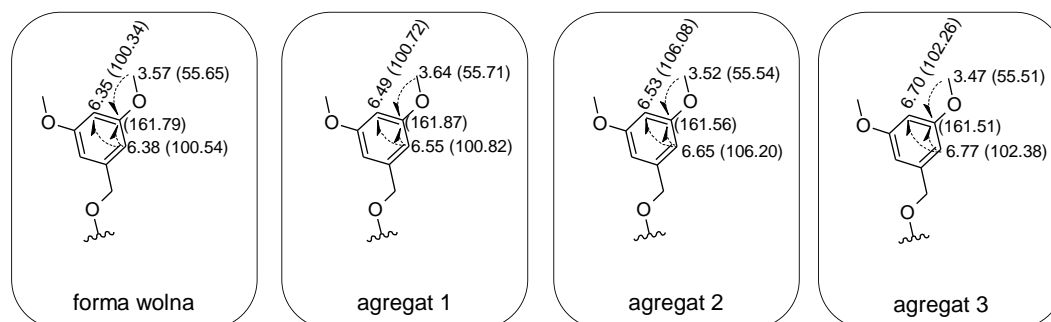


Ryc. 25. Fragment widma ^1H - ^{13}C HSQC tribenzoporfirazy **6**. Symbol * wskazuje na obecność sygnału reszkowego pirydyny- d_5 .



Ryc. 26. Fragment widma ^1H - ^{13}C HMBC tribenzoporfirazy **6**. Symbol * wskazuje na obecność sygnału reszkowego pirydyny- d_5 .

Analiza widma ^{13}C NMR potwierdziła także silną agregację związku **6** (Ryc. 27). Wszystkie sygnały pochodzące od jąder węgla znajdujących się cząsteczce występują w ilości czterokrotnie większej niż można oczekiwać dla cząsteczki związku. Zaobserwowano cztery sygnały przy 55.71, 55.65, 55.54 i 55.51 ppm, które odpowiadają węglom grup metoksylowych. Szeroki sygnał o niskiej intensywności przy 55.83 ppm został przypisany węglowi wchodzącemu w skład grupy SCH_2 . Sygnały przy 70.60, 70.49, 70.15 i 70.06 ppm przypisano grupie OCH_2 . Z kolei sygnały w zakresie 110-100 ppm pochodzą od jąder węgla grup benzyloksylowych dendrymeru. Ze względu na bardzo bliskie sąsiedztwo sygnałów jąder węgla w zakresie 141.81-139.59 ppm, niemożliwe okazało się rozróżnienie atomów węgla pierścienia makrocyklicznego i czwartorzędowych węgli C1 w dendrymerze. We wspomnianym zakresie w widmie ^{13}C występuje dwanaście sygnałów, które wykazują sprzężenia w widmie ^1H - ^{13}C HMBC, zarówno z protonami w obrębie fragmentu tribenzo przy 9.54 i 8.19 ppm, jak i z alifatycznymi benzyłowymi grupami protonów CH_2 przy 4.86 i 4.72 ppm. Sygnały jąder węglowych przy 161.87, 161.79, 161.56, 161.51 ppm pochodzą od czwartorzędowych aromatycznych węgli C3(C5) dendrymeru podstawionych grupami OCH_2 .

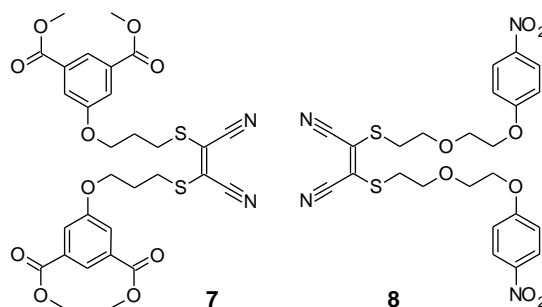


Ryc. 27. Porównanie przesunięć chemicznych sygnałów jąder wodoru i jąder węglowych makrocykla **6** oraz jego agregatów 1-3. Strzałki symbolizują sprzężenia zaobserwowane w widmie ^1H - ^{13}C HMBC. Wartości przesunięć chemicznych (^{13}C) [ppm] podano z dokładnością do drugiego miejsca po przecinku (kropce), celem odczytania wszystkich sygnałów pochodzących od form zagregowanych.

Niektóre sygnały węgli trzeciorzędowych pierścienia tribenzoporfirazynowego są ponadto ukryte pod sygnałem resztkowym pochodzącym od pirydyny- d_5 przy 124.00 ppm, ale ich obecność potwierdzają odpowiednie sprzężenia: (i) w widmie ^1H - ^{13}C HSQC z protonem przy 9.54 ppm oraz (ii) w widmie ^1H - ^{13}C HMBC z protonem przy 8.19 ppm. Pozostałe sygnały od jąder węglowych, które występują w widmie ^{13}C NMR (154.71, 153.58, 150.69, 141.81, 139.59 i 136.31 ppm), nie wykazują żadnych sprzężeń

z protonami w widmach dwuwymiarowych, stąd zostały przypisane do atomów węgla znajdujących się w obrębie pierścienia makrocyklicznego. Eksperyment ^1H - ^1H COSY wniósł istotną informację na temat sąsiedztwa dwóch grup atomów wodoru pierścienia makrocyklicznego, przy 9.54 i 8.19 ppm (widma NMR umieszczono w suplemencie). Należy podkreślić, że analiza NMR widma wcześniej uzyskanego analogu typu A₄ tego makrocykla była mniej złożona [85,87]. Wydaje się, że obecność dendrymeru G1 typu Fréchet'a tylko w jednym z czterech fragmentów tribenzoporfirazy nie zapobiega agregacji, stąd w analizowanej próbce podczas badań w roztworze stwierdza się obecność agregatów.

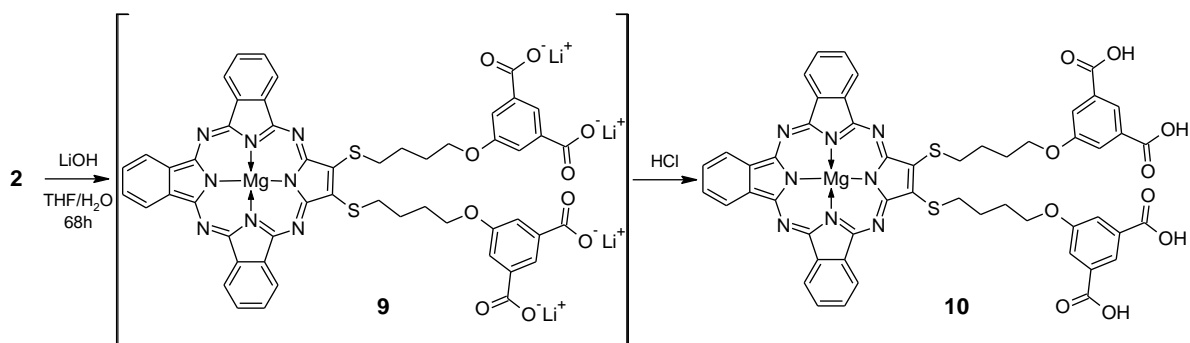
W pracy doktorskiej podjęto się także badań rekonesansowych syntezy innych porfirazyn sulfanylowych, które zakończyły się niepowodzeniem. W przypadku pochodnej dimerkaptomaleonitryla **7** (otrzymanej przez mgr. Michała Falkowskiego), w reakcji makrocyklizacji powstały produkt makrocykliczny okazał się związkem nietrwałym, ulegającym rozkładowi w trakcie prób izolacji z mieszaniny reakcyjnej (**Ryc. 28**). W reakcji makrocyklizacji podjęto się również oceny reaktywności pochodnej dimerkaptomaleonitryla **8**. W tym przypadku analiza NMR, jak i MS nie potwierdziły spodziewanej budowy chemicznej powstałego makrocykla, wskazywały jedynie na obecność mieszaniny produktów.



Ryc. 28. Budowa chemiczna pochodnych dimerkaptomaleonitryla **7** i **8**.

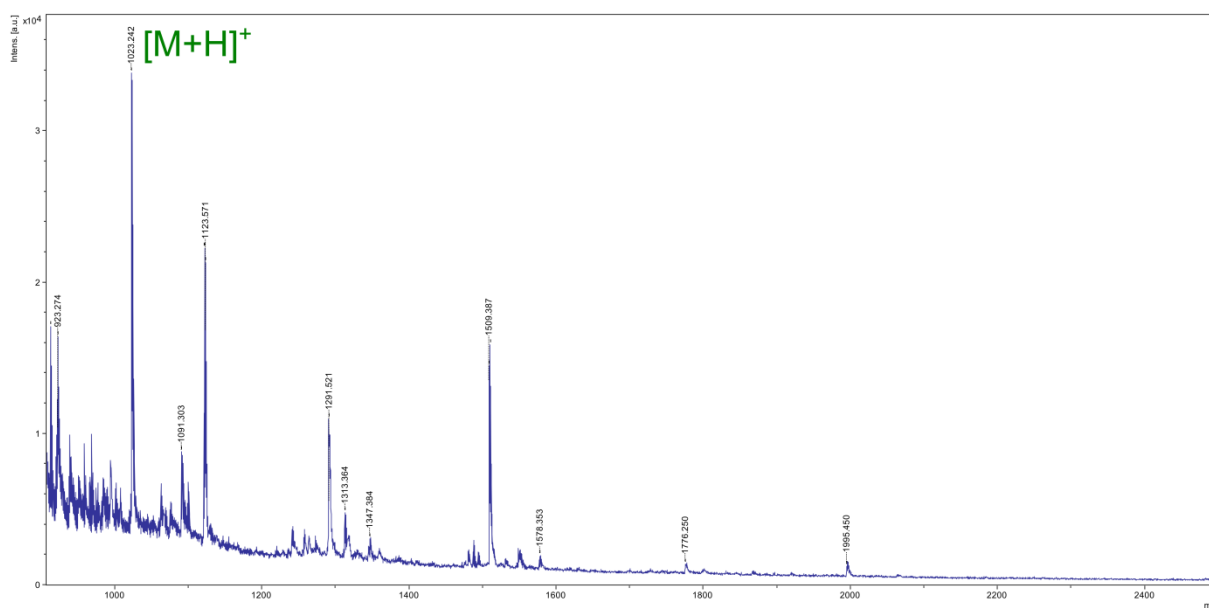
4.1.2. Reakcje modyfikacji części peryferyjnej tribenzoporfirazy **2**

W dalszych badaniach przystąpiono do oceny reaktywności tribenzoporfirazy **2**. Korzystną właściwością z punktu widzenia potencjalnych zastosowań w terapii fotodynamicznej jest rozpuszczalność fotosensybilizatora w wodzie, dlatego też podjęto próby hydrolizy wiązań estrowych występujących w **2** i ich przeprowadzenia w sole. W pierwszym podejściu zastosowano procedurę Lee i wsp. z wykorzystaniem wodorotlenku litu w układzie dwufazowych woda/THF w temperaturze pokojowej [88]. Reakcję tę prowadzono przez 68 godzin intensywnie mieszając (**Schemat 9**).



Schemat 9. Reakcja saponifikacji **2**.

Związek **9** odparowano, rozpuszczono w wodzie i przesączono przez ziemię okrzemkową celem oddzielenia nierozpuszczalnych w wodzie zanieczyszczeń organicznych. Następnie, celem odmycia nadmiaru soli nieorganicznych rozpuszczalnych w wodzie, **9** poddano reakcji z 10% wodnym roztworem HCl co pozwoliło na uzyskanie niebieskiego osadu związku **10**. Wydajność całego procesu prowadzącego od **2** do **10** wyniosła 10%. Powstanie **10** potwierdzono z wykorzystaniem MS ESI (m/z obliczone 1023.208, uzyskane 1023.242, por. **Ryc. 29**).

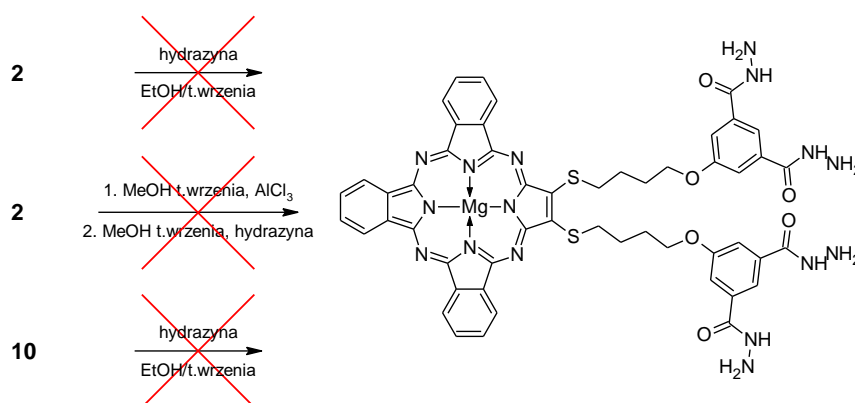


Ryc. 29. Widmo MS ESI tribenzoporfirazy **10**.

Ze względu na niską wydajność syntezy **10** (tylko 10%), podjęto się optymalizacji metody, modyfikując różne procedury literaturowe hydrolizy estrów. Najwyższą wydajność osiągnięto adaptując metodologię opracowaną przez Theodorou i wsp., a mianowicie poprzez wkraplanie roztworu wodorotlenku sodu w metanolu do roztworu **2** w dichlorometanie [89]. Zastosowanie tej procedury, wraz z wcześniej opracowaną metodą oczyszczania, umożliwiło zwiększenie wydajności syntezy **10** do 42%, przy równoczesnej redukcji czasu trwania reakcji do 20 godzin.

Podczas charakterystyki makrocykla **10** napotkano na pewne trudności wynikające z jego właściwości fizykochemicznych. Eksperymenty NMR polegające na wykonaniu widm w różnych rozpuszczalnikach (DMSO- d_6 , pirydyna- d_5 , D₂O) również nie przyniosły pozytywnych rezultatów, gdyż obserwowano bardzo szerokie i rozmyte sygnały związku. Po części trudności te związane były z problemem w dobraniu odpowiedniego rozpuszczalnika, ponieważ tribenzoporfirazyne jest dobrze rozpuszczalna jedynie w wodnych roztworach o odczynie zasadowym, całkowicie nierozpuszczalna w niepolarnych rozpuszczalnikach organicznych (chloroform, toluen) i bardzo słabo rozpuszczalna w THF. Jednakże, zastosowanie samego D₂O powodowało bardzo silną agregację **10** i uniemożliwiało uzyskanie widma NMR satysfakcjonującej jakości. Próby uzyskania widma NMR z użyciem deuterowanego dimetylosulfotlenku (DMSO- d_6) lub pirydyny (pirydyna- d_5), które są związkami hamującymi agregację [86], i w których **10** jest rozpuszczalny, również nie przyniosły oczekiwanych rezultatów. Uzyskiwane widma NMR nie były dobrej jakości i nie pozwoliły na kompletną charakterystykę związku.

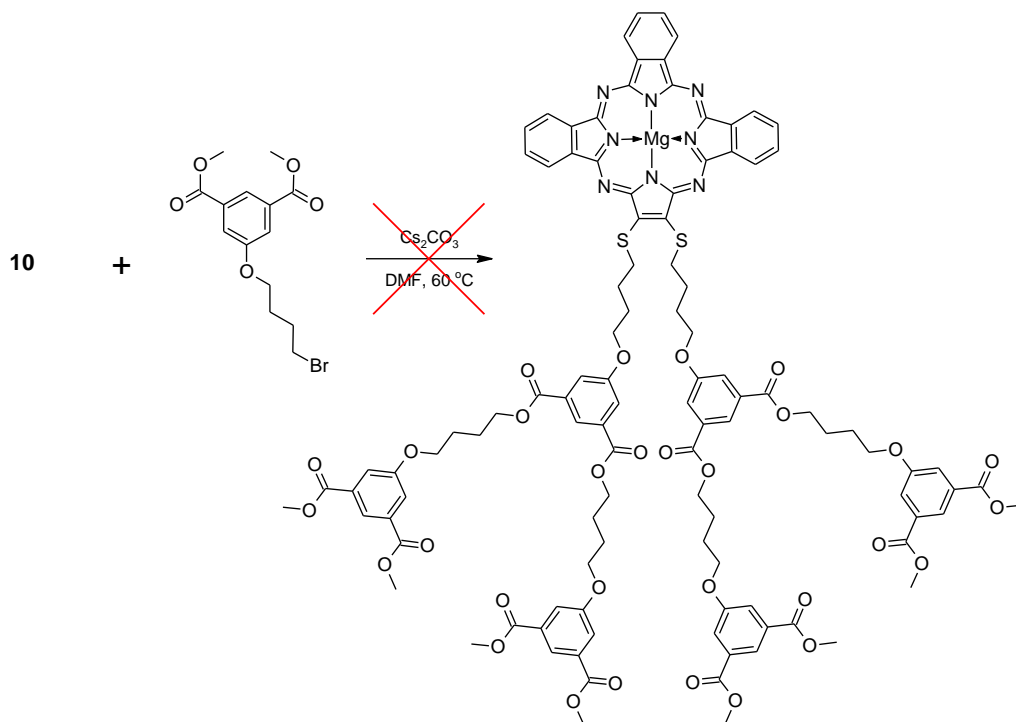
Ze względu na perspektywy wykorzystania pochodnych makrocykla **2** w badaniach biologicznych podjęto próby uzyskania pochodnych: (i) hydrazydowych oraz (ii) bardziej rozbudowanych estrowych. Celem otrzymania pochodnych hydrazydowych zastosowano procedurę Chawla i wsp. [90], a także jej modyfikacje (zastosowane procedury przedstawiono na **Schemacie 10**). Z uwagi na niepowodzenia preparatywne, ta część badań nie była dalej kontynuowana.



Schemat 10. Badania rekonesansowe w kierunku pochodnych hydrazydowych.

W kolejnych eksperymentach postanowiono przekształcić tribenzoporfirazyne z grupami kwasowymi w ich analogi estrowe z bardziej rozbudowanymi podstawnikami typu dendrymerycznego, celem dalszego wykorzystania w badaniach biologicznych (**Schemat 11**). W tym celu **10** poddano reakcji alkilacji z użyciem 5-(4-bromobutoksy)izoftalanu dimetylu

w DMF w 60°C w obecności Cs_2CO_3 , jako zasady, czego planowanym efektem miało być otrzymanie estrowego dendrymeru *pseudo*-G1.

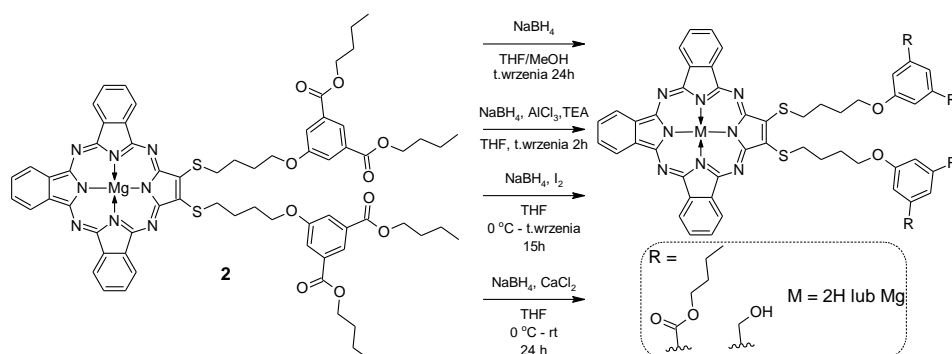


Schemat 11. Próba otrzymania estrowego *pseudo*-dendrymeru G1.

W mieszaninie poreakcyjnej stwierdzono wprawdzie obecność nowego związku makrocyklicznego (TLC), jednak okazał się on na tyle nietrwały, że niemożliwe okazało się jego wyizolowanie i scharakteryzowanie. Z użyciem metody MS ESI stwierdzono jedynie pojawienie się jonu m/z 1324.454 (obliczone dla $[\text{M}+\text{K}]^+$ 1325.2632) wskazującego na przyłączenie jednej grupy alkilowej, jednak niemożliwa była dalsza ocena, czy jest to efekt niepełnego podstawienia, rozkładu pozostałych wiązań estrowych, czy też fragmentacji cząsteczki pod wpływem jonizacji.

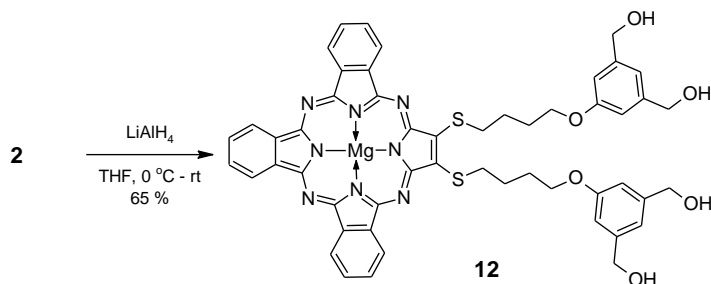
Ze względu na problemy z charakterystyką fizykochemiczną i znikomą reaktywność tribenzoporfirazy kwasowej **10**, podjęto badania pochodnej mniej polarnej, lecz w dalszym ciągu amfifilowej, posiadającej w części peryferyjnej grupy benzyłowe. Aby to osiągnąć, konieczne było przeprowadzenie reakcji redukcji, celem przekształcenia grupy estrowej do grup hydroksymetylowych. Początkowo podjęto próby wykorzystania borowodoru sodu jako czynnika redukującego dla estrów: (i) reakcja z użyciem borowodoru sodu w mieszaninie THF i metanolu w temperaturze wrzenia [91]; (ii) reakcja z wykorzystaniem borowodoru sodu i dodatku AlCl_3 oraz trietyloaminy do mieszaniny reakcyjnej [92]; (iii) reakcja z wykorzystaniem NaBH_4 i jodu [93]; (iv) reakcja redukcji z użyciem borowodoru sodu i dodatku CaCl_2 jako katalizatora [94]. Ze względu na niemożność

uzyskania w pełni zredukowanego produktu w satysfakcjonującej ilości i wydajności, zrezygnowano z NaBH_4 jako czynnika redukującego i przystąpiono do reakcji z użyciem LiAlH_4 . Zestawienie opisanych reakcji znajduje się na **Schemacie 12**.



Schemat 12. Zestawienie rekonesansowych reakcji redukcji z użyciem NaBH_4 .

Silniejszym reduktorem, który został wykorzystany w reakcji redukcji był glinowodorek litu. Wykorzystano procedurę eksperymentalną opracowaną przez Högera [95], z drobnymi modyfikacjami dostosowującymi ją dla związków makrocyklicznych (**Schemat 13**).

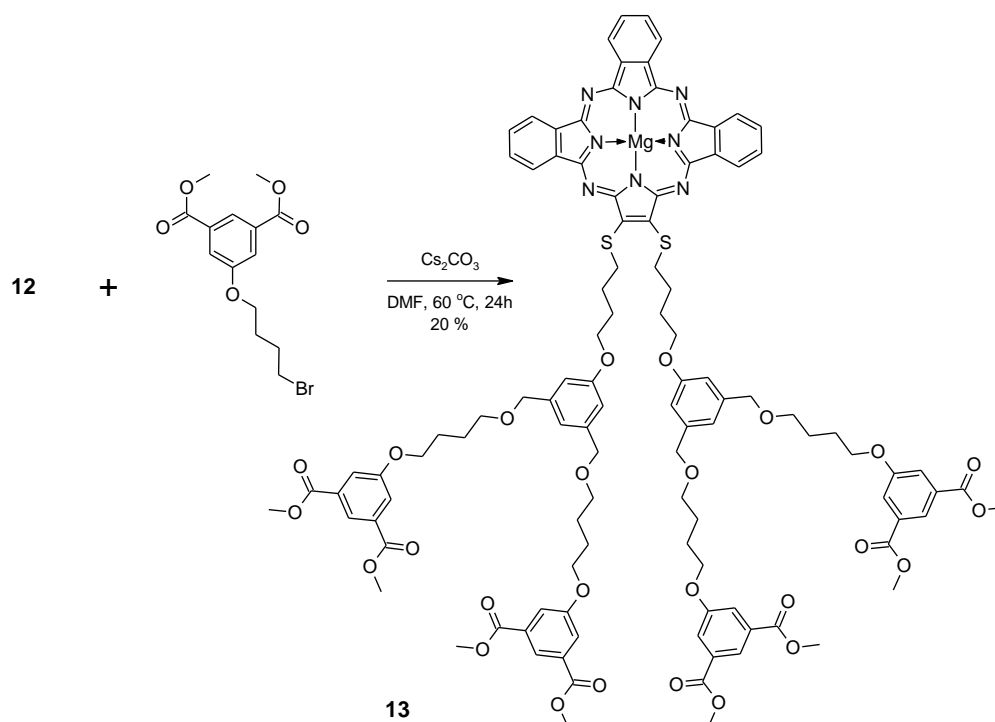


Schemat 13. Otrzymywanie tribenzoporfirazy **12** z wykorzystaniem LiAlH_4 .

Reakcja redukcji **2** glinowodorkiem litu w THF w temperaturze pokojowej prowadziła do jednego produktu makrocyklicznego – **12**. Po jego oczyszczeniu metodami chromatograficznymi z nieorganicznych soli i zanieczyszczeń organicznych stwierdzono, że wydajność procesu wyniosła 65%. Związek **12** w pełni scharakteryzowano fizykochemicznie z użyciem technik UV-Vis, MS i NMR. Stwierdzono, że profil widma absorpcji UV-Vis **12** jest typowy dla tribenzoporfirazy. W przebiegu widma w dichlorometanie występuje rozszczepione pasmo Q z trzema maksimumami absorpcji przy 711, 652 i 597 nm i z jednym maksimum w zakresie pasma B przy 382 nm. Analiza NMR była jednak utrudniona z uwagi na nakładające się na siebie sygnały pochodzące od aromatycznych atomów wodoru grup benzenowych pierścienia makrocyklicznego i grup fenylowych w obrębie peryferyjnych grup izoftalowych. Sygnały aromatycznych protonów pojawiły się jako trzy multiplety w zakresach 9.57-8.84, 8.64-7.57 i 7.51-7.21 ppm. Sygnały przy 4.34 i 0.83 ppm przypisano atomom wodoru grup OCH_2 odpowiednio linkera

butylenowego i ugrupowania hydroksymetylowego. Sygnały protonów odpowiadające grupom metylenowym w obrębie linkera butylenowego w pozycji 2 i 3 pojawiły się przy odpowiednio 1.33 i 1.62 ppm, natomiast w pozycji 1 (grupa SCH₂) jako bardzo szeroki multiplet o małej intensywności w zakresie 4.07-3.81 ppm. W widmie ¹³C NMR stwierdzono brak sygnału przy 167 ppm, odpowiadającego grupie karbonylowej, co świadczy o pełnej redukcji grup estrowych.

Warto wspomnieć, że związek ten wykazywał bardzo wysoką aktywność biologiczną zarówno na liniach komórkowych nowotworowych (por. rozdział 4.5.1), jak i mikroorganizmów chorobotwórczych (por. rozdział 4.5.2).



Schemat 14. Synteza tribenzoporfirazy **13** podstawionej dendrymerem *pseudo*-G1.

Mając do dyspozycji związek z czterema grupami hydroksylowymi, które można łatwo podstawić innymi grupami, podjęto próby modyfikacji **12** do porfirazy podstawionej dendrymerem. Rozważono dwa podejścia preparatywne: (i) wykorzystanie **12** w reakcji Mitsunobu z pochodną 5-hydroksyizoftalanu oraz (ii) alkilację **12** bromkiem izoftaloilobutylovym. Podjęto rekonesansową próbę zastosowania reakcji Mitsunobu z wykorzystaniem trifenylofosfiny i estru etylowego kwasu azodikarboksylowego w THF [95], jako substratów używając 5-hydroksyizoftalanu dimetylu oraz **12**. Reakcja ta nie doprowadziła do uzyskania oczekiwanego produktu. W związku z tym poddano **12** reakcji alkilacji z wykorzystaniem estru dimetylowego kwasu 5-(4-bromobutoksy)izoftalowego w DMF w 60°C w obecności Cs₂CO₃ przez 24 godziny (**Schemat 14**). Tribenzoporfirazynę

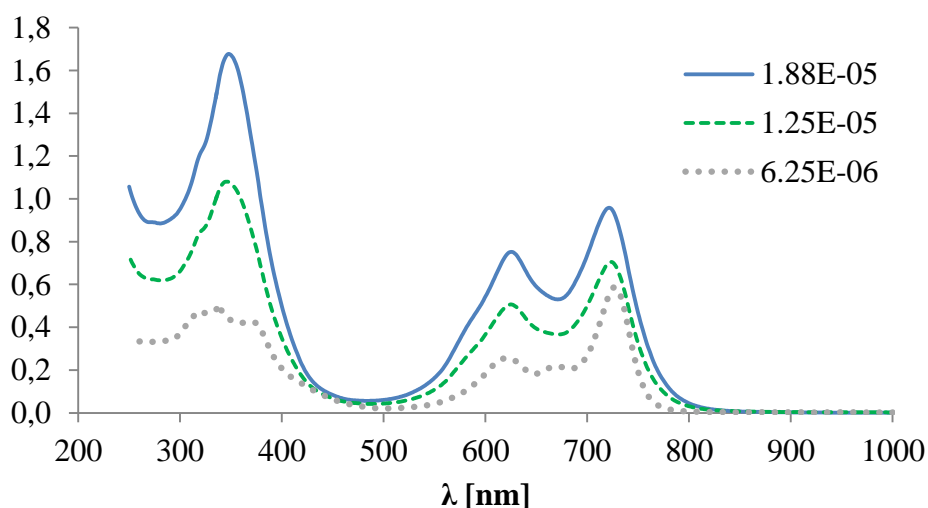
podstawioną w części peryferyjnej dendrymerem *pseudo*-G1 **13** uzyskano z wydajnością 20%. Nie jest to w pełnym znaczeniu dendrymer generacji pierwszej, gdyż nie występują dwa identyczne „mery” w pierwszej i zerowej generacji – w generacji zerowej atom tlenu jest zastąpiony atomem siarki pochodzącym od dimerkaptomaleonitryla – stąd używany jest przedrostek *pseudo*.

Tribenzoporfirazynę **13** wyizolowano z mieszaniny reakcyjnej metodami chromatograficznymi, po czym scharakteryzowano fizykochemicznie z wykorzystaniem technik UV-Vis, MS oraz NMR. Przebieg widma absorpcji UV-Vis tribenzoporfirazyny **13** był zbliżony do uprzednio uzyskanych dla związków **2** i **4**, z dwoma maksimami w zakresie pasma Q przy 694 i 651 nm oraz dwoma maksimami w zakresie pasma B przy 359 i 316 nm. Potwierdzeniem uzyskania związku **13** jest także eksperyment MS MALDI, w którym zaobserwowano sygnał m/z 2024.679, odpowiadający $[M+H]^+$ (obliczona wartość: 2024.502). Potwierdzenie struktury przy użyciu jądrowego rezonansu magnetycznego było kłopotliwe, ze względu na ilość sygnałów protonów i jąder węgla alifatycznych pochodzących od grup linkerowych G0 i *pseudo*-G1. Również sygnały protonów w obrębie pierścieni izoftalanowych obu generacji nie były możliwe do rozróżnienia, nawet przy użyciu technik dwuwymiarowych. Analiza związku z wykorzystaniem NMR pozwoliła na rozróżnienie sygnałów grup protonów przy 7.95-7.77 ppm pochodzących od benzenów pierścienia makrocyklicznego, pozycji 2 i 6 pierścieni benzenowych (w obrębie zarówno G0 i *pseudo*-G1). Atomy wodorów występujące w pozycji 4 pierścieni benzenowych (zarówno G0 i *pseudo*-G1) pojawiły się jako multiplet w zakresie 8.55-8.39 ppm. Sygnały z przedziału 4.49-4.37 ppm przypisano atomom wodoru grup CH₂ przyłączonych w pozycjach 3 i 5 benzenów G0. Przypisano także sygnały do atomów wodoru grup CH₃ (3.83 ppm), grup O-CH₂ linkerów butylenowych (4.04-3.81 ppm), grup S-CH₂ (2.30 ppm) oraz grup CH₂ znajdujących się w pozycjach 2 i 3 linkerów butylenowych (1.94-1.84 i 1.30-1.20 ppm).

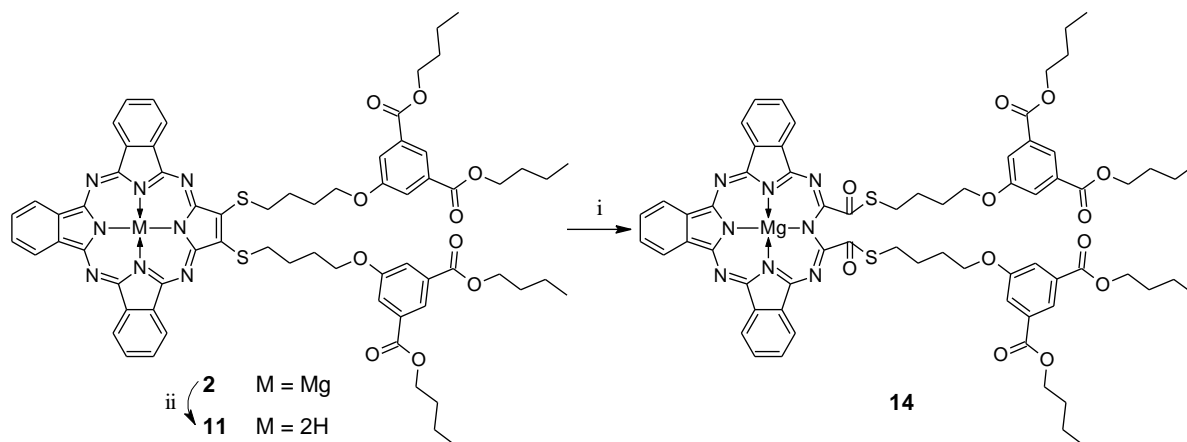
4.1.3. Synteza i charakterystyka *S-secotribenzoporfirazyny*

W czasie optymalizacji syntezy tribenzoporfirazyny **10** i reakcji hydrolizy grup estrowych, podjęto się również prowadzenia reakcji saponifikacji **2** z wykorzystaniem wodnego roztworu NaOH w warunkach dwufazowych (CH₂Cl₂/roztwór NaOH) w podwyższonej temperaturze. Zupełnie przypadkowo pojawił się nowy problem badawczy do przeanalizowania. W czasie prowadzenia reakcji saponifikacji związku **2** do spodziewanego produktu **10**, w przeciągu kilku godzin odparował rozpuszczalnik organiczny (CH₂Cl₂), a powstały niebieski barwnik osadził się na ściankach kolby. Produkt

ten nie był tożsamy ani z substratem **2**, ani produktem **10**. Na podstawie analizy TLC stwierdzono, że nowy produkt był nieznacznie bardziej polarny od **2**, a także wciąż znacząco hydrofobowy – rozpuszczalny w chloroformie, dichlorometanie, THF, toluenie, DMF, DMSO i acetonie, natomiast nierozpuszczalny w *n*-heksanie, metanolu ani w wodzie. Drobne ilości tego produktu, które udało się wyizolować metodami chromatograficznymi poddano analizie w zakresie UV-Vis. W przebiegu widma nowego produktu makrocyklicznego **14** zaobserwowano znaczące zmiany w obszarze pasma Q makrocykla (**Ryc. 30**). W porównaniu z widmem związku **2**, pasmo Q uległo znacznemu rozszczepieniu na dwa intensywne, szerokie pasma (**Ryc. 31**). Takie zmiany w obrębie pasma Q obserwowano wcześniej w przypadku usunięcia jonu metalu z centrum koordynacyjnego pierścienia makrocyklicznego, a znacznie rzadziej w przypadku utraty symetrii pierścienia porfirazyny [96].

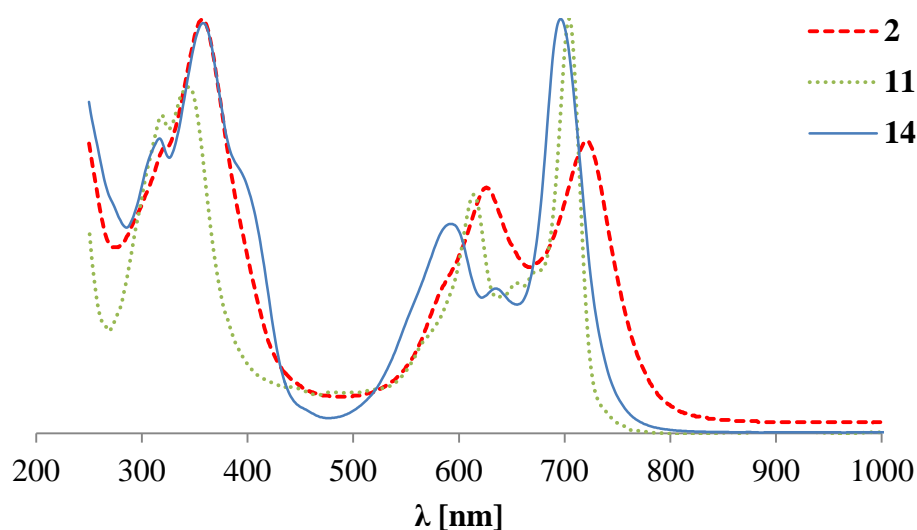


Ryc. 30. Widmo UV-Vis związku **14** w chloroformie w różnych stężeniach (mol/dm^3).



Schemat 15. Ocena reaktywności **2**: (i) KMnO_4 , H_2O /dichlorometan 1:1 (v/v), 2 godziny, temperatura pokojowa; (ii) kwas trifluorooctowy, 15 min., temperatura pokojowa, powietrze.

Wyniki analizy MS ESI wskazały na powstanie produktu utlenienia, gdyż główny sygnał odpowiadał zwiększeniu masy związku **2** o dwa atomy tlenu (m/z znalezione 1279.368 $[M+H]^+$, obliczone 1279.4483). Zatem dedukując z uzyskanej masy związku i zmian w widmie UV-Vis, zaproponowano dla związku **14** strukturę *seco*-porfirazyny, która utworzyła się poprzez oksydatywne otwarcie pierścienia makrocyklicznego (**Schemat 15**). Było to zaskakujące, gdyż dotychczas dla porfirazyn podstawionych grupami sulfonyłowymi nigdy nie odnotowano tworzenia się form *seco*. Otrzymany produkt **14** jest więc pierwszym przykładem S-*seco*porfirazyny.



Ryc. 31. Widma UV-Vis **2** (linia przerywana), **11** (linia kropkowana) i **14** (linia ciągła).

Wszystkie widma zostały zarejestrowane w dichlorometanie i są znormalizowane.

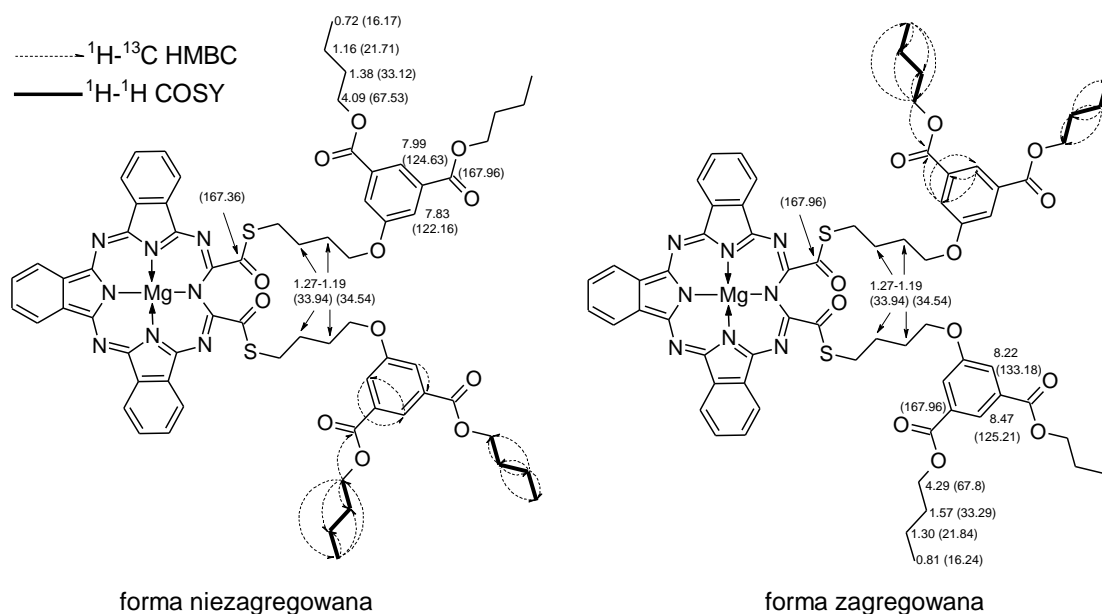
Obliczona wydajność opisanej reakcji była niska (<5%), w związku z tym – chcąc potwierdzić powstanie nowego typu S-*seco*-porfirazyny – próbowano zastosować literaturowe metody syntezy opracowane dla analogicznych *seco*-porfirazyn. Wcześniej, *seco*-porfirazyny otrzymywano: (i) jako produkt uboczny reakcji makrocyklizacji [97–99]; (ii) przez utlenianie porfirazyn, z wykorzystaniem: (a) $KMnO_4$ [98,100,101], (b) MnO_2 [98], (c) gazowego tlenu [102], (d) tlenu z powietrza [103–105]; (iii) podczas demetalacji kwasem octowym lub trifluorooctowym przy dostępie powietrza atmosferycznego [98,106–108] a nawet w warunkach gazu obojętnego [106,108–111]; (iv) w wyniku niespecyficznych reakcji [112], bądź specjalnie zaprojektowanych reakcji, podczas których dokonywano skalowania [113].

Wykorzystując te dane, wykonano rekonesansowe reakcje utlenienia **2** przy użyciu MnO_2 w dichlorometanie, jednak nie uzyskano w ten sposób *seco*-produktu. Zastosowanie jako czynnika utleniającego 2,3-dichloro-5,6-dicyjano-1,4-benzochinonu również okazało się

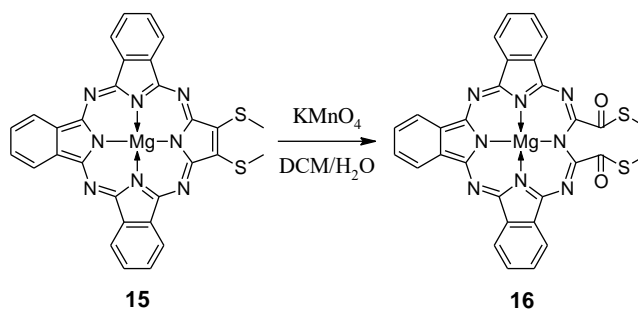
nietrafione, gdyż w wyniku tej reakcji wyizolowano jedynie nieprzereagowany substrat [114]. Inna popularna metoda, polegająca na jednoczesnej reakcji demetalacji i utleniania z użyciem kwasu trifluorooctowego przy dostępie powietrza doprowadziła do uzyskania jako produktu jedynie demetalowanej pochodnej **11** (Schemat 15). Podjęto również próbę utlenienia **2** tlenem z powietrza. Jednak do dwóch tygodni prowadzenia reakcji w tych warunkach stwierdzono trwałość wyjściowego substratu na działanie tlenu atmosferycznego. W końcu, zastosowanie dwufazowej mieszaniny wodnego roztworu KMnO_4 i dichlorometanowego roztworu **2** pozwoliło na uzyskanie **14** z wydajnością 43%. Warto dodać, że poddanie **11** utlenianiu w tych samych warunkach skutkowało jedynie całkowitą degradacją porfirazyny do szeregu produktów rozkładu.

Analiza NMR związku **14** okazała się zdecydowanie bardziej skomplikowana niż oczekiwano. Z tego też względu, poza widmami dwuwymiarowymi ^1H - ^{13}C HMBC oraz ^1H - ^{13}C HSQC, wykorzystano także techniki ^1H - ^{13}H TOCSY i ^1H - ^{13}C NOESY. Wyniki eksperymentów NMR wykazały, że w badanych próbkach występują dwie formy związku makrocyklicznego: Pz **14** i jej forma zagregowana. Sygnały protonów formy niezagregowanej odnotowane przy 0.72, 1.16, 1.36, 4.09 ppm oraz 7.99, 7.83 ppm zostały przypisane odpowiednio do estrów butylowych i aromatycznych atomów wodoru pierścieni izoftalanu. Sygnały pochodzące od atomów wodoru grup CH_2 linkera niesąsiadujących z heteroatomami zaobserwowano w zakresie 1.27-1.19 ppm, ale ze względu na niewielkie różnice w wartościach przesunięć chemicznych niemożliwe okazało się ich rozróżnienie. Sygnały protonów pochodzące od grupy estrowej przy 0.81, 1.30, 1.57, 4.29 ppm i izoftalanowej przy 8.22, 8.47 ppm, ze względu na sprzężenia odnotowane w widmach 2D, przypisano do formy zagregowanej. Przesunięcie sygnałów protonów od odpowiednich grup funkcyjnych w kierunku niższego pola, odpowiadające formie zagregowanej, obserwowano już wcześniej [115,116]. Próby ograniczenia agregacji związku **14** przez wykonanie eksperymentu po rozcieńczeniu próbki, czy też przy użyciu jako rozpuszczalnika $\text{DMSO-}d_6$ lub CDCl_3 z domieszką CF_3COOD nie poprawiły jakości widm. Bardzo ważny sygnał diagnostyczny w widmie ^{13}C pojawił się przy 167.36 ppm. Sygnał ten został przypisany do węgla β w pierścieniu pirolu układu porfirazyny, który uległ utlenieniu, a tym samym stanowił potwierdzenie, że doszło do „otwarcia” pierścienia. Sygnał jądra węglowego przy tej wartości nie wykazuje sprzężeń w widmie ^1H - ^{13}C HMBC z protonami pierścienia izoftalowego, ani znajdującymi się w sąsiedztwie pierścienia izoftalowego atomami wodoru alifatycznych grup metylenowych, w przeciwieństwie do sygnału przy 167.96 ppm, gdzie te sprzężenia były obserwowane. Należy dodać, że drugi sygnał w zakresie odpowiadającym

węglowi grupy karbonylowej nie był obserwowany wcześniej w widmie wykonanym dla porfirazyny **2**. Sygnały protonów i jąder węglowych wraz ze sprzężeniami przedstawiono na **Ryc. 32**.



Ryc. 32. Przesunięcia chemiczne ^1H i (^{13}C) [ppm] tribenzoporfirazyny **14** wraz z wybranymi korelacjami $^1\text{H}-^1\text{H}$ COSY i $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ HMBC. Wartości przesunięć chemicznych (^{13}C) zostały podane do drugiego miejsca po przecinku (kropce) dla rozróżnienia form niezagregowanej i zagregowanej.



Ryc. 33. Badania rekonesansowe w kierunku *seco*-porfirazyny **16**.

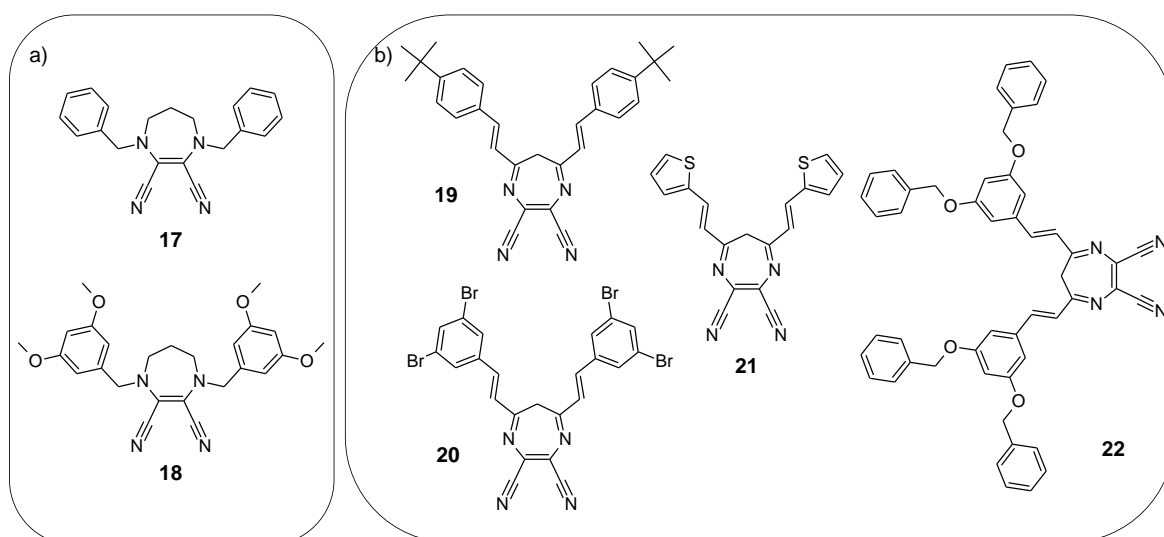
Ze względu na agregację związku **14**, postanowiono przeprowadzić eksperyment syntetyczny i otrzymać związek modelowy - mniej rozbudowaną tribenzoporfirazynę siarkową. 2,2,3,3-Bis(metylosulfanylo)tribenzoporfirazynę uzyskano wykorzystując literaturowe procedury syntetyczne [24,117]. Pokróćce, 2,3-bis(metylosulfanylo)but-2-enodinitryl poddano reakcji tetrameryzacji z nadmiarem 1,2-dicyjanobenzenu uzyskując **15**. Po wstępnym oczyszczeniu od nadmiaru MgPc, **15** poddano utlenianiu (**Ryc. 33**) w warunkach takich, jak przy powstaniu *seco*-porfirazyny **14**. Próba izolacji produktu

zakończyła się niepowodzeniem, niemniej jednak w widmie MS ESI stwierdzono obecność jonów m/z 633 i 644 (przy oczekiwanych wartościach odpowiednio 633.0737 dla $[M+Na]^+$ i 645.0935 dla $[M+Cl]^-$), które wskazują na pojawienie się produktu utlenienia **16**. Zaobserwowano ponadto pojawienie się różnic w widmach UV-Vis związków **15** i **16**, wskazujących na utworzenie się *seco*-produktu.

4.2. Diazepinotribenzoporfirazy– synteza i charakterystyka fizykochemiczna

Kolejną grupą związków pochodnych tribenzoporfirazy, których syntezy podjęto się w dysertacji, były tribenzoporfirazy ze skondensowanym pierścieniem 6*H*-1,4-diazepiny lub pierścieniem 1,4-diazacyklohept-2-enowym. Wszystkie substraty do reakcji makrocyclizacji, pochodne 2,3-dicyjano-6*H*-1,4-diazepiny **17-22**, otrzymano od mgr Eweliny Wieczorek.

4.2.1. Rekonesansowe reakcje cyklotetrameryzacji pochodnych 1,4-diaza-2,3-dicyjanocyklohept-2-enu



Ryc. 34. Pochodne: (a) 1,4-diaza-2,3-dicyjanocyklohept-2-enu i (b) 1,2-dicyjano-6*H*-1,4-diazepiny, dla których niemożliwe było uzyskanie odpowiednich tribenzoporfirazyn.

Początkowe eksperymenty z użyciem pochodnych uwodornionych **17** i **18** nie przyniosły oczekiwanych rezultatów, z uwagi na brak reaktywności w warunkach reakcji tetrameryzacji (**Ryc. 34a**). W mieszaninach poreakcyjnych zidentyfikowano jedynie ubocznie powstający MgPc. Substraty diazepinowe nie wykazywały także reaktywności podczas prób otrzymania porfirazyn typu A₄. Wydaje się, że niepowodzenia te wynikały najprawdopodobniej z niskiej reaktywności tych konkretnych pochodnych, co obserwowano także uprzednio podczas syntezy uwodornionych porfirazyn [43].

4.2.2. Rekonesansowe reakcje makrocyklizacji pochodnych 1,2-dicyjano-6H-1,4-diazepiny z podstawnikami styrylowymi

Następnie, przystąpiono do oceny reaktywności w reakcjach makrocyklizacji diazepinowych pochodnych maleonitryli **19-22** podstawionych ugrupowaniami styrylowymi lub ich analogów, przedstawionych na **Ryc. 34b**.

W tym przypadku interpretacja reakcji była bardziej skomplikowana niż w przypadku wcześniej omówionych uwodornionych pochodnych diazepinowych. Podczas rekonesansowej reakcji makrocyklizacji **19** (*n*-butanolan magnezu we wrzącym *n*-butanolu) do tribenzoporfirazyny, zaobserwowano nowy produkt makrocykliczny w TLC. Produkt ten jednak bardzo szybko zanikał, najprawdopodobniej wskutek niskiej stabilności. Nie zaobserwowano również sygnału odpowiadającego oczekiwanemu produktowi w widmie MS. Stosując identyczne warunki reakcji również z użyciem pochodnej maleonitrylowej **20** nie uzyskano produktu makrocyklicznego – co potwierdzono z wykorzystaniem TLC i MS. Znaleziony w widmie MS sygnał *m/z* 1072.242 nie pokrywał się z wartością obliczoną (1067.8769), wskazywał natomiast na powstawanie podczas reakcji produktu posiadającego cztery dodatkowe atomy wodoru $[M+4H+H]^+$ (masa obliczona dla tego produktu to 1072.9155). Przyłączenie czterech atomów wodoru wskazywałoby na uwodornienie wiązań alkenowych w części peryferyjnej lub iminowych w pierścieniu diazepinowym. Tych wątpliwości strukturalnych niestety nie można było rozwiązać z użyciem NMR, gdyż niemożliwe okazało się oczyszczenie i wyizolowanie produktu w ilości pozwalającej na wykonanie dokładnych pomiarów.

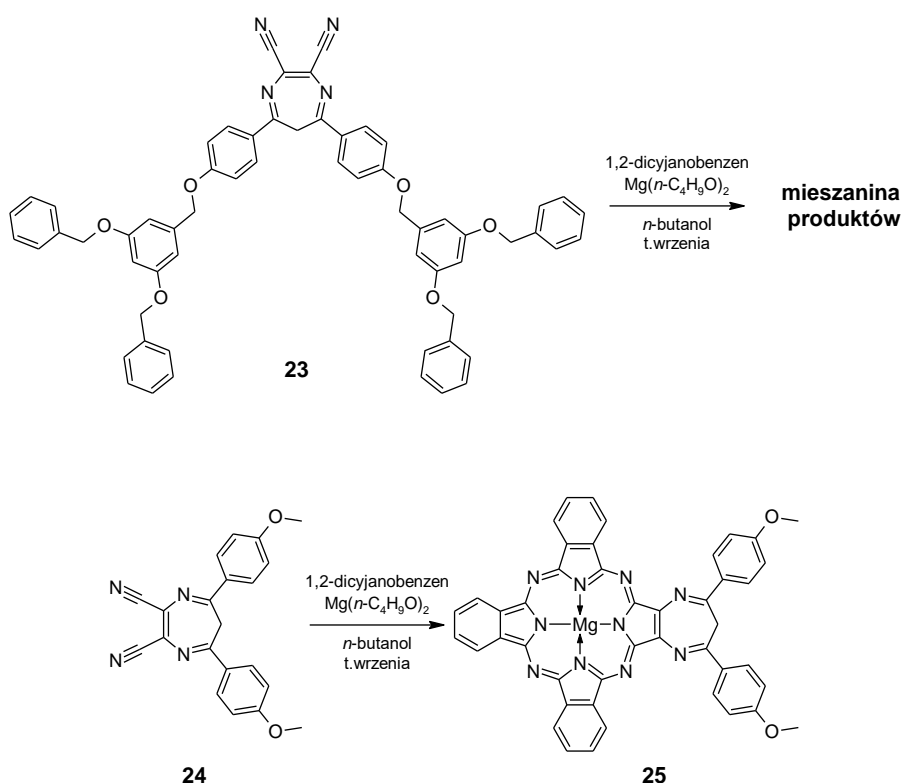
Rekonesansowa reakcja makrocyklizacji **21** prowadziła do mieszaniny produktów, wśród których zidentyfikowano również produkt oczekiwany (dzięki eksperymentowi MS). Izolacja tego produktu z wykorzystaniem technik chromatograficznych, mimo wielokrotnie podejmowanych prób okazała się niemożliwa. W tym przypadku powstanie mieszaniny produktów związane było najprawdopodobniej z możliwością tworzenia się połączeń tiofen-tiofen i następczą polimeryzacją [118].

Następnie w reakcji makrocyklizacji użyto związek **22** (**Ryc. 34b**). Reakcja makrocyklizacji z użyciem tej pochodnej i nadmiaru 1,2-dicyjanobenzenu prowadziła do powstania nowego produktu makrocyklicznego, na co wskazywała analiza TLC. Jednak problemy z izolacją czystego produktu, a także brak oczekiwanej masy w MS uniemożliwiły przeprowadzenie charakterystyki.

Reakcja makrocyklizacji **22** z nadmiarem 1,2-dicyjano-3,6-bis(2-propoksy)benzenu doprowadziła do powstania nowego związku o zielonej barwie, charakteryzującego się

w zakresie UV-Vis maksimum pasma Q przy około 690 nm, różnym od tego obserwowanego dla związku typu A₄ z ośmioma grupami 2-propoksyłowymi w położeniach nieperyferyjnych [49]. Co ciekawe, produkt ten wykazywał identyczne widmo w MS, jak porfirazyna typu A₄ otrzymana przez autotetrameryzację **22**. Możliwe jest, że pochodna maleonitrylowa **22** uległa innym przemianom niż tym zachodzącym w reakcji makrocyklizacji (*n*-butanolan magnezu w *n*-butanolu, temperatura wrzenia przez 20 godzin), prowadząc do powstania barwnego produktu innego niż pożądana porfirazyna.

4.2.3. Rekonesansowe reakcje cyklotetrameryzacji pochodnych 1,2-dicyjano-6*H*-1,4-diazepiny z podstawnikami aryłowymi

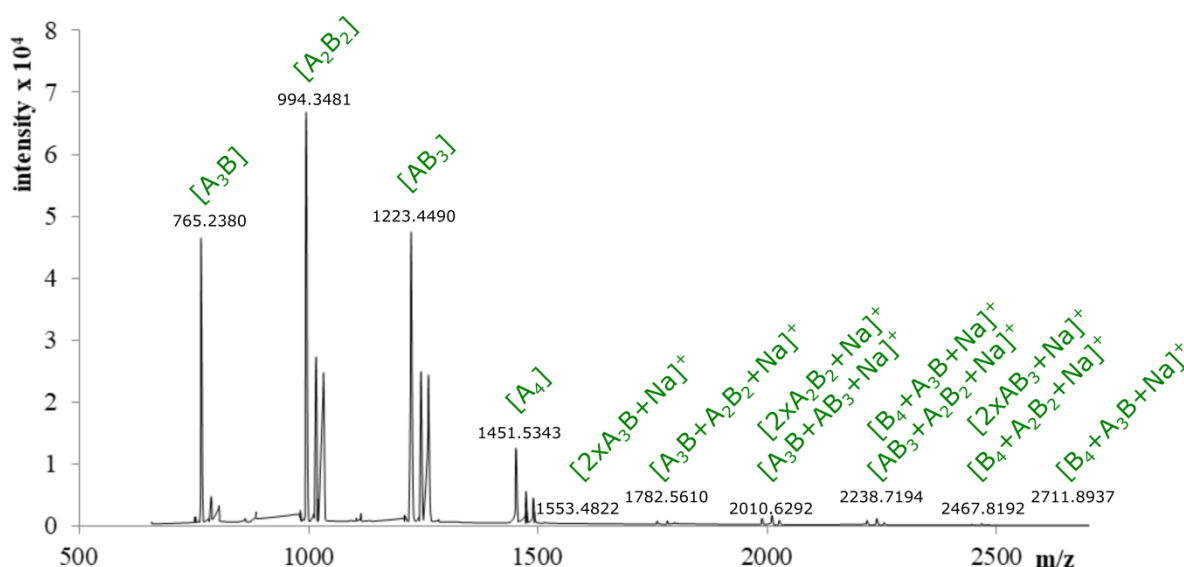


Schemat 16. Ocena reaktywności maleonitryli pochodnych 5,7-difenylo-6*H*-1,4-diazepiny w warunkach makrocyklizacji.

Ze względu na możliwość zachodzenia reakcji ubocznych na ugrupowaniach styrylowych, w kolejnych badaniach skupiono się na syntezie tribenzoporfirazyń podstawionych bezpośrednio ugrupowaniami aromatycznymi do pierścienia diazepinowego (**Schemat 16**). Początkowo podjęto się uzyskania tribenzoporfirazyń z użyciem pochodnej maleonitryla **23**, poddając ją reakcji cyklotetrameryzacji z nadmiarem 1,2-dicyjanobenzenu oraz *n*-butanolanem magnezu jako zasadą we wrzącym *n*-butanolu w czasie 20 godzin. Powstały związek makrocykliczny zidentyfikowano jako oczekiwaną

diazepinotribenzoporfirazyne na podstawie analizy widma masowego (wartość m/z obliczona dla $[M+H]^+$ 1340.4548, uzyskana 1340.4846), jednak inne makrocykliczne produkty obecne w mieszaninie poreakcyjnej uniemożliwiły efektywny rozdział chromatograficzny, wydzielenie związku i jego pełną charakterystykę fizykochemiczną.

Kolejnym związkiem, użytym w badaniach był **24**, mniej rozbudowany analog **23** [119]. W tym przypadku ciemnozielony produkt **25** wyizolowano z użyciem szerokiego spektrum metod chromatograficznych, faz stałych i eluentów, jak również poprzez wielokrotne strącanie z różnych mieszanin rozpuszczalników. Trudności w izolacji tego porfirynoidu można wytłumaczyć powstaniem w reakcji mieszaniny produktów, z których tylko pochodną A_3B wyizolowano w odpowiedniej ilości i o odpowiedniej czystości umożliwiającej potwierdzenie struktury. Na **Ryc. 35** przedstawiono widmo masowe mieszaniny poreakcyjnej, po wstępnym usunięciu ftalocyjaniny magnezowej. Na charakterystykę fizykochemiczną **25** złożyły się analizy UV-Vis, MS oraz NMR.



Ryc. 35. Widmo masowe mieszaniny po reakcji cyklotetrameryzacji **24**. Kolorem zielonym zaznaczono prawdopodobne produkty reakcji (A – pierścień benzenowy, B – podstawnik pochodnej diazepiny).

W przebiegu widma UV-Vis porfirazyny **25** stwierdzono obecność trzech maksimów absorpcji, jednego w obrębie pasma B przy 352 nm oraz dwóch w zakresie pasma Q przy 695 i 657 nm. W widmie MALDI wykonanym dla tego związku zaobserwowano sygnał m/z przy 765.2380 odpowiadający $[M+H]^+$ (wartość obliczona teoretycznie – 765.2325).

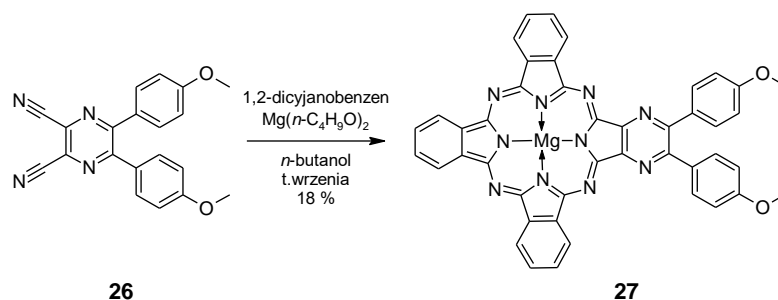
W widmie 1H NMR **25** zaobserwowano cztery sygnały, odpowiadające atomom wodoru pierścieni benzenowych części tribenzoporfirazykowej przy 9.46, 9.38, 8.27 i 8.24 ppm.

W zakresie aromatycznym odnotowano charakterystyczne sygnały od *para*-podstawionych grup fenylowych przy 8.55 i 7.21 ppm. Rozróżnienie i przypisanie tych sygnałów do konkretnej grupy atomów wodoru możliwe było dzięki wykorzystaniu techniki ^1H - ^{13}C HMBC. Intensywny sygnał od atomów wodoru grupy metoksyowej pojawił się przy 3.94 ppm. Problemem okazało się znalezienie dwóch atomów wodoru grupy CH_2 pierścienia diazepinowego, ale ich położenie określono przy wartości 4.59 ppm, gdzie występował szeroki, rozmyty sygnał protonów geminalnych niewykazujący sprzężeń w widmie ^1H - ^{13}C HMBC z otaczającymi go jądrami węglowymi. Wykorzystując wyniki eksperymentu ^1H - ^{13}C HSQC możliwe było przyporządkowanie sygnałów jąder węglowych obserwowanych w widmie ^{13}C NMR do konkretnych atomów węgla.

4.3. Pirazynotribenzoporfirazy – synteza i charakterystyka fizykochemiczna

4.3.1. Pirazynotribenzoporfirazy z podstawnikami aryłowymi

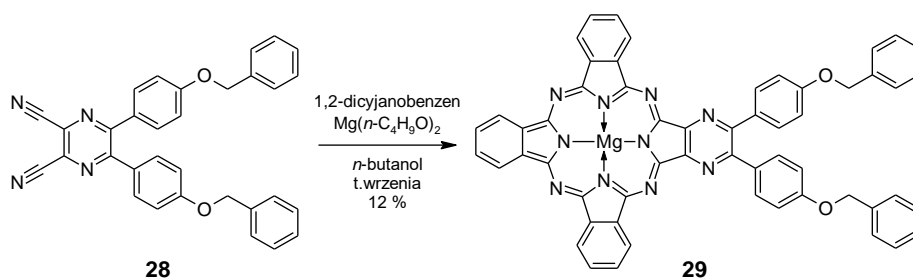
W kolejnym etapie, podjęto się otrzymania serii pochodnych tribenzoporfirazy pirazynowych wykorzystując jako substraty w reakcji makrocyclizacji dicyjanopirazyny otrzymane przez mgr. Adama Tillo [120]. W pierwszej reakcji ogrzewano **26** z nadmiarem 1,2-dicyjanobenzenu i *n*-butanolem magnezu we wrzącym *n*-butanolu przez 20 godzin, co doprowadziło do utworzenia spodziewanego produktu **27** (Schemat 17). Związek został wyizolowany z użyciem metod chromatograficznych, a następnie scharakteryzowany fizykochemicznie. Problemem preparatywnym, na który napotkano przy syntezie **27** okazała się jego niska rozpuszczalność w rozpuszczalnikach organicznych, a także strącanie się w formie osadu z roztworów DMSO pozostawionych w warunkach powietrza atmosferycznego (w tym z roztworów DMSO- d_6 w badaniach NMR).



Schemat 17. Synteza tribenzoporfirazy **27**.

W widmie ^1H NMR tribenzoporfirazy **27** zaobserwowano sygnały przy 9.38 i 8.24 ppm, odpowiadające sygnałom atomów wodoru benzenowych części tribenzoporfirazy. Charakterystyczne sygnały protonów pierścieni metoksyfenylowych przy 7.90 i 7.17 ppm

wystąpiły w formie multipletów – co może wynikać z agregacji makrocykla. Sygnał przy 3.95 ppm również nie pojawił się jako singlet, ale jako multiplet.



Schemat 18. Synteza tribenzoporfirazyny **29**.

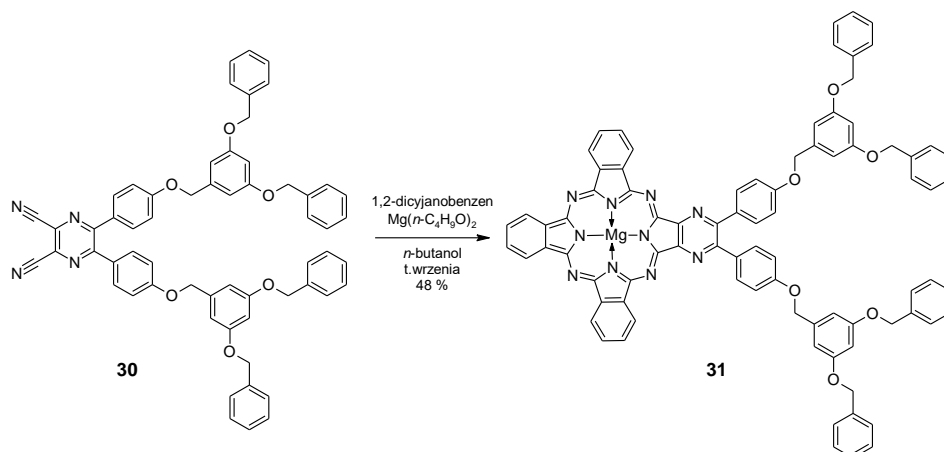
Kolejnym elementem badań było poddanie reakcji makrocyklizacji pochodnej maleonitryla **28**, analogu związku **26**, stosując identyczne jak dla **26** warunki reakcji (**Schemat 18**). Również w tym przypadku, tribenzoporfirazynę podstawioną jonem magnezu **29** wyizolowano z mieszaniny poreakcyjnej z użyciem metod chromatograficznych i poddano dalszym badaniom mającym na celu charakterystykę fizykochemiczną.

Widmo ¹H NMR **29** jest zbliżone do tego wcześniej omówionego dla związku **27**. W widmie odnotowano sygnały w zakresach 9.66-9.41 oraz 8.15-8.03 ppm pochodzące od benzenowych atomów wodoru części tribenzo. Charakterystyczne sygnały aromatycznych protonów *para*-podstawionego pierścienia fenyłowego pojawiły się przy 8.18 i 7.31 ppm. W widmie związku **29**, grupa alkilowa CH₂ benzylu występuje jako wyraźny sygnał przy 5.21 ppm. Integracja sygnałów aromatycznych protonów grupy benzylowej związku **29** jest dwukrotnie niższa dla pozycji 4- i odpowiada sygnałowi przy 7.38 ppm. Sygnały odpowiednio przy 7.59 i 7.46 ppm odpowiadają atomom wodoru pozycji 2- i 3-, do określenia czego niezwykle użyteczne było w tym przypadku także widmo korelacyjne ¹H-¹H COSY. Widma dwuwymiarowe (¹H-¹H COSY, ¹H-¹³C HSQC i ¹H-¹³C HMBC) pozwoliły na przypisanie sygnałów do odpowiadających im atomom węgla.

Ostatnim związkiem z tej serii była jeszcze bardziej rozbudowana w peryferium tribenzoporfirazyna **31**, którą zsyntezowano w takich samych warunkach, jak **27** i **29**. Wydajność reakcji obliczona dla wyizolowanego produktu wyniosła 48% (**Schemat 19**).

Wpływ na wysoką wydajność syntezy tribenzoporfirazyny **31** mogła mieć zastosowana metoda izolacji makrocykla i wynikająca z tego niska strata produktu w procesie oczyszczania z użyciem metod chromatograficznych. Zaobserwowano, że tribenzoporfirazyny tej serii zwiększały swoją rozpuszczalność w miarę rozbudowy w części peryferyjnej. Z uwagi na to, że zakładano zmniejszenie zdolności do agregacji makrocykli w miarę

rozbudowy peryferium, przeprowadzono ocenę agregacji tribenzoporfirazyń metodą UV-Vis przy wzrastających stężeniach (ocena liniowości wartości absorbancji od stężenia, **Ryc. 36**).

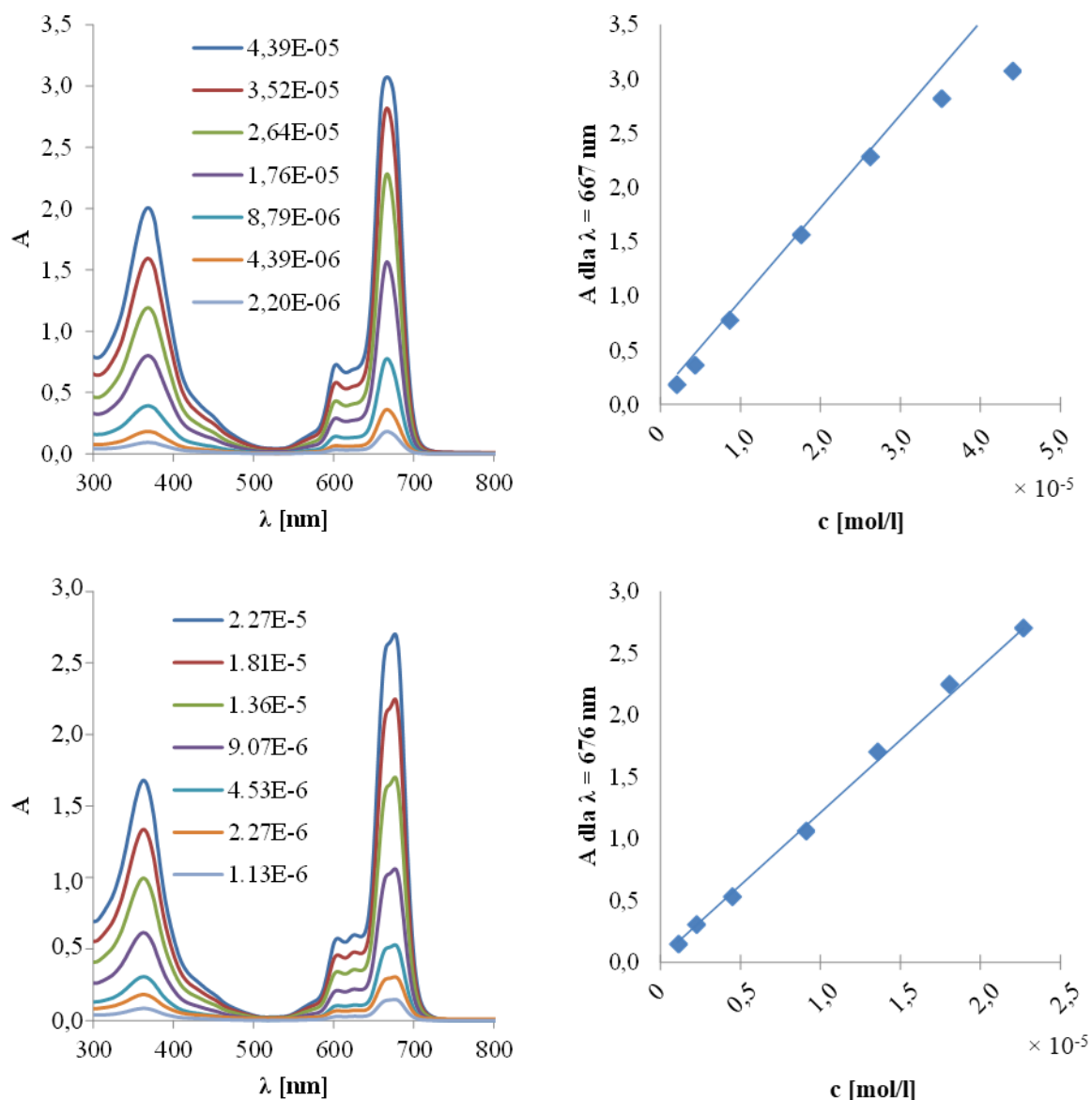


Schemat 19. Synteza tribenzoporfirazyń **31**.

Tribenzoporfirazyń z podstawnikami dendrymerycznymi **31** – najprawdopodobniej ze względu na bardzo dobrą rozpuszczalność i niską agregację – w widmach ^1H i ^{13}C NMR charakteryzowała się najostrzejszymi i najbardziej wyraźnymi sygnałami. Na podstawie analizy widma ^1H NMR niestety, ponownie jak w przypadku związków **27** i **29**, nie zdołano przypisać sygnałów konkretnym tribenzoporfirazyńowym atomom wodoru. Przypisanie sygnałów było możliwe dla dwóch grup sygnałów z zakresów 9.13-8.59 i 8.09-7.93 ppm. Ze względu na dużo bardziej rozbudowane peryferium, w widmie zaobserwowano więcej sygnałów aromatycznych niż napotkano wcześniej podczas badań mniej rozgałęzionych porfiryń. W tym przypadku charakterystyczne sygnały *para*-podstawionego fenylu pojawiły się przy 7.89 i 7.22 ppm. Sygnały generacji zerowej dendrymeru napotkano przy 6.81 ppm – dla pozycji 2 i 6 pierścienia fenylowego – oraz 6.69 ppm – dla atomu wodoru w pozycji 4. Sygnały terminalnych pierścieni fenylowych generacji pierwszej pojawiły się przy 7.35 ppm (pozycja 4), 7.41 ppm (pozycje 3 i 5) i 7.47 ppm (pozycje 2 i 6). Dzięki sprzężeniom w widmie ^1H - ^{13}C HMBC, a także dzięki bardzo wyraźnym sygnałom, możliwe było również rozróżnienie alifatycznych atomów wodoru cząsteczki – grup CH_2 . Potwierdzono, że sygnały przy 5.18 i 5.13 ppm odpowiadają alifatycznym atomom wodoru generacji odpowiednio zerowej i pierwszej dendrymeru.

Na załączonych wykresach można zauważyć tendencję w myśl której rozbudowa peryferium makrocykla – w tym przypadku o ugrupowanie dendrymeryczne – umożliwia utrzymanie liniowej zależności absorbancji od stężenia. Dzięki temu stwierdzono, że zahamowana jest agregacja makrocykla. Taki wpływ dendrymerów podstawionych

w peryferium makrocykla obserwowano już wcześniej [50]. Dodatkowo, spadek agregacji powinien wpływać na wzrost wartości generowania tlenu singletowego.



Ryc. 36. Ocena agregacji tribenzoporfirazy **27** (u góry) i **31** (na dole) w DMSO.

Po lewej znajdują się widma absorpcji porfirazy w różnych stężeniach (wartości legendy podane w mol/l), po prawej wykres zależności absorbancji od stężenia.

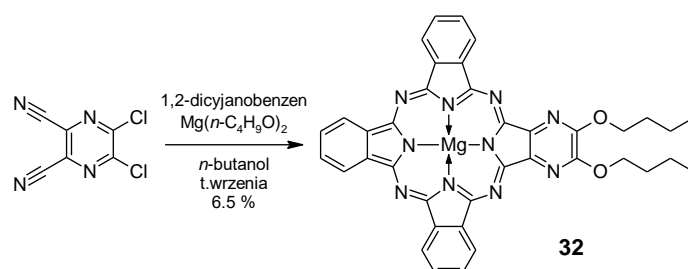
Seria trzech makrocykli pirazynowych **27**, **29** i **31** ze względu na podobną strukturę wykazuje zbliżone widma absorpcji UV-Vis. Związek **27** wykazuje maksima absorpcji w obrębie pasma B przy 368 nm, natomiast w obrębie pasma Q przy 667 i 603 nm. W przypadku **29** maksima te występują w zakresie pasma B przy 366 nm i jako trzy maksima w zakresie pasma Q przy 677, 626 i 604 nm. W widmie absorpcji UV-Vis dendrymerycznej

porfirazyny **31** maksima występują przy 363 nm w obrębie pasma B i przy 676, 626 oraz 604 nm w obrębie pasma Q.

Ze względu na niską rozpuszczalność **27**, podjęto próbę deprotekcji grup metoksyowych do hydroksyowych stosując procedurę wykorzystującą BBr_3 [121]. Do roztworu tribenzoporfirazyny **27** w dichlorometanie ochłodzonym do -75°C dodano BBr_3 i mieszano przez jedną godzinę. Mieszanie kontynuowano przez kolejne 12 godzin w temperaturze pokojowej. Niestety, w mieszaninie poreakcyjnej zidentyfikowano jedynie nieprzereagowany substrat.

4.3.2. Pirazynotribenzoporfirazyny z podstawnikami alkoksyłowymi

Wiedząc, że pochodne 2,3-dicyjanopirazyny podstawione halogenami w pozycjach 5 i 6 ulegają reakcji podstawienia grupami 1-alkoksyłowymi [122], jako substrat do reakcji tetrameryzacji zastosowano 5,6-dichloro-2,3-dicyjanopirazynę (związek wcześniej opublikowany [123]). Zakładano jednoczesne zachodzenie dwóch reakcji – wymiany atomów chloru i cyklotetrameryzacji (**Schemat 20**). W przypadku powodzenia tego podejścia syntetycznego, uzyskano by dostęp do lepiej rozpuszczalnych tripirazynoporfirazyn, przy krótkiej ścieżce syntetycznej.



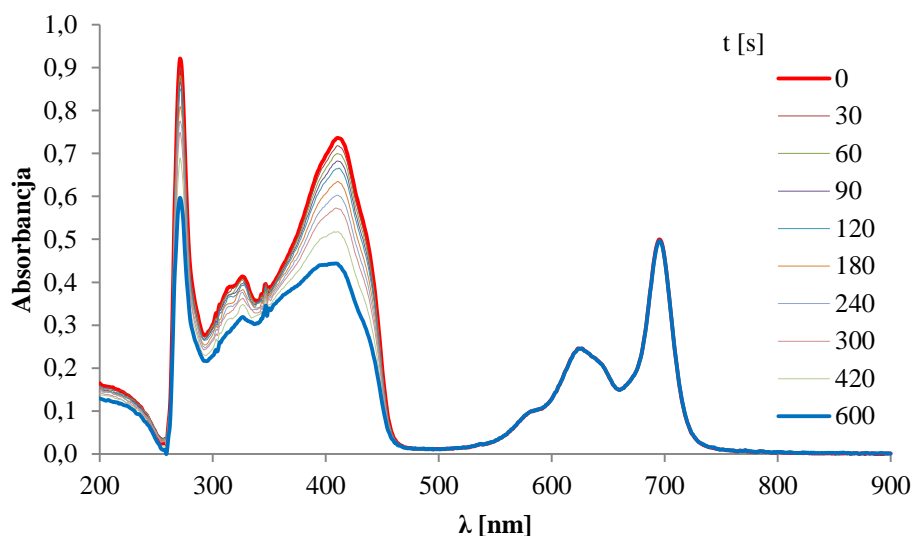
Schemat 20. Synteza związku **32**.

Założenia tej reakcji okazały się słuszne i otrzymano pochodną **32**, którą łatwo oddzielono od ubocznie powstającej MgPc i oczyszczono chromatograficznie. Problemem jednakże okazała się wydajność procesu wynosząca 6.5%. Jest to wartość zbyt niska, aby móc zaimplementować tę reakcję na szerszą skalę.

W widmie $^1\text{H NMR}$ **32** wszystkie sygnały aromatyczne – tj. przy 9.69, 9.60, 8.20, 8.13 i 8.04 ppm – przypisano do atomów wodoru pierścieni benzenowych. W widmie $^1\text{H NMR}$ zaobserwowano również sygnały, które odpowiadają atomom wodoru grup OCH_2 (5.05 ppm), OCH_2CH_2 (2.01 ppm), CH_2CH_3 (1.61 ppm) oraz CH_3 (0.97 ppm).

4.4. Badania fotochemiczne tribenzoporfirazyń – ocena generowania tlenu singletowego

Celem oceny możliwości zastosowania związków w dalszych badaniach biologicznych, wyznaczono wydajności kwantowe generowania tlenu singletowego. Parametr ten, związany z reakcją fotodynamiczną, jest uznawany za czynnik odpowiedzialny za pozytywny efekt PDT. Zdolność do generowania tlenu singletowego określono tak zwaną metodą pośrednią z wykorzystaniem 1,3-difenyloizobenzofuranu (DPBF), wykazującego absorpcję światła z maksimum przy 417 nm. DPBF charakteryzuje się tym, że reaguje ilościowo z tlenem singletowym, co jednocześnie powoduje zanik wspomnianego charakterystycznego pasma absorpcji (**Ryc. 37**). Dzięki temu, mierząc zmianę wartości absorbancji DPBF znajdującego się w naświetlanym roztworze razem z porfirazyną, możliwe jest obliczenie wydajności kwantowej generowania tlenu singletowego porfirazyny [124]. Jako odnośnik do przeprowadzanych badań zastosowano ftalocyjaninę cynkową o wysokiej wartości generowania tlenu singletowego 0.56 w DMF. Badania wykonano we współpracy z zespołem Pani prof. dr hab. Jadwigi Mielcarek z Katedry i Zakładu Chemii Nieorganicznej i Analitycznej Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu, których doktorant był czynnym współwykonawcą przy analizie części związków (**6**, **27**, **29**, **31**). Pozostałe wartości generowania tlenu singletowego zostały zebrane przez mgr Magdalenę Stolarską i dr. Łukasza Sobotta (**2**, **4**, **12**, **13**, **14**) oraz mgr Ewelinę Wieczorek i dr. Jarosława Piskorza (**25**).



Ryc. 37. Zmiany absorpcji obserwowane w widmie UV-Vis podczas naświetlania mieszaniny DPBF i **6** w roztworze DMF.

Badania zostały przeprowadzone dla tribenzoporfirazyń **2**, **4**, **6**, **12**, **13**, **14**, **25**, **27**, **29** i **31**, a uzyskane wyniki zebrano w **Tabeli 1**.

Tabela 1. Wartości generowania tlenu singletowego wybranych tribenzoporfirazyń w DMF.

Pz	$\Phi_{\Delta\text{DMF}}$
2	0.05
4	0.15
6	0.12
12	0.20
13	0.09
14	0.27*
25	0.07
27	0.22
29	0.10
31	0.09

*Błąd w tym przypadku wynosi 0.01. Dla pozostałych wartości błąd <0.01.

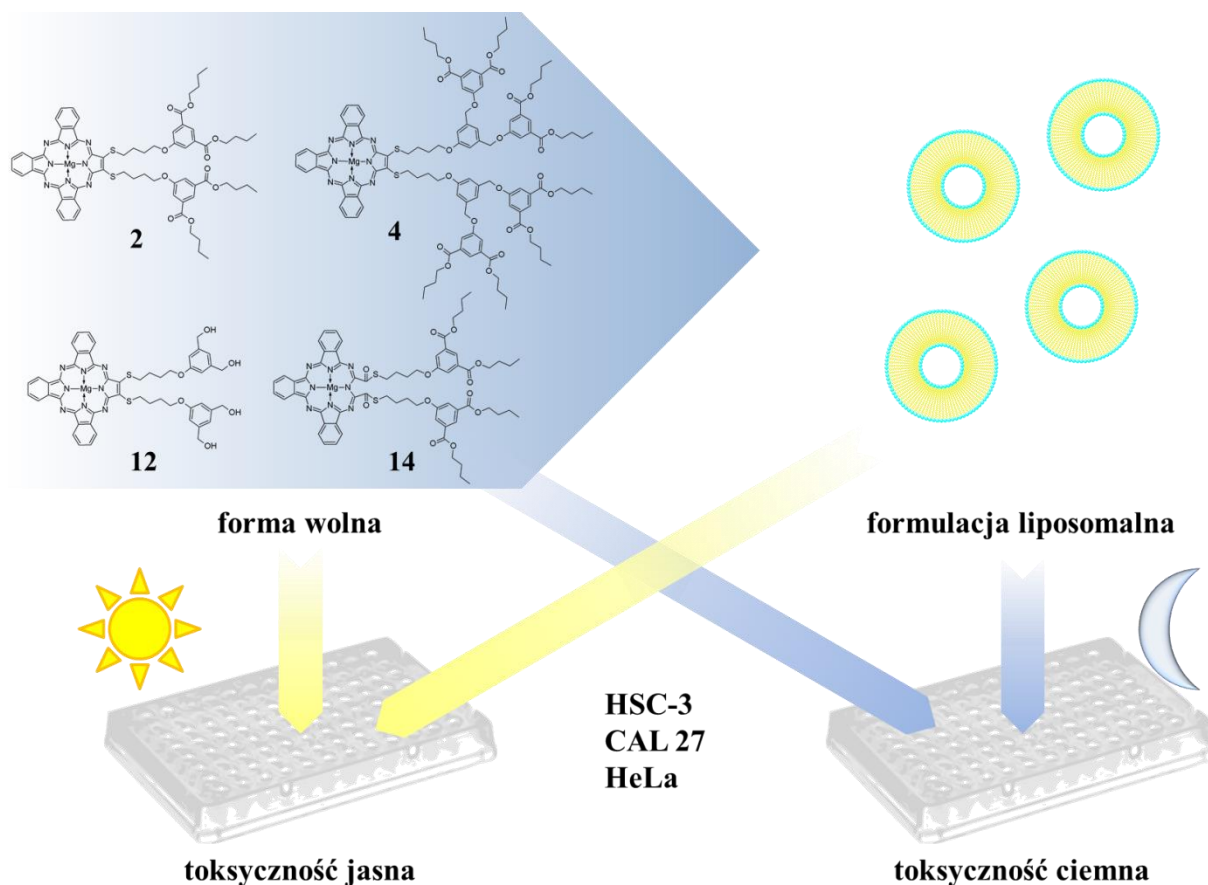
Warto zauważyć, że rozbudowa dendrymeru w peryferium tribenzoporfirazyń skutkowałą wzrostem wydajności kwantowej generowania tlenu singletowego w serii porfirazyń sulfanylowych – dla **2** i **13** wartości Φ_{Δ} wynoszą odpowiednio 0.05 i 0.09, dla **2** i **4** zaobserwowano trzykrotny wzrost Φ_{Δ} z 0.05 do 0.15. natomiast w przypadku tribenzoporfirazyń pirazyńowych zależność ta była odwrotna – wraz z rozbudową peryferium, zdolność do generowania tlenu singletowego malała. Efekt ten mógł być związany z prowadzeniem badań w DMF, który jest rozpuszczalnikiem zapobiegającym agregacji, lub różnicami w polarności podstawników dendrymerycznych. Warto dodać, że tribenzoporfirazyń siarkowe wykazywały wyższe wartości generowania tlenu niż ich odpowiedniki symetryczne typu A_4 [84,85,125]. Ponadto, warty podkreślenia jest wynik uzyskany dla związku **14**, który jest typowy dla *seco*-porfirazyń [104], u których obserwuje się gwałtowny wzrost generowania tlenu singletowego spowodowany oksydatywnym otwarciem pierścienia porfirazyńowego. W tym przypadku wzrost Φ_{Δ} był ponad pięciokrotny (0.05 dla **2** i 0.27 dla **14**). Warty uwagi jest fakt, że uzyskane wartości Φ_{Δ} dla **12** (0.20) i **14** (0.27) są bardzo wysokie w odniesieniu do literaturowych wartości generowania tlenu singletowego dla porfirazyń sulfanylowych [126].

Ze względu na wysokie wartości wydajności kwantowe generowania tlenu singletowego, a także potencjalnie związaną z tym wysoką fotocytotoksyczność w PDT oraz PACT, do oceny aktywności biologicznej wytypowano związki **4**, **6**, **12**, **14**, **27** oraz **31** (por. rozdział 4.5).

4.5. Ocena aktywności biologicznej *in vitro* wybranych pochodnych tribenzoporfirazy

4.5.1. Ocena fotocytotoksyczności względem linii komórek nowotworowych

Najbardziej obiecujące związki, charakteryzujące się najlepszymi właściwościami fizykochemicznymi i satysfakcjonującymi wydajnościami generowania tlenu singletowego zostały przekazane do badań fotocytotoksyczności *in vitro* na liniach komórkowych komórek nowotworowych.



Ryc. 38. Schematyczne przedstawienie oceny fotocytotoksyczności tribenzoporfirazy sulfanylowych **2**, **4**, **12** oraz **14**.

Tribenzoporfirazy siarkowe **2**, **4**, **12** i **14** przedstawione na **Ryc. 38** zostały przekazane dr. Jarosławowi Piskorzowi, który wraz z zespołem prof. Krystyny Konopki i prof. Nejata Düzgünesa, przebadał wymienione związki w kierunku aktywności fotodynamicznej skierowanej przeciwko komórkom nowotworowym linii komórkowych HSC-3 i CAL 27 (rak koleczystokórkowy jamy ustnej). Wartości IC_{50} uzyskane z tych badań zebrano w **Tabeli 2**.

Ze względu na fakt, że wszystkie badane tribenzoporfirazy są związkami nierozpuszczalnymi w wodzie, w badaniach zastosowano dodatek DMSO w ilości

nieprzekraczającej 0.1% jako solubilizatora. Celem wyeliminowania konieczności jego stosowania, dodatkowo przygotowano formułacje liposomalne tribenzoporfirazy. Związki przebadano na liniach komórkowych HSC-3 i CAL 27, a także na linii komórkowej HeLa (linia komórkowa komórek raka szyjki macicy). Poszczególne formułacje liposomalne były złożone z różnych lipidów zapewniając im różne ładunki elektryczne. Ostatecznie okazało się, że makrocykle wykazywały najwyższą aktywność po wbudowaniu w liposomy złożone z chlorku N-[1-(2,3-dioleoiloksy)propylo]-N,N,N-trimetyloamoniowego i 1-palmitoilo-2-oleilo-sn-glicero-3-fosfocholiny (DOTAP : POPC), obdarzone ładunkiem dodatnim. Dla tych najbardziej aktywnych liposomów wyznaczono wartości IC_{50} , pozwalające zobrazować ich aktywność fotodynamiczną (IC_{50} poszczególnych tribenzoporfirazy w nośnikach DOTAP : POPC zestawiono w Tabeli 3).

Tabela 2. Wartości IC_{50} uzyskane dla wolnych tribenzoporfirazy.

Pz	IC_{50} [$\mu\text{mol/l}$]	
	HSC-3	CAL 27
2	10.639	6.662
4	0.639	3.127
12	0.042	0.010
14	0.182	0.607

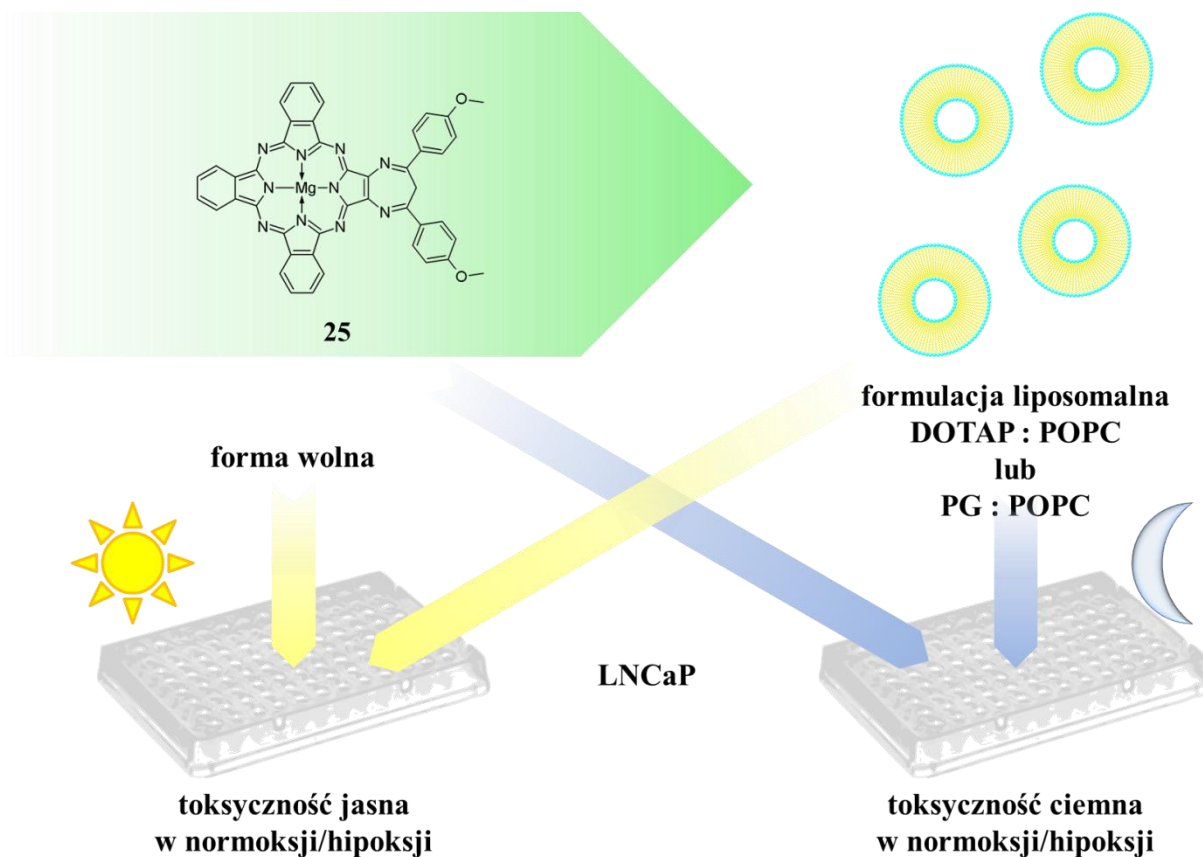
p < 0.001

Tabela 3. Wartości IC_{50} uzyskane dla tribenzoporfirazy w liposomach DOTAP : POPC.

Pz	IC_{50} [$\mu\text{mol/l}$]		
	HSC-3	CAL 27	HeLa
2	0.19	0.26	0.29
4	1.82	1.08	5.06
12	0.013	0.007	0.042
14	0.235	0.192	0.166

W powyżej przedstawionych tabelach można zauważyć wyraźnie nanomolową wysoką aktywność tribenzoporfirazy **12**, zarówno w stanie wolnym, jak i po wbudowaniu w liposomy. Warty uwagi jest fakt, iż wartości IC_{50} obliczone dla wolnych tribenzoporfirazy wskazują na bardzo wysoką aktywność tej tribenzoporfirazy już w stężeniach 42 i 10 nmol/l względem odpowiednio HSC-3 i CAL 27. Aktywność ta dodatkowo wzrastała po zastosowaniu nośnika liposomalnego DOTAP : POPC (13, 7 i 42 nmol/l względem odpowiednio HSC-3, CAL 27 i HeLa). Porównując aktywności **2** i **4**, analogów podstawionych dendrymerem G0 i G1, możemy zaobserwować wyższą aktywność tribenzoporfirazy G1 w stanie wolnym (IC_{50} dla **2** wynosi 10.639 i 6.662 $\mu\text{mol/l}$ względem

odpowiednio HSC-3 i CAL 27, IC_{50} dla **4**: 0.639 i 3.127 $\mu\text{mol/l}$ względem odpowiednio HSC-3 i CAL 27). Zależność ta jest odwrotna po wbudowaniu obu tribenzoporfirazy w liposomy – pochodna **2** posiadająca ugrupowanie G0 wykazuje wyższą aktywność od tribenzoporfirazy **4** podstawionej dendrymerem G1. Dodatkowo, zastosowanie formulacji liposomalnej dla **4** powoduje spadek aktywności względem linii komórkowej HSC-3 (IC_{50} równe 0.639 $\mu\text{mol/l}$ dla formy wolnej oraz 1.82 $\mu\text{mol/l}$ dla **4** w liposomach). Przyczyną tego zjawiska jest najprawdopodobniej wzrost ogólnej wielkości cząsteczki, co może sprawić, że utrudnione jest inkorporowanie jej w lipofilowych błonach liposomów. Bardzo wysoka aktywność związku **12** na poziomie nanomolowym sprawiła, że został on wyselekcjonowany do dalszych wielośrodkowych badań porównawczych dużej grupy ftalocyjanin w grupie Docenta Petra Zimčička z Wydziału Farmaceutycznego w Hradec Králové Uniwersytetu Karola w Pradze.



Ryc. 39. Schematyczne przedstawienie oceny fotocytotoksyczności tribenzoporfirazy diazepinowej **25**.

Tribenzoporfirazynę diazepinową **25** przekazano mgr. Ewelinie Wieczorek, która podjęła się przygotowania formulacji liposomalnych tribenzoporfirazy (DOTAP : POPC oraz PG : POPC, PG – fosfatydylo-DL-glicerol). Następnie, związek wolny i zamknięty w liposomach został przebadany przez dr Małgorzatę Kucińską z zespołu badawczego prof.

dr. hab. Marka Muriasa w Katedrze i Zakładzie Toksykologii UMP, gdzie aktywność fotodynamiczną **25** oceniono względem linii komórek nowotworowych LNCaP (ludzki nowotwór prostaty) (**Ryc. 39**). Badania te zostały dodatkowo poszerzone o ocenę fotocytotoksyczności **25** w warunkach hipoksji i porównanie ich z wynikami uzyskanymi dla normoksji (**Tabela 4**).

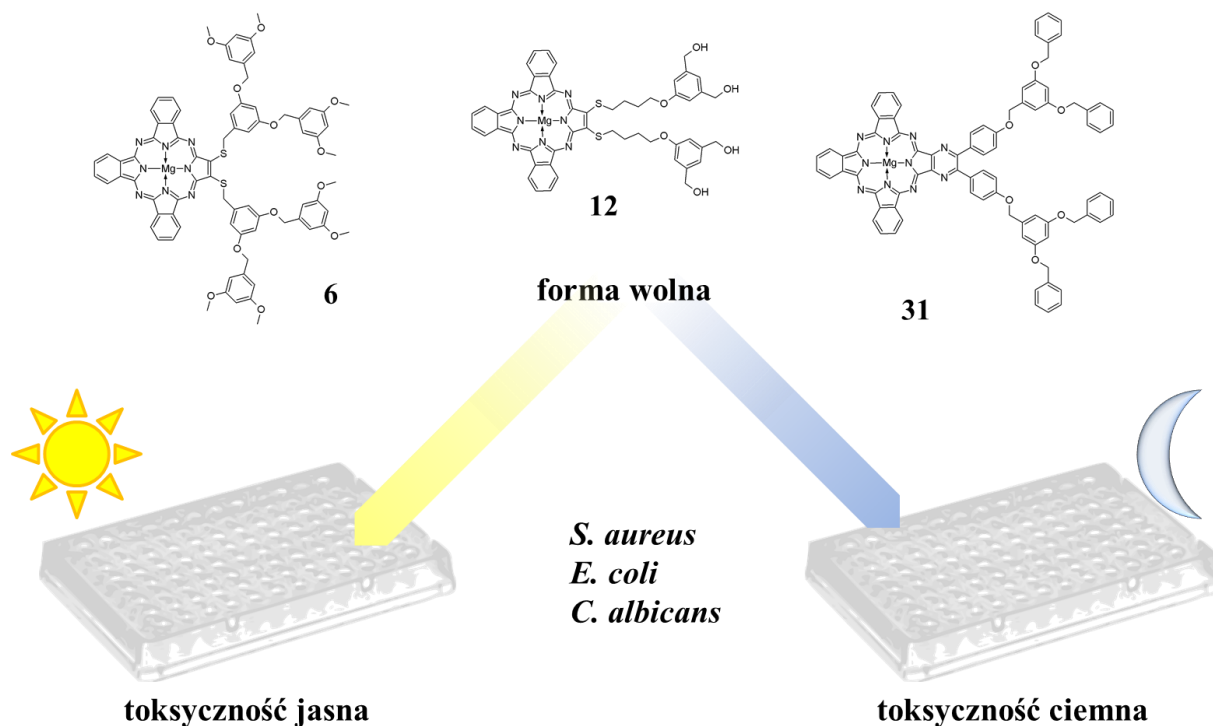
Tabela 4. Wartości IC_{50} uzyskane dla **25** podczas oceny fotocytotoksyczności względem komórek linii LNCaP.

Pz	IC_{50} [$\mu\text{mol/l}$]			
	Normoksja		Hipoksja	
	0 J/cm^2	2 J/cm^2	0 J/cm^2	2 J/cm^2
25	>10	0.814 \pm 0.466	>10	3.135 \pm 0.156
25 +DOTAP : POPC	>1.2	0.161 \pm 0.002	>1.2	0.600 \pm 0.357
25 +PG : POPC	>1.2	0.166 \pm 0.058	>1.2	0.378 \pm 0.182

Badania uwidoczniły wysoką fotocytotoksyczność tribenzoporfirazy **25** względem analizowanej linii komórkowej przy jednoczesnym braku toksyczności bez naświetlania. W warunkach normoksji, obliczona wartość IC_{50} wyniosła 0.814 $\mu\text{mol/l}$. Zastosowanie formułacji liposomalnych wiązało się ze wzrostem fotocytotoksyczności związku **25** (IC_{50} wyniosło 0.161 i 0.166 $\mu\text{mol/l}$ dla liposomów o składzie odpowiednio DOTAP : POPC i PG : POPC). Badania przeprowadzone w kierunku oceny fotocytotoksyczności porfirazy **25** w warunkach indukowanej hipoksji wykazały spadek aktywności **25** (IC_{50} uzyskane dla wolnej **25** w warunkach hipoksji było równe 3.135 $\mu\text{mol/l}$). Poprzez inkorporację tribenzoporfirazy **25** do liposomów DOTAP : POPC i PG : POPC możliwe było zwiększenie aktywności (IC_{50} równe odpowiednio 0.600 i 0.378 $\mu\text{mol/l}$), jednak nie do wartości uzyskanych w warunkach normoksji.

4.5.2. Ocena fotocytotoksyczności względem mikroorganizmów chorobotwórczych

Związki **6**, **12** i **31** poddano ocenie fotocytotoksyczności przeciwko drobnoustrojom (**Ryc. 40**). Badania te wykonano we współpracy z dr Jolantą Długaszewską z Katedry i Zakładu Genetyki i Mikrobiologii Farmaceutycznej Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu, których doktorant był czynnym współwykonawcą. Jako cele badań wybrano wzorcowe szczepy przedstawicieli bakterii Gram dodatnich (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923), Gram ujemnych (*Escherichia coli* ATCC 25922) oraz chorobotwórczych grzybów (*Candida albicans* ATCC 10231).



Ryc. 40. Schematyczne przedstawienie oceny fotocytotoksyczności związków **6**, **12** i **31** w PACT.

Tabela 5. Redukcja ilości bakterii planktonicznych *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922 i grzybiczych *C. albicans* ATCC 10231 pod wpływem naświetlania w obecności tribenzoporfirazy o odpowiednim stężeniu.

Stężenie Pz [mol/l]	log redukcji			
	<i>S. aureus</i> ATCC25923	<i>E. coli</i> ATCC25922	<i>C. albicans</i> ATCC 10231	
6	10^{-4}	5.771	0.106	-0.113
	10^{-5}	4.657	-0.014	0.020
	10^{-6}	3.166	–	–
31	10^{-4}	1.872	0.128	0.012
	10^{-5}	-0.692	0.494	-0.053
	10^{-6}	0.682	–	–
12	10^{-4}	–	0.541	0.468
	10^{-5}	–	0.023	-0.046
	10^{-6}	5.911	–	–
	10^{-7}	3.933	–	–
Kontrola	-0.148	-0.154	-0.051	

Przedstawione wartości są średnią dwóch niezależnych eksperymentów.

Odpowiednie stężenie tribenzoporfirazy w roztworze PBS, (buforowany roztwór soli fizjologicznej – ang. *phosphate buffered saline*) z dodatkiem DMSO jako solubilizatora (jednak w ilości nie większej niż 0.5% (m/m)), dodawano każdorazowo do zawiesiny drobnoustroju. Tak sporządzane hodowle inkubowano przez 15 minut, po czym naświetlano światłem monochromatycznym o fali długości 660 nm przez 20 minut (moc zmierzona 3 mW/cm²). Następnie wykonywano odpowiednie posiewy, a po dwóch dniach inkubacji zliczano obecne kolonie bakteryjne lub grzybicze. Obliczony wynik porównywano z próbami kontrolnymi (hodowla z fotosensybilizatorem nienaświetlana i hodowla naświetlana, lecz bez fotosensybilizatora) i próbą ślepą (hodowla bez fotosensybilizatora nienaświetlana). Redukcję jednostek tworzących kolonie (CFU, ang. *colony forming units*) podano w logarytmach dziesiętnych w **Tabeli 5**.

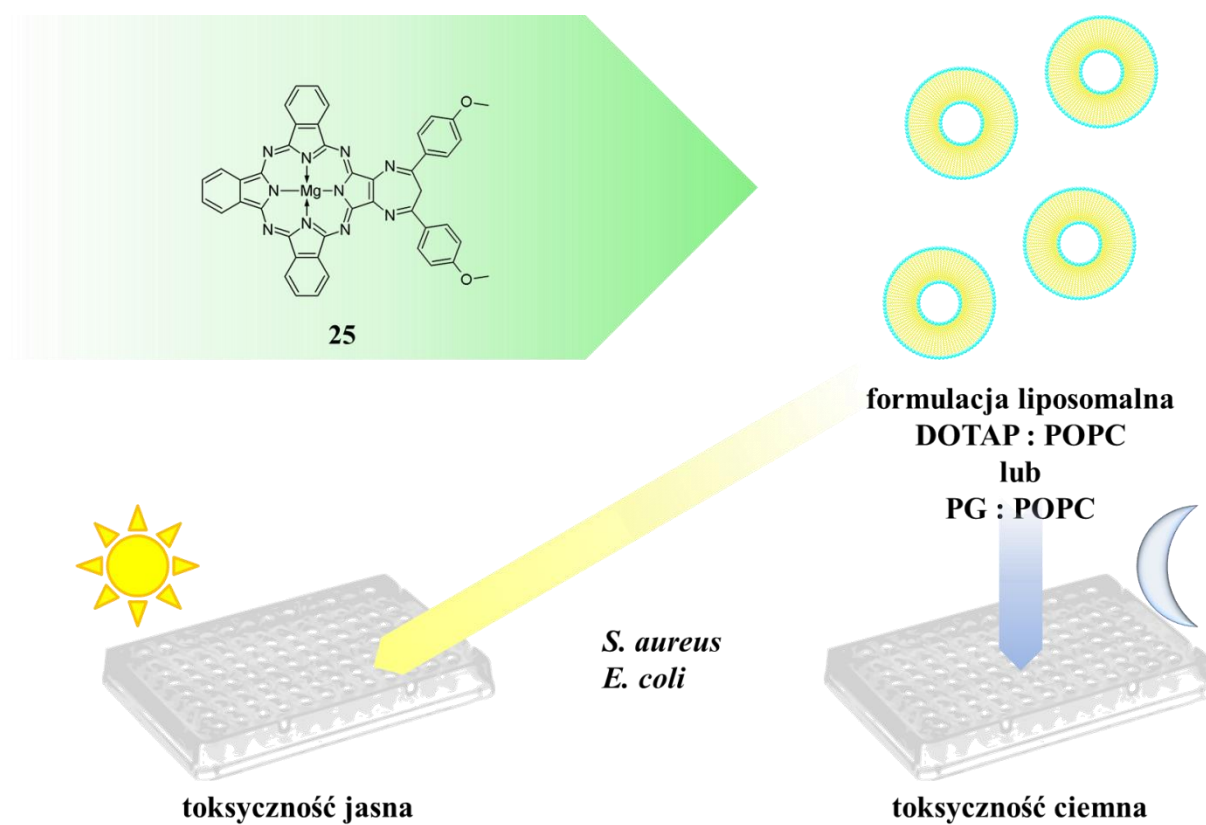
Najlepsze wyniki, o najwyższym log redukcji ilości drobnoustrojów, uzyskano dla tribenzoporfirazyn **6** i **12** przy ocenie ich aktywności przeciwko *S. aureus*. Warto podkreślić, że logarytm redukcji rzędu 3 jest wymagany dla antybiotyków [127], natomiast rzędu 4 dla środków dezynfekcyjnych [128], zatem badane tribenzoporfirazy są związkami silnie działającymi. W przypadku oceny aktywności względem *S. aureus* zauważono słabsze działanie **31**, poniżej log redukcji 2. Niskie wartości redukcji dla *E. coli* i *C. albicans*, poniżej 1, świadczą o niskiej fotocytotoksyczności wszystkich badanych tribenzoporfirazyn względem tych mikroorganizmów. Związane jest to najprawdopodobniej z różnicami w budowie ściany komórkowej między drobnoustrojami i łatwiejszym wnikaniem fotosensybilizatorów do komórek bakterii Gram dodatnich, aniżeli Gram ujemnych i grzybów.

Podobne eksperymenty zostały wykonane przez mgr Ewelinę Wieczorek dla porfirazy **25** po wbudowaniu w liposomy (**Ryc. 41**). Zestawienie wyników tych badań przedstawiono w **Tabeli 6**.

Tabela 6. Wyniki aktywności przeciwdrobnoustrojowej **25** w warunkach terapii fotodynamicznej.

Szczep bakterii	log redukcji				
	kontrola	25 + DOTAP : POPC [mol/l]		25 + PG : POPC [mol/l]	
		5×10^{-5}	1×10^{-5}	5×10^{-5}	1×10^{-5}
<i>S. aureus</i> ATCC25923	0.25	2.07	0.48	0.45	0.86
<i>E. coli</i> ATCC25922	-0.06	0.10	–	0.21	–

Przedstawione wartości są średnią dwóch niezależnych eksperymentów.



Ryc. 41. Schematyczne przedstawienie oceny fotocytotoksyczności związku **25** w PACT.

5. Podsumowanie i wnioski

W części literaturowej pracy doktorskiej podsumowano dotychczasowy stan wiedzy o aza-porfirynoidach, ze szczególnym uwzględnieniem tribenzoporfirazyn, możliwości ich zastosowania w terapii fotodynamicznej oraz w terapii fotodynamicznej skierowanej przeciw mikroorganizmom. Zestawiono również możliwości funkcjonalizacji dendrymerów oraz ich wykorzystania w terapii przeciwnowotworowej i skierowanej przeciwko drobnoustrojom. Dokonano także przeglądu kluczowej wiedzy na temat PDT i PACT, w tym współcześnie stosowanych fotosensybilizatorów i możliwych kierunków rozwoju terapii fotodynamicznej.

Część eksperymentalna pracy zawiera opis wykonanych eksperymentów i badań tribenzoporfirazyn. Została podzielona na część syntetyczną, ocenę generowania tlenu singletowego i ocenę aktywności fotodynamicznej *in vitro* wykonaną dla najbardziej obiecujących porfirynoidów względem wybranych linii komórek nowotworowych, a także względem niektórych drobnoustrojów. Najważniejsze wyniki tych badań są następujące:

1. Przeprowadzono syntezę serii tribenzoporfirazyn siarkowych (**2**, **4**, **6**) o różnym stopniu rozbudowania podstawników peryferyjnych (odpowiednio dendrymer G0, G1 i G1), posiadających w centrum koordynacyjnym pierścienia jon magnezu(II). Związki te zostały scharakteryzowane fizykochemicznie z wykorzystaniem technik NMR, UV-Vis, MS.
2. Przeprowadzono syntezę serii tribenzoporfirazyn posiadających w strukturze pierścienia pirazyny (**27**, **29**, **31**), będących analogami podstawionymi różnymi generacjami tego samego dendrymeru (kolejno G-0.5, G0, G1) oraz otrzymano tribenzoporfirazynę pirazynową **32**. Związki te zostały scharakteryzowane fizykochemicznie z wykorzystaniem technik UV-Vis, MS i NMR. Wykazano, że rozbudowa dendrymeru sprzyja wzrostowi rozpuszczalności i ograniczeniu agregacji badanych tribenzoporfirazyn.
3. Przeprowadzono syntezę i wyizolowano pochodną tribenzoporfirazyny **25** posiadającą w strukturze pierścienia 1,4-diazepiny podstawiony grupami 4-metoksyfenylowymi. Budowa chemiczna związku **25** została oceniona metodami UV-Vis, MS i NMR.
4. Zmodyfikowano część peryferyjną tribenzoporfirazyny **2** uzyskując nową pochodną **12** o wyższej polarności. Rozbudowując peryferium związku **12** uzyskano tribenzoporfirazynę podstawioną ugrupowaniem *pseudo*-dendrymeru G1 **13**.

-
5. Makrocykl **2** poddano modyfikacjom w obrębie pierścienia makrocyklicznego, uzyskując pochodną **11** poprzez usunięcie jonu metalu z centrum koordynacyjnego pierścienia porfirazyny oraz **14** przez oksydacyjne otwarcie pierścienia makrocyklicznego do *seco*-porfirazyny. Oba związki poddano charakterystyce fizykochemicznej.
 6. Oceniono zdolność generowania tlenu singletowego przez makrocykle, które wykazały najlepsze właściwości fizykochemiczne (właściwości UV-Vis, rozpuszczalność): **2**, **4**, **12**, **13**, **14**, **25**, **27**, **29** i **31**. Wartości generowania tlenu singletowego oceniono wykorzystując metodę pośrednią z użyciem DPBF, z zastosowaniem ftalocyjaniny cynku(II) jako związku referencyjnego.
 7. Tribenzoporfirazyny **2**, **4**, **12** i **14** poddano ocenie działania na liniach komórek nowotworowych HSC-3 i CAL 27 oraz w formułacjach liposomalnych na liniach komórek nowotworowych HSC-3, CAL 27 i HeLa. Porfirazyny **2**, **4** i **14** wykazywały umiarkowaną aktywność fotodynamiczną, natomiast bardzo wysoka aktywność w stężeniu nanomolowym została odnotowana dla **12** zarówno wolnej, jak i po wbudowaniu w nośnik liposomalny. Spośród różnych typów liposomów, najbardziej aktywne okazały się liposomy o składzie DOTAP : POPC. Diazepinotribenzoporfirazynę **25** poddano ocenie działania na komórki nowotworowe linii komórkowych LNCaP w formie wolnej, jak i po wbudowaniu w liposomy. Związek **25** wykazywał umiarkowaną aktywność jako substancja, wzrost aktywności obserwowano po zastosowaniu formułacji liposomalnej. Dodatkowe badania fotocytotoksyczności przeprowadzono w warunkach symulowanej hipoksji. Stwierdzono, że **25** zachowywała nadal aktywność w warunkach hipoksji.
 8. Tribenzoporfirazyny **6**, **12** i **31** poddano ocenie fotocytotoksyczności na drobnoustrojach: *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922 i *C. albicans* ATCC 10231. Związek **12** wykazywał najwyższą aktywność przeciwko *S. aureus* (log redukcji uzyskany dla tej Pz wyniósł 5.9). Podobną wysoką aktywność względem *S. aureus* zaobserwowano dla **6** (log redukcji wyniósł 5.7). Żadna z tribenzoporfirazyn nie wykazała znaczącej aktywności przeciwko *E. coli* ani *C. albicans*.
Diazepinotribenzoporfirazynę **25** oceniono pod kątem potencjalnego zastosowania w PACT na szczepach *S. aureus* ATCC 25923 i *E. coli* ATCC 25922. Tym razem badania były ograniczone jedynie do formułacji liposomalnych. Związek **25**
-

wykazał jedynie umiarkowaną skuteczność przeciwko *S. aureus* po inkorporacji w liposomach typu DOTAP : POPC, osiągając redukcję ilości bakterii na poziomie log 2.

Na podstawie uzyskanych wyników opisanych w poprzednim rozdziale i zebranych w punktach powyżej, można wysunąć następujące wnioski:

1. Metodami syntezy chemicznej, poprzez reakcję cyklotetrameryzacji odpowiednich pochodnych maleonitrylowych, możliwe jest uzyskanie tribenzoporfirazyn siarkowych (**2**, **4**, **6**), diazepinoporfirazyny (**25**), a także pirazynoporfirazyn (**27**, **29**, **31**, **32**).
2. Na drodze modyfikacji peryferium makrocykla **2**, możliwe jest uzyskanie pochodnych tej tribenzoporfirazyny (**12** i **13**). W warunkach utleniających możliwa jest zmiana struktury chemicznej w obrębie pierścienia tribenzoporfirazyny **2**, prowadząca do wcześniej nie odnotowanej w literaturze S-*seco* porfirazyny **14**.
3. Dla uzyskanych związków możliwe jest przeprowadzenie kompleksowej charakterystyki fizykochemicznej z wykorzystaniem technik NMR (jedno- i dwuwymiarowych), UV-Vis, spektrometrii mas. Natomiast trudności w ocenie fizykochemicznej najczęściej pojawiają się podczas charakterystyki NMR i wynikają ze zjawiska agregacji płaskich, aromatycznych pierścieni makrocyklicznych (**6**, **14**).
4. Rozbudowa części peryferyjnej tribenzoporfirazyn poprawia ich rozpuszczalność, jak również ogranicza agregację. Dodatkowo, analogi z grupami dendrymerycznymi G1 zwykle wykazują wyższe wartości generowania tlenu singletowego od pochodnych G0. Zależność ta okazała się odwrotna przy rozbudowie dendrymeru z grupami benzoksybenzylowymi w części peryferyjnej pirazynotribenzoporfirazyny, kiedy to zaobserwowano spadek wartości generowania tlenu singletowego.
5. Aktywność badanych tribenzoporfirazyn w terapii fotodynamicznej jest zależna od wartości generowania tlenu singletowego, jednak nie jest to zależność liniowa. Fotocytotoksyczność tribenzoporfirazyn sulfanylowych wobec linii komórkowych HSC-3 i CAL 27 można uszeregować malejąco w następującym szeregu: **12** (IC₅₀ dla HSC-3 i CAL 27 wynoszą odpowiednio 0.042 i 0.010 μmol/l) > **14** (0.182 i 0.607 μmol/l) > **4** (0.639 i 3.127 μmol/l) > **2** (10.639 i 6.662 μmol/l). Diazepinoporfirazyna **25** z peryferyjnymi ugrupowaniami metoksyfenylowymi wykazała się fotocytotoksycznością względem komórek nowotworowych linii

komórkowej LNCaP, z najwyższą aktywnością w formulacji liposomalnej PG : POPC (wartości IC_{50} : 0.166 μ mol/l w warunkach normoksji i 0.378 μ mol/l w warunkach hipoksji).

6. W ocenie aktywności fotodynamicznej skierowanej przeciwko drobnoustrojom najwyższą aktywność wykazywały tribenzoporfirazyny **6** i **12** względem *S. aureus* (wyznaczone log redukcji odpowiednio 5.771 i 5.911). Żadna z analizowanych tribenzoporfirazyn nie wykazywała znaczącej aktywności względem *E. coli* ani *C. albicans*, czego przyczyną może być inna budowa ściany komórkowej tych drobnoustrojów i przez to utrudnione wnikanie makrocykli do ich wnętrza.
7. Stwierdzono, że liposomy jako nośniki tribenzoporfirazyn stanowią użyteczną formulację do badań aktywności fotodynamicznej i pozwalają na uzyskanie stabilnej postaci rozpuszczalnej w roztworach wodnych i buforach. W zależności od zastosowanego składu, liposomy mogą zwiększać lub zmniejszać fotocytotoksyczność badanych fotosensybilizatorów. Liposomami zapewniającymi wzrost aktywności przeciwnowotworowej dla wszystkich badanych tribenzoporfirazyn okazały się liposomy typu obdarzone ładunkiem dodatnim DOTAP : POPC.

6. Część doświadczalna

6.1. Ogólne procedury

Wszystkie reakcje zostały przeprowadzane w: (i) kolbach wygrzanych przed reakcją w temperaturze 140°C przez 2-4 godziny, (ii) w atmosferze gazu obojętnego (o ile nie wspomniano inaczej), (iii) wykorzystując do mieszania i ewentualnego ogrzewania bloki grzejne Radleys Heat-On. Rozpuszczalniki i reagenty otrzymane od dostawców (Merck, Alfa Aesar, TCI) były stosowane w reakcjach bez oczyszczania. Destylacja pod zmniejszonym ciśnieniem prowadzono w temperaturze nieprzekraczającej 50°C. Chromatografię preparatywną kolumnową wykonywano metodą krótkiej kolumny z wykorzystaniem fazy stałej: żel krzemionkowy *Merck silica gel 60*, rozmiar cząstek 40 - 63 μm ; żel krzemionkowy do odwróconej fazy *Fluka C18 silica gel 90*; lub tlenek glinu *aluminium oxide 90 active neutral (activity stage I) for column chromatography*, o wielkości cząstek 0.063-0.200 mm z firmy *EMD Millipore*. Chromatografię cienkowarstwową wykonano techniką wstępującą na płytkach TLC *Merck Kieselgel 60 F₂₅₄* oraz *Merck Kieselgel RP-18 60 F_{254S}* z wykorzystaniem światła UV do wizualizacji rozdziału (λ_{max} 254 lub 365 nm). Chromatografię preparatywną na płycie wykonywano przy użyciu płytek szklanych z żelem krzemionkowym F254 typ 60 firmy E. Merck o grubości warstwy żelu 0.5 lub 0.2 mm oraz na płytkach TLC *Merck Kieselgel 60 F₂₅₄*. Składy faz ruchomych podano w stosunkach objętościowych (v/v). Widma UV-Vis zarejestrowano na spektrofotometrach *Hitachi UV/VIS U-1900* lub *Shimadzu PC-160*. Widma ^1H NMR i ^{13}C NMR rejestrowano na aparacie *Agilent DD2 800* w temperaturze 298 K, jeśli nie wspomniano inaczej. Wartości przesunięć chemicznych (δ) podano w częściach na milion (ppm), wobec sygnałów reszkowych stosowanego rozpuszczalnika (pirydyna-*d*₅: δ_{H} = 8.74, 7.58, 7.22 ppm, δ_{C} = 150.35, 135.91, 123.87 ppm; DMSO-*d*₆: δ_{H} = 2.50 ppm, δ_{C} = 39.5 ppm). Stałe sprzężenia (*J*) wyrażono w hercach (Hz). Dla opisu multipletowości sygnałów zastosowano następujące skróty: s, bs, d, dd, t, m oznaczające odpowiednio singlet, szeroki singlet, dublet, dublet dubletów, triplet, multiplet. Techniki dwuwymiarowe (^1H - ^1H COSY, ^1H - ^{13}C HSQC i ^1H - ^{13}C HMBC) zastosowano w celu przypisania wartości przesunięć chemicznych odpowiednim atomom wodoru i węgla. Widma spektrometrii mas (MALDI TOF) zarejestrowano w Wielkopolskim Centrum Zaawansowanych Technologii przy Uniwersytecie im. Adama Mickiewicza w Poznaniu z użyciem spektrometru UltrafleXtreme (Bruker) w zakresie *m/z* = 650-3000 w trybie odbiciowym z matrycą DHB. Pomiary temperatury topnienia (T.t.) wykonano na aparacie *Stuart* firmy *Bibby Sterlin Ltd.*, przy użyciu otwartych kapilar; otrzymane wyniki podano bez korekty.

6.2. Stosowane odczynniki i rozpuszczalniki

1,2-dicyjanobenzen – *o*-ftalonitryl (*Aldrich* - obecnie *Merck*)
1,3-difenyloizobenzofuran (DPBF) (*Aldrich* - obecnie *Merck*)
1,8-diazabicyklo[5.4.0]undec-7-en (*Alfa Aesar, Aldrich* - obecnie *Merck*)
2-bromopropan (*Sigma-Aldrich* - obecnie *Merck*)
borowodorek sodu (*Tokyo Chemical Industry*)
bromek 4-bromobenzylu (*Sigma-Aldrich* - obecnie *Merck, Tokyo Chemical Industry*)
chlorek amonu (*POCH*)
chlorek glinu(III) (*POCH*)
chlorek wapnia(II) (*POCH*)
diaminomaleonitryl (*Aldrich* - obecnie *Merck*)
dichlorometan (*POCH, Chempur*)
dimetylosulfotlenek (DMSO) (*Sigma-Aldrich* - obecnie *Merck*)
ester etylowy kwasu azodikarboksyłowego (*Tokyo Chemical Industry*)
etanol (*POCH*)
glinowodorek litu (*Tokyo Chemical Industry*)
heksan frakcja z nafty (*POCH*)
jod (*POCH*)
kwas trifluorooctowy (*Tokyo Chemical Industry*)
magnez – w postaci wiórków (*Sigma-Aldrich* - obecnie *Merck*)
manganian(VII) potasu (*POCH*)
metanol (*POCH*)
N,N-dimetyloaminoetanol (DMAE) (*Aldrich* - obecnie *Merck*)
N,N-dimetyloformamid (*Tokyo Chemical Industry*)
n-butanol (*Sigma-Aldrich, Tokyo Chemical Industry*)
n-pentanol (*Sigma* - obecnie *Merck*)
octan cynku(II) (*Aldrich* - obecnie *Merck*)
octan etylu (*Chempur*)
pirydyna (*POCH*)
siarczan magnezu(II) bezwodny (*POCH*)
sól disodowa dimerkaptomaleonitryla (*Tokyo Chemical Industry*)
tetrahydrofuran (*POCH*)
tlenek manganu(IV) (*Tokyo Chemical Industries*)
tribromek boru (*Sigma-Aldrich* - obecnie *Merck*)

trietyloamina (POCH)
 trifenylofosfina (Tokyo Chemical Industry)
 węglan cezu (Alfa-Aesar)
 węglan potasu (POCH)
 wodorotlenek litu (Sigma-Aldrich - obecnie Merck)
 wodorowęglan sodu (POCH)
 wodzian hydrazyny (Tokyo Chemical Industry)

6.3. Synteza chemiczna

Wszystkie reakcje cyklotetrameryzacji pochodnych maleo- oraz *o*-ftalonitryli zostały przeprowadzone tą samą metodą. Odpowiednią pochodną maleonitryla (1 ekwiwalent) oraz 1,2-dicyjanobenzen (10 ekwiwalentów) dodawano do roztworu *n*-butanolanu magnezu w *n*-butanolu, uprzednio przygotowanego przez ogrzewanie metalicznego magnezu (5.5 ekwiwalenta) we wrzącym *n*-butanolu przez około 3 godziny (7 ml na 1 mmol użytych pochodnych maleonitrylowych i *o*-ftalonitryla). Mieszaninę reakcyjną ogrzewano w temperaturze wrzenia *n*-butanolu przez 20 godzin. Następnie mieszaninę reakcyjną sączono przez ziemię okrzemkową, a przemywano toluenem. Połączone przesącze odparowywano pod zmniejszonym ciśnieniem, a stałą pozostałość (osad, olej, film) poddawano oczyszczaniu.

Niektóre związki użyte w syntezie zostały otrzymane według wcześniej opracowanych procedur eksperymentalnych: 1,2-dicyjano-3,6-bis(2-propoksy)benzen [49]; ester dimetylowy kwasu 5-(4-bromobutoksy)izoftalowego i 2,3-bis[4-(3,5-dimetoksykarbonylofenoksy)butylosulfanylo]maleonitryl [84], 5,6-dichloro-2,3-dicyjanopirazyna [123].

Magnez(II) 22,23-bis[4-(3,5-dibutoksykarbonylofenoksy)butylosulfanylo]tribenzo[b,g,l]porfirazyna (2)

Makrocykl **2** oczyszczono przy użyciu chromatografii kolumnowej wykorzystując żel krzemionkowy i eluenty: *n*-heksan/octan etylu (7:2). Wydajność 33%. T.t. 138-140°C; $R_f = 0.07$ (CH₂Cl₂/MeOH 50:1); UV-Vis (CHCl₃) λ_{\max} nm (log ϵ) = 721 (3.62), 626 (3.54), 357 (3.76); ¹H NMR (800 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 9.28 (dd, $J = 5.0, 3.0$ Hz, 2H), 9.24 (d, $^3J = 7.0$ Hz, 2H), 9.14 (d, $^3J = 7.0$ Hz, 2H), 8.20 (dd, $J = 5.5, 2.5$ Hz, 2H), 8.12, 8.10 (2×t, $^3J = 6.0$ Hz, 4H), 7.23 (s, 2H), 6.69 (s, 4H), 4.33 (t, $^3J = 7.0$ Hz, 4H), 3.85 (t, $^3J = 7.0$ Hz, 8H), 3.75 (t, $^3J = 6.0$ Hz, 4H), 1.97 (m, 8H), 1.35 (m, 8H), 1.16 (m, 8H), 0.74 (t, $^3J = 7.0$ Hz, 12H); ¹³C NMR (201 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 167.8, 166.9, 160.9, 159.9, 159.4, 155.9, 154.9, 142.1, 142.0, 141.3, 139.9, 134.8, 133.6, 133.4, 133.1, 132.5, 126.0, 125.9, 123.8, 121.0, 69.9, 67.5,

37.1, 33.0, 30.4, 29.5, 21.6, 16.5 (CH₃); MS (MALDI-TOF): m/z 1247.403 [M+H]⁺. HRMS (ESI) znaleziono: 1247.45862 [M+H]⁺ C₆₈H₇₁MgN₈O₁₀S₈, obliczono 1247.45795 [M+H]⁺.

Magnez(II) 22,23-bis(4-{3,5-bis[3,5-bis(butoksykarbonylo)fenoksymetylo]fenoksy}butylosulfanylo)tribenzo[b,g,l]porfirazyna (4)

Makrocykl **4** wyizolowano wykorzystując chromatografię kolumnową: żel krzemionkowy, *n*-heksan/octan etylu (7:2) uzyskując 82 mg niebieskiego filmu (wydajność 39%); T.t. 87-89°C; R_f = 0.15 (CH₂Cl₂/MeOH 35:1); UV/Vis (CH₂Cl₂) λ_{max} nm (log ε) 694 (3.73), 651 (3.63), 359 (3.64), 316 (3.66); ¹H NMR (800 MHz, pirydyna-*d*₅): δ = 9.62-9.17 (m, 8H), 8.61-8.47 (m, 6H), 8.25-8.13 (m, 4H), 8.12-7.79 (m, 12H), 5.31-5.03 (m, 8H), 4.78 (bs, 4H), 4.36-4.23 (m, 20H), 1.65-1.52 (m, 20H), 1.39-1.25 (m, 20H), 0.86-0.75 (m, 24H). ¹³C NMR (201 MHz, pirydyna-*d*₅): δ = 167.9, 161.8, 161.6, 161.5, 152.6, 142.9, 141.4, 140.7, 138.2, 136.5, 136.4, 135.3, 135.2, 135.1, 133.9, 131.7, 126.2, 125.6, 122.7, 122.6, 122.4, 72.9, 72.6, 72.4, 70.6, 67.8, 41.5, 33.8, 33.3, 32.4, 31.6, 26.5, 25.6, 21.8, 16.2; MS (MALDI TOF): m/z 2071.871 [M+H]⁺. HRMS (ESI) znaleziono: 2070.84590 [M]⁺ C₁₁₆H₁₂₆MgN₈O₂₂S₂, obliczono 2070.82786 [M]⁺.

Magnez(II) 22,23-bis[3,5-bis(3,5-dimetoksybenzoksy)benzylosulfanylo]tribenzo[b,g,l]porfirazyna (6)

Oczyszczanie i izolacja **6** zostały przeprowadzone na drodze chromatograficznej z wykorzystaniem: żelu krzemionkowego (eluenty: CH₂Cl₂, CH₂Cl₂/metanol 100:1, CH₂Cl₂/metanol 50:1, CH₂Cl₂/metanol 35:1, CH₂Cl₂/metanol 20:1, *n*-heksan, *n*-heksan/octan etylu 7:2, *n*-heksan/octan etylu 7:3), C₁₈-żelu krzemionkowego do odwróconej fazy (eluenty: H₂O/metanol 1:1, H₂O/metanol 1:3, metanol/CH₂Cl₂ 50:1, metanol/CH₂Cl₂ 25:1, metanol/CH₂Cl₂ 12:1, metanol/ CH₂Cl₂ 3:1, CH₂Cl₂), Al₂O₃ (eluenty: CH₂Cl₂, CH₂Cl₂/metanol 100:1, CH₂Cl₂/metanol 50:1), preparatywnej TLC i eluentu CH₂Cl₂/metanol 100:1, co pozwoliło na uzyskanie 18 mg **6** w postaci ciemnoniebieskiego ciała stałego (wydajność 7%). R_f (CH₂Cl₂/metanol 35:1) 0.22. UV-Vis (CH₂Cl₂): λ_{max}, nm (log ε): 723 (4.56), 624 (4.46), 357 (4.70), 281 (4.44). ¹H NMR (800 MHz, pirydyna-*d*₅) δ 9.54 (m, 6H), 8.19 (m, 6H), 6.77 (s, 1H), 6.70 (s, 1H), 6.65 (s, 4H), 6.55 (s, 2H), 6.53 (s, 2H), 6.49 (s, 1H), 6.38 (s, 3H), 6.35 (s, 1H), 6.20 (s, 2H), 6.08 (s, 1H), 4.86 (m, 4H), 4.72 (m, 4H), 3.73 (m, 4H), 3.64 (m, 8H), 3.57 (m, 6H), 3.52 (m, 8H), 3.47 (m, 2H). ¹³C NMR (201 MHz, pirydyna-*d*₅) δ 161.87, 161.79, 161.56, 161.51, 161.10, 160.97, 160.64, 160.52, 154.71, 153.58, 150.69, 141.81, 141.08, 141.00, 140.93, 140.91, 140.84, 140.81, 140.26, 140.08, 140.00, 139.95, 139.59, 136.31, 131.70, 131.65, 131.59, 131.53, 131.42, 131.31, 131.24,

130.68, 130.64, 130.43, 124.29, 124.00, 109.43, 109.23, 106.20, 106.08, 105.75, 105.67, 102.38, 102.26, 100.82, 100.72, 100.54, 100.34, 70.60, 70.49, 70.15, 70.06, 55.83, 55.71, 55.65, 55.54, 55.51. MALDI m/z znaleziono: 1395.3820, $[M+H]^+$ $C_{78}H_{67}MgN_8O_{12}S_2$, obliczono 1395.4170; 1412.8470, $[M+H_2O]^+$ $C_{78}H_{68}MgN_8O_{13}S_2$, obliczono 1412.4198.

22,23-Bis[4-(3,5-dibutoksykarbonylofenoksy)butylosulfanylo]tribenzo[b,g,l]porfirazyna (11)

Związek **2** (66 mg, 0.053 mmol) zawieszono w 3 ml kwasu trifluorooctowego w kolbie okrągłodennej i mieszano w ciemności przez 15 minut przy dostępie powietrza. Następnie, zawiesinę wylano na lód i zobojętniono $NaHCO_3$. Niebieski produkt wyekstrahowano dichlorometanem. Warstwy organiczne połączono i odparowano. Suchą pozostałość poddano chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym z eluentami: CH_2Cl_2 , $CH_2Cl_2/MeOH$ 100:1, $CH_2Cl_2/MeOH$ 50:1, co pozwoliło na uzyskanie ciemnoniebieskiego filmu **11** (31 mg, wydajność 47%). T.t. 137-139°C. R_f (CH_2Cl_2) 0.29. UV-Vis (CH_2Cl_2): λ_{max} , nm (log ϵ) 319 (4.02), 338 (4.05), 614 (3.90), 704 (4.13). 1H NMR (800 MHz, pirydyna- d_5) δ 9.26 (s, 2H), 9.16 (s, 2H), 9.07 (d, $^3J = 5.5$ Hz, 1H), 9.02 (d, $^3J = 5.5$ Hz, 1H), 8.62 (m, 2H), 8.24 (m, 2H), 8.09 (m, 4H), 8.02 (m, 4H), 4.39 (m, 8H), 4.11 (m, 4H), 3.94 (m, 4H), 2.06 (m, 4H), 1.92 (m, 4H), 1.66 (m, 8H), 1.38 (m, 8H), 0.87 (m, 12H), -1.85 (s, 2H). ^{13}C NMR (201 MHz, pirydyna- d_5) δ 166.3, 165.6, 160.3, 159.5, 150.7, 140.6, 139.3, 136.5, 133.3, 132.6, 132.5, 132.3, 131.1, 130.6, 124.4, 123.6, 123.4, 123.3, 123.1, 122.8, 120.5, 119.7, 69.4, 66.0, 62.2, 31.4, 30.5, 26.9, 20.0, 14.4. HRMS (ESI) m/z znaleziono: 1224.5420 $[M]^+$ $C_{68}H_{72}N_8O_{10}S_2$, obliczono 1224.4813; 1225.6148 $[M+H]^+$ $C_{68}H_{73}N_8O_{10}S_2$, obliczono 1225.4891; 1247.5799 $[M+Na]^+$ $C_{68}H_{72}N_8O_{10}S_2Na$, obliczono 1247.4711.

Magnez(II) 22,23-bis[4-(3,5-dihydroksymetylofenoksy)butylosulfanylo]tribenzo[b,g,l]porfirazyna (12)

$LiAlH_4$ (44mg, 1.152 mmol) dodano do THF (10 ml, a powstałą zawiesinę mieszano przez 0.5 h w 0°C. Następnie, roztwór **2** (300 mg, 0.240 mmol) w THF (6 ml) wkraplano przez 40 minut do mieszaniny reakcyjnej. Po dodaniu całej ilości roztworu makrocykla, mieszaninę reakcyjną pozostawiono w temperaturze pokojowej mieszając przez 2 godziny. Reakcję zakończono poprzez dodanie nasyconego wodnego roztworu NH_4Cl (10 ml) i pozostawiono na kolejne 15 minut. Mieszaninę reakcyjną przesączono przez ziemię okrzemkową, osad przemyto CH_2Cl_2 , a połączone przesącze odparowano. Chromatografia kolumnowa (żel krzemionkowy, CH_2Cl_2 , a następnie $CH_2Cl_2/MeOH$ 20:1) pozwoliła na wydzielenie **12** w postaci niebieskiego filmu (150 mg, wydajność 65%). T.t. 151-153°C;

R_f (CH₂Cl₂:MeOH 10:1) 0.12; UV/Vis (CH₂Cl₂) λ_{max} nm (log ϵ) = 711 (3.81), 652 (3.26), 597 (3.29), 382 (3.55); ¹H NMR (800 MHz, pirydyna-*d*₅): δ = 9.57-8.84 (m, 4H), 8.64-7.57 (m, 12H), 7.51-7.21 (m, 2H), 4.34 (m, 4H), 4.07-3.81 (m, 4H), 1.62 (m, 4H), 1.33 (m, 4H), 0.83 (m, 8H); ¹³C NMR (201 MHz, pirydyna-*d*₅): δ = 161.9, 156.0, 155.9, 154.8, 146.4, 132.0, 130.3, 129.9, 128.9, 126.0, 125.7, 120.0, 119.0, 116.1, 100.3, 63.1, 61.5, 27.1, 15.5, 10.0; MALDI: *m/z* znaleziono 967.181 [M]⁺, obliczono 967.290.

Magnez(II) 22,23-bis[4-(3,5-bis{[4-(3,5-dimetoksykarbonylofenoksy)butoksy]metylo}fenoksy)butylosulfanylo]tribenzo[b,g,l]porfirazyna (13)

Tribenzoporfirazyna **12** (74 mg, 0.076 mmol), 5-(4-bromobutoksy)benzeno-1,3-dikarboksylian dimetylu (132 mg, 0.382 mmol) i węgiel cezu (248 mg, 0.761 mmol) mieszano w DMF (15 ml) w 60°C przez 19 godzin. Po ostudzeniu, mieszaninę reakcyjną przesączono przez ziemię okrzemkową, którą dodatkowo przemyto toluenem. Połączone przesącze odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Chromatografia kolumnowa (żel krzemionkowy, CH₂Cl₂/MeOH 20:1) pozwoliła na uzyskanie ciemnoniebieskiego filmu **13** (31 mg, 20% wydajność). T.t. 133-135°C; R_f (CH₂Cl₂:MeOH 20:1) 0.12; UV-Vis (CHCl₃): λ_{max} nm (log ϵ) = 694 (3.37), 651 (3.63), 359 (3.64), 316 (3.66); ¹H NMR (800 MHz, pirydyna-*d*₅): δ = 9.57 (m, 6H), 8.55-8.39 (m, 6H), 8.13 (m, 6H), 7.95-7.77 (m, 12H), 4.49-4.37 (m, 8H), 4.04-3.91 (m, 12H), 3.83 (m, 24H), 2.30 (bs, 4H), 1.94-1.84, 1.30-1.20 (m, 24H); ¹³C NMR (201 MHz, pirydyna-*d*₅): δ = 166.4, 166.0, 159.9, 150.6, 136.2, 134.5, 132.7, 124.2, 123.3, 120.4, 68.6, 67.6, 65.8, 62.2, 52.8, 30.4, 26.5, 26.1; MALDI: *m/z* znaleziono: 2024.679 [M+H]⁺, obliczono 2024.502.

Magnez(II) 22,23-bis[4-(3,5-dibutoksykarbonylofenoksy)butylosulfanylo]tribenzo[b,g,l]-22,23-diokso-22,23-secoporfirazyna (14)

Metoda syntetyczna została zaadaptowana z pracy [116]. Tribenzoporfirazyna **2** (42 mg, 0.034 mmol) została rozpuszczona w CH₂Cl₂ (30 ml) w kolbie okrągłodennej otwartej na dostęp powietrza. Następnie dodano roztwór KMnO₄ (6 mg, 0.038 mmol w 30 ml wody) i mieszaninę reakcyjną intensywnie mieszano przez 2 godziny bez dostępu światła. Po tym czasie oddzielono warstwę organiczną i odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Ciemnoniebieska pozostałość została poddana rozdzielaniu chromatograficznemu z wykorzystaniem żelu krzemionkowego i eluentów: CH₂Cl₂, CH₂Cl₂/MeOH 20:1, co pozwoliło na uzyskanie **14** jako ciemnoniebieskiego filmu (15 mg, wydajność 34%). T.t. 151-153°C. R_f (CH₂Cl₂/MeOH 20:1) 0.12. UV-Vis (CHCl₃): λ_{max} , nm (log ϵ) 319 (3.88), 337 (3.89), 369 (3.83), 621 (3.61), 670 (3.54), 727 (3.97). ¹H NMR (800 MHz, pirydyna-*d*₅):

$\delta = 9.64-9.52$ (m, 10H), $8.62-7.68$ (m, 26H), $4.36-4.26$, $4.11-4.03$ ($2 \times$ m, 24H, forma wolna i zagregowana), $2.33-1.97$ (m, 8H), 1.57 , 1.38 ($2 \times$ m, 16H, forma wolna i zagregowana), 1.30 , 1.16 ($2 \times$ m, 16H, forma wolna i zagregowana), $1.27-1.19$ (m, 16H), 0.81 , 0.72 ($2 \times$ t, $J = 7.0$ Hz, 24H, forma wolna i zagregowana); ^{13}C NMR (201 MHz, pirydyna- d_5): $\delta = 168.0$, 167.4 , 161.9 , 152.6 , 143.1 , 143.0 , 142.1 , 138.2 , 135.0 , 133.6 , 133.2 , 126.5 , 126.2 , 125.4 , 125.2 , 124.6 , 122.2 , 121.1 , 67.8 , 67.5 , 34.5 , 33.9 , 33.3 , 33.1 , 21.8 , 21.7 , 21.7 , 16.2 , 16.2 . HRMS (ESI) m/z znaleziono: 1279.368 $[\text{M}+\text{H}]^+$ $\text{C}_{68}\text{H}_{71}\text{MgN}_8\text{O}_{12}\text{S}_2$, obliczono 1279.4483 ; 1317.3404 $[\text{M}+\text{K}]^+$ $\text{C}_{68}\text{H}_{70}\text{MgN}_8\text{O}_{12}\text{S}_2\text{K}$, obliczono 1317.4042 ; 2596.7021 $[2\text{M}+\text{K}]^+$ $\text{C}_{136}\text{H}_{140}\text{Mg}_2\text{N}_{16}\text{O}_{24}\text{S}_4\text{K}$, obliczono 2595.8447 .

Magnez(II) 5,7-bis(4-metoksyfenylo)-6*H*-1,4-diazepino[2,3-*b*]tribenzo[*g,l,q*]porfirazyna (25)

Związek **25** wyizolowano przy użyciu chromatografii kolumnowej: (i) żel krzemionkowy i eluenty: CH_2Cl_2 , $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{metanol}$ 50:1, $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{metanol}$ 20:1; (ii) Al_2O_3 i eluenty: CH_2Cl_2 , $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{metanol}$ 200:1; (iii) C_{18} -żel do odwróconej fazy i eluenty: $\text{H}_2\text{O}/\text{metanol}$ 3:1, $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{metanol}$ 1:3; a także preparatywnej TLC (eluenty: $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{metanol}$ 10:1 i $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{pirydyna}$ 50:1), co pozwoliło na wyizolowanie **25** w postaci ciemnozielonego filmu (18 mg, wydajność 4%). R_f ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{metanol}$ 20:1) 0.47. UV-Vis (CH_2Cl_2): λ_{max} , nm (log ϵ): 695 (5.31), 657 (5.24), 352 (5.44). ^1H NMR (799.926 MHz, DMSO- d_6): δ_{H} , ppm 9.46 (m, 4H), 9.38 (m, 2H), 8.55 (d, 4H, $^3J = 8.5$ Hz), 8.27 (dd, 2H, $J = 5.5, 2.5$ Hz), 8.24 (m, 4H), 7.21 (d, 4H, $^3J = 9.0$ Hz), 4.59 (m, 2H), 3.94 (s, 6H). ^{13}C NMR (201.162 MHz, DMSO- d_6): δ_{C} , ppm 165.0, 158.2, 158.1, 156.3, 154.7, 149.7, 143.5, 142.0, 141.8, 141.6, 141.5, 134.4, 133.0, 132.9, 132.8, 132.6, 126.0, 125.9, 125.8, 117.6, 58.7, 40.0. MALDI m/z znaleziono $[\text{M}+\text{H}]^+$ 765.2380, obliczono 765.2325.

Magnez(II) 2,3-bis(4-metoksyfenylo)-1,4-diazaftalocyjanina (27)

Produkt **27** wyizolowano przy użyciu chromatografii kolumnowej (żel krzemionkowy i eluenty: CH_2Cl_2 , n -heksan/THF 5:1, $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 50:1), co pozwoliło na uzyskanie ciemnozielonego filmu **27** (34 mg, wydajność 18%). $R_f = 0.43$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 35:1). UV-Vis (DMSO): λ_{max} , nm (log ϵ) 667 (4.95), 603 (4.22), 368 (4.66). ^1H NMR (800 MHz, DMSO- d_6) $\delta = 9.38$ (m, 4H), 8.24 (m, 4H), 7.90 (m, 6H), 7.17 (m, 6H), 3.96 (s, 3H), 3.95 (s, 3H). ^{13}C NMR (800 MHz, DMSO- d_6) $\delta = 159.6$, 155.4 , 155.0 , 154.0 , 152.3 , 146.5 , 145.7 , 138.5 , 138.0 , 131.4 , 131.3 , 131.3 , 129.8 , 129.5 , 129.2 , 122.5 , 122.4 , 113.7 , 113.6 , 55.1 , 55.0 . MALDI m/z znaleziono: 750.2125 $[\text{M}]^+$ $\text{C}_{44}\text{H}_{26}\text{MgN}_{10}\text{O}_2$, obliczono 750.2091 $[\text{M}]^+$.

Magnez(II) 2,3-bis(4-benzylloksyfenylo)-1,4-diazaftalocyjanina (29)

Produkt **29** wyizolowano stosując chromatografię kolumnową (żel krzemionkowy i eluenty: CH₂Cl₂, *n*-heksan/octan etylu 7:2, CH₂Cl₂/MeOH 200:1, co pozwoliło na uzyskanie 34 mg ciemnozielonego filmu **29** (wydajność 12%). R_f = 0.17 (CH₂Cl₂/MeOH 50:1). UV–Vis (DMSO): λ_{max}, nm (log ε) 677 (5.06), 626 (4.43), 604 (4.38), 366 (4.87). ¹H NMR (800 MHz, pirydyna-*d*₆): δ = 9.66-9.41 (m, 6H), 8.18 (m, 4H), 8.15-8.03 (m, 6H), 7.59 (m, 4H), 7.46 (m, 4H), 7.38 (m, 4H), 7.31 (m, 2H), 5.21 (m, 4H). ¹³C NMR (201 MHz, pirydyna-*d*₆): δ = 162.3, 159.1, 158.8, 156.5, 155.7, 152.6, 150.5, 142.6, 142.4, 142.1, 140.0, 135.2, 132.2, 131.5, 131.4, 131.4, 130.8, 130.8, 130.6, 130.6, 126.2, 117.6, 72.7. HRMS (MALDI) *m/z* znaleziono: 903.2884 [M+H]⁺ C₅₆H₃₄MgN₁₀O₂, obliczono 903.2795 [M+H]⁺.

Magnez(II) 2,3-bis(4-[3,5-bis(benzylloksy)benzylloksy]fenylo)-1,4-diazaftalocyjanina (31)

Produkt **31** wyizolowano stosując chromatografię kolumnową (żel krzemionkowy i eluenty: CH₂Cl₂, *n*-heksan/octan etylu 7:2, CH₂Cl₂/MeOH 200:1), co pozwoliło na uzyskanie 197 mg ciemnozielonego filmu **31** z wydajnością 48%. R_f = 0.61 (CH₂Cl₂/MeOH 50:1). UV–Vis (DMSO): λ_{max}, nm (log ε) 676 (5.07), 626 (4.38), 604 (4.36), 363 (4.37). ¹H NMR (800 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 9.13-8.59 (m, 6H), 8.09-7.93 (m, 6H), 7.89 (m, 4H), 7.47 (m, 8H), 7.41 (m, 8H), 7.35 (m, 4H), 7.22 (m, 4H), 6.81 (m, 4H), 6.69 (m, 2H), 5.18 (s, 4H), 5.13 (s, 8H). ¹³C NMR (201 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 159.6, 158.7, 154.7, 154.4, 153.8, 153.5, 152.4, 152.2, 152.0, 145.8, 145.7, 139.3, 138.5, 138.1, 138.0, 136.9, 132.5, 131.9, 129.4, 129.2, 128.4, 128.4, 128.3, 127.9, 127.7, 127.7, 122.5, 114.6, 106.6, 101.3, 69.4, 69.3. MALDI *m/z* 1327.4710 [M+H]⁺ C₈₄H₅₈MgN₁₀O₆, obliczono 1327.4469.

Magnez(II) 2,3-bis(1-butoksy)-1,4-diazaftalocyjanina (32)

Związek **32** wyizolowano chromatograficznie stosując żel krzemionkowy i eluenty: CH₂Cl₂, CH₂Cl₂/MeOH 50:1, CH₂Cl₂/MeOH 35:1, CH₂Cl₂/MeOH 20:1, *n*-heksan, *n*-heksan/octan etylu 7:1, *n*-heksan/octan etylu 7:2 z wydajnością 7%. R_f = 0.59 (CH₂Cl₂/MeOH 20:1). ¹H NMR (800 MHz, pirydyna-*d*₅) δ 9.69 (m, 2H), 9.60 (m, 2H), 8.20 (d, ³J = 6.0 Hz, 2H), 8.13 (m, 2H), 8.04 (t, ³J = 7.0 Hz, 2H), 5.05 (m, 4H), 2.01 (m, 4H), 1.61 (m, 4H), 0.97 (t, ³J = 7.5 Hz, 6H). ¹³C NMR (201 MHz, pirydyna-*d*₅) δ 158.3, 154.9, 152.6, 142.6, 142.4, 142.1, 138.2, 133.9, 132.6, 132.3, 132.1, 131.7, 126.2, 125.9, 70.4, 33.8, 22.2, 16.5. MALDI *m/z*: znaleziono 682.2833 [M+H]⁺, obliczono 682.2404.

6.4. Metodyka oceny aktywności przeciwdrobnoustrojowej

W badaniach wykorzystano szczepy bakteryjne – *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

i *Escherichia coli* ATCC 25922, grzybiczy *Candida albicans* ATCC 10231 – pochodzące z *American Type Culture Collection* (ATCC). Szczepy były przechowywane we fiolkach kriogenicznych *Microbank* (*ProLabDiagnostics*, Kanada) w temperaturze $-70 \pm 10^\circ\text{C}$. Badane szczepy zawieszono w odpowiednich mediach (bakterie w bulionie BHI, *C. albicans* w bulionie Sabourauda) i tak przygotowane zawiesiny inkubowano w temperaturze $36 \pm 1^\circ\text{C}$ przez 20 godzin. Następnie, 2 ml hodowli odwirowano (3000 obrotów/minutę przez 15 minut). Supernatant usunięto i do osadu dodano PBS, celem uzyskania zawiesiny o gęstości ok. 10^7 CFU/ml (CFU, *colony forming units* – jednostki tworzące kolonie). Aktywność fotodynamiczną zbadano na podstawie wcześniej opracowanej procedury [129]. Do zawiesin bakteryjnych dodano roztwory tribenzoporfirazy o odpowiednim stężeniu, po czym inkubowano w ciemności przez 20 minut w temperaturze pokojowej. Następnie, próbki poddano naświetleniu falą długości 660 nm o intensywności 3.0 mW/cm^2 (zmierzone radiometrem *RD 0.2/2, Optel*) – grupa L(+)*Ps*(+). Jednocześnie, wykonano trzy grupy eksperymentów kontrolnych: (i) grupa nienaświetlana, bez dodatku fotouczulacza L(-)*Ps*(-), (ii) grupa nienaświetlana, z fotouczulaczem L(-)*Ps*(+), (iii) grupa naświetlana bez dodatku fotouczulacza L(+)*Ps*(-). Przeżywalność komórek określono stosując kolejne rozcieńczenia roztworu wyjściowego w PBS poprzez posiewy powierzchniowe na odpowiednich podłożach. Posiewy po badaniach bakteryjnych wykonywano na agarze tryptozowo-sojowym (*Oxoid*, Wielka Brytania), posiewy po badaniach grzybiczych na agarze Sabourauda – agar z wyciągiem kazeiny i soi. Posiewy inkubowano przez 24 godziny w przypadku szczepów bakteryjnych i 48 godzin w przypadku szczepu grzybiczego – *C. albicans* – w temperaturze $36 \pm 1^\circ\text{C}$. Po odpowiednim czasie inkubacji kolonie zliczono i na tej podstawie obliczano liczbę drobnoustrojów w próbkach badanych L(+)*Ps*(+) i kontrolnych: L(-)*Ps*(-), L(-)*Ps*(+) oraz L(+)*Ps*(-).

Fotocytotoksyczność makrocycyli w danym stężeniu i log uzyskano przez obliczenie czynnika redukcji fototoksycznej:

$$R_{\text{Ph}} = \log L(-)\text{Ps}(-) - \log L(+)\text{Ps}(+)$$

toksyczność ciemną – obliczając współczynnik toksyczności ciemnej (bez naświetlania):

$$R_{\text{D}} = \log L(-)\text{Ps}(-) - \log L(-)\text{Ps}(+)$$

Wartości kontrolne obliczono stosując wzór:

$$R_{\text{Control}} = \log L(-)\text{Ps}(-) - \log L(+)\text{Ps}(-)$$

7. Streszczenie

Tribenzoporfirazyne o potencjalnym zastosowaniu w terapii fotodynamicznej - synteza i charakterystyka fizykochemiczna

W części literaturowej pracy dokonano przeglądu piśmiennictwa na temat porfirynoidów, ze szczególnym uwzględnieniem tribenzoporfirazyne, dendrymerów i możliwości ich modyfikacji oraz terapii fotodynamicznej, w tym z wykorzystaniem powyższych grup związków.

W części eksperymentalnej przedstawiono i omówiono syntezę oraz charakterystykę fizykochemiczną dwunastu otrzymanych tribenzoporfirazyne, takich jak:

1. Magnez(II) 22,23-bis(4-(3,5-dibutoksykarbonylofenoksy)butylosulfanylo)tribenzo[b,g,l]porfirazyne (**2**)
2. Magnez(II) 22,23-bis(4-{3,5-bis[3,5-bis(butoksykarbonylo)fenoksymetylo]fenoksy}butylosulfanylo)tribenzo[b,g,l]porfirazyne (**4**)
3. Magnez(II) 22,23-bis[3,5-bis(3,5-dimetoksybenzoksy)benzylosulfanylo]tribenzo[b,g,l]porfirazyne (**6**)
4. 22,23-Bis[4-(3,5-dibutoksykarbonylofenoksy)butylosulfanylo]tribenzo[b,g,l]porfirazyne (**11**)
5. Magnez(II) 22,23-bis[4-(3,5-dihydroksymetylofenoksy)butylosulfanylo]tribenzo[b,g,l]porfirazyne (**12**)
6. Magnez(II) 22,23-bis[4-(3,5-bis{[4-(3,5-dimetoksykarbonylofenoksy)butoksy]metylo}fenoksy)butylosulfanylo]tribenzo[b,g,l]porfirazyne (**13**)
7. Magnez(II) 22,23-bis[4-(3,5-dibutoksykarbonylofenoksy)butylosulfanylo]tribenzo[b,g,l]-22,23-diokso-22,23-secoporfirazyne (**14**)
8. Magnez(II) 5,7-bis(4-metoksyfenilo)-6*H*-1,4-diazepino[2,3-*b*]tribenzo[g,l,q]porfirazyne (**25**)
9. Magnez(II) 2,3-bis(4-metoksyfenilo)-1,4-diazaftalocyjanina (**27**)
10. Magnez(II) 2,3-bis(4-benzoksyfenilo)-1,4-diazaftalocyjanina (**29**)
11. Magnez(II) 2,3-bis{4-[3,5-bis(benzoksy)benzoksy]fenilo}-1,4-diazaftalocyjanina (**31**)
12. Magnez(II) 2,3-bis(1-butoksy)-1,4-diazaftalocyjanina (**32**)

Makrocycle **2**, **4**, **6**, **25**, **27**, **29**, **31** i **32** otrzymano na drodze cyklotetrameryzacji odpowiednich pochodnych maleonitrylowych z wykorzystaniem nadmiaru 1,2-dicyjanobenzenu. Poprzez modyfikację podstawników peryferyjnych tribenzoporfirazyne

2 uzyskano dwie nowe pochodne: **12** i **13**. Na drodze modyfikacji w obrębie pierścienia makrocyklicznego **2**, poprzez usunięcie jonu magnezu z rdzenia uzyskano demetalowaną pochodną **11**, a poprzez utlenienie pierścienia *secoporfirazyne* **14**.

Tożsamość i strukturę związków potwierdzono z wykorzystaniem metod m.in. spektrofotometrii UV-Vis, spektrometrii mas (ES i MALDI), spektroskopii NMR jedno i dwuwymiarowych (^1H - ^1H COSY, ^1H - ^{13}C HSQC, ^1H - ^{13}C HMBC, ^1H - ^1H TOCSY, ^1H - ^1H NOESY).

Dla tribenzoporfirazyn **2**, **4**, **6**, **12**, **13**, **14**, **25**, **27**, **29** i **31** wykonano badania fotochemiczne celem określenia wartości wydajności kwantowej generowania tlenu singletowego. Zastosowano metodę pośrednią z wykorzystaniem 1,3-difenyloizobenzofuranu. Najwyższą wartość uzyskano dla *seco*-porfirazyny **14** równą 0,27.

Tribenzoporfirazyny **2**, **4**, **12** i **14** zostały przebadane w kierunku ich aktywności fotodynamicznej skierowanej przeciwko komórkom nowotworowym linii komórkowych HSC-3 i CAL 27 (rak kolczystokomórkowy jamy ustnej). Dla tej grupy pochodnych najwyższą aktywność zaobserwowano dla **12**, dla którego IC_{50} wyniosło 0,042 i 0,010 $\mu\text{mol/l}$ dla odpowiednio HSC-3 i CAL 27. Tę serię porfirazyn wbudowano w liposomy i w tej formulacji poddano ocenie fotocytotoksyczności względem HSC-3, CAL 27 i HeLa (linia komórkowa komórek raka szyjki macicy). Ponownie najbardziej aktywna okazała się tribenzoporfirazyna **12** w liposomach o składzie DOTAP : POPC, dla których obliczone IC_{50} wyniosło 0,013, 0,007 i 0,042 $\mu\text{mol/l}$ na liniach komórkowych odpowiednio HSC-3, CAL 27 i HeLa.

Diazepinotribenzoporfirazynę **25** przebadano względem komórek linii LNCaP (nowotwór prostaty) w postaci wolnej i w formulacji liposomalnej. Najwyższą aktywność fotodynamiczną zaobserwowano dla **25** w liposomach o składzie PG : POPC, dla których obliczone IC_{50} wyniosło 0,166 $\mu\text{mol/l}$. Formulacje liposomalne również w warunkach indukowanej hipoksji wykazywały wyższą aktywność w porównaniu do związku wolnego, z wartościami IC_{50} wynoszącymi 0,600 i 0,378 $\mu\text{mol/l}$ dla liposomów o składzie odpowiednio DOTAP : POPC oraz PG : POPC.

Związki **6**, **12** i **31** poddano ocenie aktywności fotodynamicznej skierowanej przeciwko bakteriom *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922 i grzybowi *Candida albicans* ATCC 10231. Najwyższą aktywność odnotowano względem *S. aureus* dla tribenzoporfirazyn **12** ($\log = 5,911$) i **6** ($\log = 5,771$).

8. Abstract

Tribenzoporphyrazines of potential use in photodynamic therapy – synthesis and physicochemical characterization

In the theoretical part of the work, the literature on porphyrinoids was reviewed, with particular emphasis on tribenzoporphyrazines, dendrimers and the possibility of their modification, and photodynamic therapy, including the use of the above-mentioned groups of compounds.

The experimental part presents and describes the synthesis and physicochemical characteristics of twelve obtained tribenzoporphyrazines:

1. 22,23-Bis(4-(3,5-dibutoxycarbonylphenoxy)butylsulfanyl)tribenzo[b,g,l]porphyrazinato magnesium(II) (**2**)
2. 22,23-Bis(4-{3,5-bis[3,5-bis(butoxycarbonyl)phenoxy]methyl}phenoxy)butylsulfanyl)tribenzo[b,g,l]porphyrazinato magnesium(II) (**4**)
3. 22,23-Bis[3,5-bis(3,5-dimethoxybenzyloxy)benzylsulfanyl]tribenzo[b,g,l]porphyrazinato magnesium(II) (**6**)
4. 22,23-Bis[4-(3,5-dibutoxycarbonylphenoxy)butylsulfanyl]tribenzo[b,g,l]porphyrazine (**11**)
5. 22,23-Bis[4-(3,5-dihydroxymethylphenoxy)butylsulfanyl]tribenzo[b,g,l]porphyrazinato magnesium(II) (**12**)
6. 22,23-Bis[4-(3,5-bis{[4-(3,5-dimethoxycarbonylphenoxy)butoxy]methyl}phenoxy)butylsulfanyl]tribenzo[b,g,l]porphyrazinato magnesium(II) (**13**)
7. 22,23-Bis[4-(3,5-dibutoxycarbonylphenoxy)butylsulfanyl]tribenzo[b,g,l]-22,23-dioxo-22,23-*secoporphyrazinato* magnesium(II) (**14**)
8. 5,7-Bis(4-methoxyphenyl)-6*H*-1,4-diazepino[2,3-*b*]tribenzo[*g,l,q*]porphyrazinato magnesium(II) (**25**)
9. Magnesium(II) 2,3-bis(4-methoxyphenyl)-1,4-diazaphthalocyanine (**27**)
10. Magnesium(II) 2,3-bis(4-benzyloxyphenyl)-1,4-diazaphthalocyanine (**29**)
11. Magnesium(II) 2,3-bis[4-[3,5-bis(benzyloxy)benzyloxy]phenyl]-1,4-diazaphthalocyanine (**31**)
12. Magnesium(II) 2,3-bis(1-butoxy)-1,4-diazaphthalocyanine (**32**)

Macrocycles **2**, **4**, **6**, **25**, **27**, **29**, **31** and **32** were obtained by cyclotetramerization reaction of appropriate maleonitrile derivatives with an excess of 1,2-dicyanobenzene. By modifying the peripheral substituents of tribenzoporphyrazine **2** two new derivatives were

obtained: **12** and **13**. The modification of the macrocyclic ring of **2** resulted in the demetalated derivative **11** and – through the oxidation of the macrocyclic ring – *seco*-porphyrazine **14**.

The identity and structure of compounds were confirmed using methods such as UV-Vis spectrophotometry, mass spectrometry (ES and MALDI), one- and two-dimensional NMR spectroscopy (^1H - ^1H COSY, ^1H - ^{13}C HSQC, ^1H - ^{13}C HMBC, ^1H - ^1H TOCSY, ^1H - ^1H NOESY).

For tribenzoporphyrazines **2**, **4**, **6**, **12**, **13**, **14**, **25**, **27**, **29** and **31** photochemical studies were performed to determine the singlet oxygen generation efficiency quantum yields. An indirect method using 1,3-diphenylisobenzofuran was used. The highest value of 0.27 was obtained for *seco*-porphyrazine **14**.

Tribenzoporphyrazines **2**, **4**, **12** and **14** were subjected to photodynamic activity assessment against the tumor cell lines HSC-3 and CAL 27 (oral squamous cell carcinoma). For this group of derivatives, the highest activity was observed for **12**, for which the IC_{50} was 0.042 and 0.010 $\mu\text{mol/L}$ for HSC-3 and CAL 27, respectively. The same series of porphyrazines was incorporated into liposomes, and the photocytotoxicity against cell lines HSC-3, CAL 27 and HeLa (a cell line of cervical cancer cells) was evaluated in this formulation. Again, the most active compound turned out to be tribenzoporphyrazine **12** in liposomes composed of DOTAP : POPC, for which the calculated IC_{50} was 0.013, 0.007 and 0.042 $\mu\text{mol/L}$ for the HSC-3, CAL 27 and HeLa cell lines, respectively.

Diazepinotribenzoporphyrazine **25** was evaluated on LNCaP (prostate cancer) cells in free form and a liposomal formulation. The highest photodynamic activity was observed for **25** in liposomes composed of PG : POPC, for which IC_{50} of 0.166 $\mu\text{mol/L}$ was calculated. Under conditions of induced hypoxia, liposomal formulations showed also superior activity as compared to the free compound, with IC_{50} values of 0.600 and 0.378 $\mu\text{mol/L}$ for liposomes composed of respectively DOTAP : POPC and PG : POPC

Compounds **6**, **12** and **31** were evaluated for photodynamic activity against bacteria *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922 and fungus *Candida albicans* ATCC 10231. The highest activity was recorded against *S. aureus* for tribenzoporphyrazine **12** (log = 5.911) and **6** (log = 5.771).

9. Spis stosowanych skrótów

- 5-ALA – kwas 5-aminolewulinowy (*5-aminolevulinic acid*)
- CFU – jednostki tworzące kolonie (*colony-forming units*)
- COSY – homojądrowa spektroskopia korelacyjna (*correlation spectroscopy*)
- DMAE – N,N-dimetyloaminoetanol
- DMF – N,N-dimetyloformamid
- DMSO – dimetylosulfotlenek (*dimethyl sulfoxide*)
- DOTAP – chlorek N-[1-(2,3-dioleoiloksy)propylo]-N,N,N-trimetyloamoniowy
(*1,2-dioleoyl-3-trimethylamminopropane*)
- DPBF – 1,3-difenyloizobenzofuran (*1,3-diphenylisobenzofurane*)
- ESI – jonizacja przez elektrorozpylanie (*electrospray ionization*)
- HMBC – heterojądrowa korelacja dalekiego zasięgu, heterojądrowa spektroskopia korelacyjna badająca oddziaływania sąsiednich atomów (*heteronuclear multiple bond coherence*)
- HSQC – heterojądrowa korelacja z detekcją przejść jednokwantowych, heterojądrowa spektroskopia korelacyjna badająca oddziaływania sąsiednich atomów (*heteronuclear single quantum correlation*)
- MeOH – metanol
- NMR – magnetyczny rezonans jądrowy (*nuclear magnetic resonance*)
- NOESY – spektroskopia jądrowego efektu Overhausera (*nuclear Overhauser effect spectroscopy*)
- PAMAM – poli(amidoaminowy) dendrymer
- PBS – wodny roztwór soli fizjologicznej 0.9% buforowany fosforanami (*phosphate buffered saline*)
- Pc – ftalocyjanina (*phthalocyanine*)
- PDT – terapia fotodynamiczna (*Photodynamic Therapy*)
- PG – L- α -fosfatydylo-DL-glicerol (*phosphatidyl-DL-glycerol*)
- POPC – 1-palmitoilo-2-oleoilo-sn-glicero-3-fosfocholina (*1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholin*)
- Ps – fotouczulacz, fotosensybilizator (*Photosensitizer*)
- Pz – porfirazyna
- ROS – reaktywne formy tlenu (*Reactive Oxygen Species*)
- T.t. – temperatura topnienia
-

t. wrzenia – Temperatura wrzenia

TLC – chromatografia cienkowarstwowa (*thin layer chromatography*)

TOCSY – korelacyjna spektroskopia zupełna/całkowita (*total correlation spectroscopy*)

10. Spis rycin, schematów oraz tabel
10.1. Spis rycin

Ryc. 1. Struktury chemiczne porfiryn i aza-porfiryn. M – jon metalu lub 2H.	5
Ryc. 2. Reprezentatywne struktury chemiczne naturalnie występujących porfirynoidów.	5
Ryc. 3. Możliwości modyfikacji (a) porfirazyn i (b) ftalocyjanin; (c) kompleks kanapkowy porfirazyny. M – jon metalu. R _{axial} – podstawnik aksjalny.	6
Ryc. 4. Metody syntezy aza-porfirynoidów typu A ₃ B.	9
Ryc. 5. Schematyczne przedstawienie produktów reakcji makrocyclizacji. W reakcji tetrameryzacji przy założonej identycznej reaktywności pochodnych maleo- i o-ftalonitryli powstaje zgodnie z regułami statystyki mieszanina 6 produktów makrocyclicznych.	10
Ryc. 6. Budowa chemiczna tribenzoporfirazyn typu <i>solitaire</i> VI-XIV otrzymanych przez Baumana i wsp. [19,22].	13
Ryc. 7. Budowa chemiczna tribenzoporfirazyn siarkowych XV i XVI otrzymanych przez Nikolaeva i wsp. [24]	14
Ryc. 8. Budowa chemiczna tribenzoporfirazyn z tetratiafulwalenem XVII-XX	15
Ryc. 9. Budowa chemiczna rozpuszczalnych w wodzie porfirazyn XXI i XXII otrzymanych przez Kudrevich i wsp. [27].	16
Ryc. 10. Budowa chemiczna pochodnych pirazynotribenzoporfirazyn XXIII-XXXIV	17
Ryc. 11. Budowa chemiczna dimerów porfirazynowo-porfirynowych XXXV, XXXVI i bisporfirazynowego XXXVII	18
Ryc. 12. Budowa chemiczna tribenzoporfirazyny fluorowanej XXXVIII	19
Ryc. 13. Budowa chemiczna tribenzoporfirazyn ze sprzężonym z pierścieniem 1,2,5-tiadiazyny XXXIX i XL	19
Ryc. 14. Budowa chemiczna porfirazyn typu <i>solitaire</i> otrzymanych przez Ikeue i wsp. [40].	20
Ryc. 15. Budowa chemiczna diazepinotribenzoporfirazyn XLI, XLII otrzymanych przez Donzello i wsp. wraz z produktem ubocznym tetrameryzacji XLI , czyli XLIII [41,42].	20
Ryc. 16. Budowa chemiczna pochodnych diazepinotribenzoporfirazyn XLIV i XLV [43].	21

Ryc. 17. Budowa chemiczna pochodnych tribenzoporfirazy tlenowych XLVI i XLVII [45].....	22
Ryc. 18. Schemat budowy dendrymeru.....	23
Ryc. 19. Metody funkcjonalizacji dendrymeru i możliwości jego wykorzystania jako nośnika wykorzystując (a) wewnętrzne przestrzenie i (b) peryferyjne grupy funkcyjne. PEG – polietylenoglikol.....	24
Ryc. 20. Schematyczne przedstawienie (a) terapii fotodynamicznej i (b) reakcji fotodynamicznej.....	27
Ryc. 21. Schematyczna kompilacja absorpcji światła przez różne chromofory. Linia przerywana przedstawia tzw. <i>okno terapeutyczne</i> w zakresie 600-800 nm.....	28
Ryc. 22. Wybrane komercyjnie dostępne fotouczulacze do PDT.	30
Ryc. 23. Wybrane fotouczulacze będące w trakcie badań klinicznych.....	31
Ryc. 24. Fragment widma ^1H NMR tribenzoporfirazy 6	40
Ryc. 25. Fragment widma ^1H - ^{13}C HSQC tribenzoporfirazy 6 . Symbol * wskazuje na obecność sygnału resztkowego pirydyny- d_5	41
Ryc. 26. Fragment widma ^1H - ^{13}C HMBC tribenzoporfirazy 6 . Symbol *wskazuje na obecność sygnału resztkowego pirydyny- d_5	41
Ryc. 27. Porównanie przesunięć chemicznych sygnałów jąder wodoru i jąder węglowych makrocykla 6 oraz jego agregatów 1-3. Strzałki symbolizują sprzężenia zaobserwowane w widmie ^1H - ^{13}C HMBC. Wartości przesunięć chemicznych (^{13}C) [ppm] podano z dokładnością do drugiego miejsca po przecinku (kropce), celem odczytania wszystkich sygnałów pochodzących od form zagregowanych.....	42
Ryc. 28. Budowa chemiczna pochodnych dimerkaptomaleonitryla 7 i 8	43
Ryc. 29. Widmo MS ESI tribenzoporfirazy 10	44
Ryc. 30. Widmo UV-Vis związku 14 w chloroformie w różnych stężeniach (mol/dm^3).	50
Ryc. 31. Widma UV-Vis 2 (linia przerywana), 11 (linia kropkowana) i 14 (linia ciągła). Wszystkie widma zostały zarejestrowane w dichlorometanie i są znormalizowane.	51
Ryc. 32. Przesunięcia chemiczne ^1H i (^{13}C) [ppm] tribenzoporfirazy 14 wraz z wybranymi korelacjami ^1H - ^1H COSY i ^1H - ^{13}C HMBC. Wartości przesunięć chemicznych (^{13}C) zostały podane do drugiego miejsca po przecinku (kropce) dla rozróżnienia form niezagregowanej i zagregowanej.....	53
Ryc. 33. Badania rekonesansowe w kierunku <i>seco</i> -porfirazy 16	53

Ryc. 34. Pochodne: (a) 1,4-diaza-2,3-dicyjanocyklohept-2-enu i (b) 1,2-dicyjano-6 <i>H</i> -1,4-diazepiny, dla których niemożliwe było uzyskanie odpowiednich tribenzoporfirazyn.	54
Ryc. 35. Widmo masowe mieszaniny po reakcji cyklotetrameryzacji 24 . Kolorem zielonym zaznaczono prawdopodobne produkty reakcji (A – pierścień benzenowy, B – podstawnik pochodnej diazepiny).	57
Ryc. 36. Ocena agregacji tribenzoporfirazyn 27 (u góry) i 31 (na dole) w DMSO. Po lewej znajdują się widma absorpcji porfirazyn w różnych stężeniach (wartości legendy podane w mol/l), po prawej wykres zależności absorbancji od stężenia.	61
Ryc. 37. Zmiany absorpcji obserwowane w widmie UV-Vis podczas naświetlania mieszaniny DPBF i 6 w roztworze DMF.	63
Ryc. 38. Schematyczne przedstawienie oceny fotocytotoksyczności tribenzoporfirazyn sulfanylowych 2 , 4 , 12 oraz 14	65
Ryc. 39. Schematyczne przedstawienie oceny fotocytotoksyczności tribenzoporfirazyny diazepinowej 25	67
Ryc. 40. Schematyczne przedstawienie oceny fotocytotoksyczności związków 6 , 12 i 31 w PACT.	69
Ryc. 41. Schematyczne przedstawienie oceny fotocytotoksyczności związku 25 w PACT.	71

10.2. Spis schematów

Schemat 1. Mechanizm reakcji makrocyklizacji na przykładzie ftalocyjaniny: (a) przekształcenie <i>o</i> -ftalonitryla, (b) i (c) zamykanie pierścienia makrocyklicznego (na podstawie [10]).	7
Schemat 2. Wpływ obecności tlenu na reakcję tetrameryzacji (za [11]). Dla przejrzystości pominięto podstawniki.	8
Schemat 3. Synteza ftalocyjaniny z monopodstawionego <i>o</i> -ftalonitryla. Powstająca ftalocyjanina może być podstawiona w jednej z dwóch pozycji α lub β w każdym pierścieniu benzenowym, jeśli stosowane są odpowiednio 3-podstawione i 4-podstawione pochodne 1,2-dicyjanobenzenu. M – jon metalu.	9
Schemat 4. Reakcja syntezy tribenzoporfirazyny w oparciu o procedurę Elvidge'a i Linstead'a [16].	12
Schemat 5. Przebieg oceny reaktywności tribenzoporfirazyny I zaproponowany w publikacji [17].	13

Schemat 6. Synteza tribenzoporfirazyny 2	36
Schemat 7. Synteza tribenzoporfirazyny 4	38
Schemat 8. Synteza tribenzoporfirazyny 6	39
Schemat 9. Reakcja saponifikacji 2	44
Schemat 10. Badania rekonesansowe w kierunku pochodnych hydrazydowych.	45
Schemat 11. Próba otrzymania estrowego <i>pseudo</i> -dendrymeru G1.	46
Schemat 12. Zestawienie rekonesansowych reakcji redukcji z użyciem NaBH ₄	47
Schemat 13. Otrzymywanie tribenzoporfirazyny 12 z wykorzystaniem LiAlH ₄	47
Schemat 14. Synteza tribenzoporfirazyny 13 podstawionej dendrymerem <i>pseudo</i> -G1.	48
Schemat 15. Ocena reaktywności 2 : (i) KMnO ₄ , H ₂ O/dichlorometan 1:1 (v/v), 2 godziny, temperatura pokojowa; (ii) kwas trifluorooctowy, 15 min., temperatura pokojowa, powietrze.	50
Schemat 16. Ocena reaktywności maleonitryli pochodnych 5,7-difenylo-6 <i>H</i> -1,4- diazepiny w warunkach makrocyclizacji.	56
Schemat 17. Synteza tribenzoporfirazyny 27	58
Schemat 18. Synteza tribenzoporfirazyny 29	59
Schemat 19. Synteza tribenzoporfirazyny 31	60
Schemat 20. Synteza związku 32	62

10.3. Spis tabel

Tabela 1. Wartości generowania tlenu singletowego wybranych tribenzoporfirazyn w DMF.	64
Tabela 2. Wartości IC ₅₀ uzyskane dla wolnych tribenzoporfirazyn.	66
Tabela 3. Wartości IC ₅₀ uzyskane dla tribenzoporfirazyn w liposomach DOTAP : POPC.	66
Tabela 4. Wartości IC ₅₀ uzyskane dla 25 podczas oceny fotocytotoksyczności względem komórek linii LNCaP.	68
Tabela 5. Redukcja ilości bakterii planktonicznych <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923, <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 i grzybiczych <i>C. albicans</i> ATCC 10231 pod wpływem naświetlania w obecności tribenzoporfirazyny o odpowiednim stężeniu.	69
Tabela 6. Wyniki aktywności przeciwdrobnoustrojowej 25 w warunkach terapii fotodynamicznej.	70

11. Odnośniki literaturowe

- [1] GLASS | Global antimicrobial resistance surveillance system (GLASS) report. WHO 2018. <http://www.who.int/glass/resources/publications/early-implementation-report/en/> (dostęp 23 stycznia 2019).
- [2] WHO | Race against time to develop new antibiotics. WHO <http://www.who.int/bulletin/volumes/89/2/11-030211/en/> (dostęp 23 stycznia 2019).
- [3] Allison RR, Moghissi K. Photodynamic Therapy (PDT): PDT Mechanisms. *Clin Endosc* 2013;46:24–9. doi:10.5946/ce.2013.46.1.24.
- [4] Rodríguez-Morgade MS, Stuzhin PA. The chemistry of porphyrazines: an overview. *J Porphyr Phthalocyanines* 2004;08:1129–65. doi:10.1142/S1088424604000490.
- [5] Kesharwani P, Jain K, Jain NK. Dendrimer as nanocarrier for drug delivery. *Prog Polym Sci* 2014;39:268–307. doi:10.1016/j.progpolymsci.2013.07.005.
- [6] Ekstrom A, Fookes CJR, Hambley T, Loeh HJ, Miller SA, Taylor JC. Determination of the crystal structure of a petroporphyrin isolated from oil shale. *Nature* 1983;306:173–4. doi:10.1038/306173a0.
- [7] Zhao X, Xu C, Shi Q. Porphyrins in Heavy Petroleums: A Review. In: Xu C, Shi Q, editors. *Struct. Model. Complex Pet. Mix.*, vol. 168, Cham: Springer International Publishing; 2015, p. 39–70. doi:10.1007/430_2015_189.
- [8] Linstead RP. Phthalocyanines. Part I. A new type of synthetic colouring matters. *J Chem Soc Resumed* 1934;0:1016–7. doi:10.1039/JR9340001016.
- [9] Piskorz J, Gośliński T, Mielcarek J. Badania w dziedzinie azotowych analogów porfiryn i ich zastosowania w przemyśle barwników syntetycznych. *Przem Chem* 2014;1855–8. doi:dx.medra.org/10.12916/przemchem.2014.1855.
- [10] Oliver SW, Smith TD. Oligomeric cyclization of dinitriles in the synthesis of phthalocyanines and related compounds: the role of the alkoxide anion. *J Chem Soc Perkin Trans 2* 1987:1579. doi:10.1039/p29870001579.
- [11] Wang K, Pan H, Jiang J. Towards Clarifying the Role of O₂ during the Phthalocyanine Synthesis. *Chem - Eur J* 2015;21:18461–5. doi:10.1002/chem.201504050.
- [12] Rodríguez-Morgade MS, de la Torre G, Torres T. 99 - Design and Synthesis of Low-Symmetry Phthalocyanines and Related Systems. In: Kadish KM, Smith KM, Guillard R, editors. *Porphyr. Handb.*, Amsterdam: Academic Press; 2003, p. 125–60. doi:10.1016/B978-0-08-092389-5.50009-2.
-

-
- [13] Nemykin VN, Dudkin SV, Dumoulin F, Hirel C, Gürek AG, Ahsen V. Synthetic approaches to asymmetric phthalocyanines and their analogues. *Arkivoc* 2014;2014:142. doi:10.3998/ark.5550190.p008.412.
- [14] Dumoulin F, Zorlu Y, Menaf Ayhan M, Hirel C, Isci Ü, Ahsen V. A first ABAC phthalocyanine. *J Porphyr Phthalocyanines* 2009;13:161–5. doi:10.1142/S1088424609000140.
- [15] Claessens CG, González-Rodríguez D, Rodríguez-Morgade MS, Medina A, Torres T. Subphthalocyanines, Subporphyrines, and Subporphyrins: Singular Nonplanar Aromatic Systems. *Chem Rev* 2014;114:2192–277. doi:10.1021/cr400088w.
- [16] Elvidge JA, Linstead RP. Conjugated macrocycles. Part XXVII. The formation of tetrazaporphins from imidines. Tribenzotetrazaporphin. *J Chem Soc Resumed* 1955:3536–44. doi:10.1039/JR9550003536.
- [17] Elvidge JA, Golden JH, Linstead RP. Conjugated macrocycles. Part XXIX. Tribenzotetrazaporphin metal derivatives and dibromotribenzotetrazaporphin. *J Chem Soc Resumed* 1957:2466. doi:10.1039/jr9570002466.
- [18] Kobayashi N, Kondo R, Nakajima S, Osa T. New route to unsymmetrical phthalocyanine analogs by the use of structurally distorted subphthalocyanines. *J Am Chem Soc* 1990;112:9640–1. doi:10.1021/ja00182a034.
- [19] Baumann TF, Sibert JW, Olmstead MM, Barrett AGM, Hoffman BM. Solitaire Porphyrines: X-ray Crystal Structure and Spectroscopy of [1,1'-Bis(diphenylphosphino)ferrocene][(norphthalocyanine)dithiolato]palladium(II). *J Am Chem Soc* 1994;116:2639–40. doi:10.1021/ja00085a062.
- [20] Definicja SOLITAIRE <https://www.merriam-webster.com/dictionary/solitaire> (dostęp 23 stycznia 2019).
- [21] Velazquez CS, Baumann TF, Olmstead MM, Hope H, Barrett AGM, Hoffman BM. Star porphyrines: peripheral chelation of porphyrineoctathiolate by diphosphinonickel ions. *J Am Chem Soc* 1993;115:9997–10003. doi:10.1021/ja00075a016.
- [22] Baumann TF, Nasir MS, Sibert JW, White AJP, Olmstead MM, Williams DJ, *et al.* *solitaire* -Porphyrines: Synthetic, Structural, and Spectroscopic Investigation of Complexes of the Novel Binucleating Norphthalocyanine-2,3-dithiolato Ligand. *J Am Chem Soc* 1996;118:10479–86. doi:10.1021/ja9619115.
-

-
- [23] Guo L, Ellis DE, Hoffman BM, Ishikawa Y. Ligand Substitution Effect on Electronic Structure and Optical Properties of Nickel Porphyrazines. *Inorg Chem* 1996;35:5304–12. doi:10.1021/ic960005q.
- [24] Nikolaev IY, Kudrik EV, Kulinich VP, Shaposhnikov GP. Unsymmetrical Pentoxo-Substituted Porphyrazines. *Russ J Gen Chem* 2005;75:468–72. doi:10.1007/s11176-005-0251-9.
- [25] Yin B, Hou R, Jiang C, Chen T, Jin L-Y. The Norphthalocyanines Bearing Two TTF Units: Synthesis, Photophysical and Electrochemical Properties. *Heterocycles* 2011;83:1859. doi:10.3987/COM-11-12235.
- [26] Guo J, Xia Y, Li D, Hou R. Synthesis and electron-donating properties of novel norphthalocyanines containing thiacyclopentane ether-linked tetrathiafulvalene moieties. *Tetrahedron Lett* 2016;57:570–3. doi:10.1016/j.tetlet.2015.12.089.
- [27] Kudrevich S, Brasseur N, La Madeleine C, Gilbert S, van Lier JE. Syntheses and Photodynamic Activities of Novel Trisulfonated Zinc Phthalocyanine Derivatives. *J Med Chem* 1997;40:3897–904. doi:10.1021/jm9702488.
- [28] Zimcik P, Miletin M, Novakova V, Kopecky K, Nejedla M, Stara V, *et al.* Effective Monofunctional Azaphthalocyanine Photosensitizers for Photodynamic Therapy. *Aust J Chem* 2009;62:425–33. doi:10.1071/CH08392.
- [29] Novakova V, Zimcik P, Miletin M, Kopecky K, Ivincová J. A phthalocyanine–mestranol conjugate for photodynamic therapy prepared via click chemistry. *Tetrahedron Lett* 2010;51:1016–8. doi:10.1016/j.tetlet.2009.12.075.
- [30] Novakova V, Kobak RZU, Kučera R, Kopecky K, Miletin M, Krepsová V, *et al.* The effect of the number of carbohydrate moieties on the azaphthalocyanine properties. *Dalton Trans* 2012;41:10596. doi:10.1039/c2dt30971h.
- [31] Vachova L, Novakova V, Kopecky K, Miletin M, Zimcik P. Effect of intramolecular charge transfer on fluorescence and singlet oxygen production of phthalocyanine analogues. *Dalton Trans* 2012;41:11651. doi:10.1039/c2dt31403g.
- [32] Kan J, Chen Y, Gao J, Wan L, Lei T, Ma P, *et al.* Synthesis, self-assembly, and semiconducting properties of phenanthroline-fused phthalocyanine derivatives. *J Mater Chem* 2012;22:15695. doi:10.1039/c2jm32358c.
- [33] Martynov AG, Mack J, Ngoy BP, Nyokong T, Gorbunova YG, Tsivadze AY. Electronic structure and NH-tautomerism of a novel metal-free phenanthroline-annelated phthalocyanine. *Dyes Pigments* 2017;140:469–79. doi:10.1016/j.dyepig.2017.01.072.
-

-
- [34] Pan H, Chen C, Wang K, Li W, Jiang J. Unsymmetrical Pyrene-Fused Phthalocyanine Derivatives: Synthesis, Structure, and Properties. *Chem - Eur J* 2015;21:3168–73. doi:10.1002/chem.201405917.
- [35] Zhang Y, Oh J, Wang K, Chen C, Cao W, Park KH, *et al.* Heteroleptic Tetrapyrrole-Fused Dimeric and Trimeric Skeletons with Unusual Non-Frustrated Fluorescence. *Chem - Eur J* 2016;22:4492–9. doi:10.1002/chem.201504837.
- [36] Wang C, Chen X, Liu Q, Qi D, Wang K, Jiang J. Combinatorial experimental and DFT theoretical investigation over the formation mechanism of a binuclear phthalocyanine dimer. *RSC Adv* 2017;7:53043–7. doi:10.1039/C7RA10678E.
- [37] Goslinski T, Dutkiewicz Z, Kryjewski M, Tykarska E, Sobotta L, Szczolko W, *et al.* Experimental and computational study on the reactivity of 2,3-bis[(3-pyridylmethyl)amino]-2(Z)-butene-1,4-dinitrile, a key intermediate for the synthesis of tribenzoporphyrzine bearing peripheral methyl(3-pyridylmethyl)amino substituents. *Monatshefte Für Chem - Chem Mon* 2011;142:599–608. doi:10.1007/s00706-011-0503-9.
- [38] Donzello MP, Ercolani C, Gaberkorn AA, Kudrik EV, Meneghetti M, Marcolongo G, *et al.* Synthesis, X-ray Crystal Structure, UV/Visible Linear and Nonlinear (Optical Limiting) Spectral Properties of Symmetrical and Unsymmetrical Porphyrzines with Annulated 1,2,5-Thiadiazole and 1,4-Diamyloxybenzene Moieties. *Chem - Eur J* 2003;9:4009–24. doi:10.1002/chem.200304929.
- [39] Sheinin VB, Ivanova YB. The acid properties of benzodiamyloxyl and thiadiazole porphyrzine derivatives in the H₂L-(K[2.2.2])OH-DMSO system. *Russ J Phys Chem A* 2007;81:1250–5. doi:10.1134/S0036024407080134.
- [40] Ikeue T, Fukahori T, Mitsumune T, Ueda K, Fujii K, Kurahashi S, *et al.* Homo- and hetero-dinuclear nickel(II), copper(II), and oxidovanadium(IV) complexes of a Schiff-base-fused phthalocyanine with 2,6-dimethylphenoxy and t-butyl groups. *Inorganica Chim Acta* 2014;409:433–40. doi:10.1016/j.ica.2013.09.036.
- [41] Donzello MP, Ercolani C, Mannina L, Viola E, Bubnova A, Khelevina OG, *et al.* Synthesis and Spectroscopic Properties of Low-Symmetry Tribenzoporphyrzines with Annulated 6 H -1,4-Diazepine Ring. *Aust J Chem* 2008;61:262. doi:10.1071/CH08071.
- [42] Malyasova AS, Kokareva EA, Tarakanov PA, Aleksandriiskii VV, Khelevina OG, Koifman OI. Synthesis and properties of 172-phenyl-5,10,15,20-tetraazatribenzo[b,g,l]pyrazino[2,3-q]porphyrin-173(174 H)-one. *Russ J Org Chem* 2013;49:1812–8. doi:10.1134/S1070428013120178.
-

-
- [43] Goslinski T, Piskorz J, Brudnicki D, White AJP, Gdaniec M, Szczolko W, *et al.* Synthesis and photochemical characteristics of novel tribenzoporphyrazines possessing peripherally annulated tetrahydrodiazepine and diazepine rings. *Polyhedron* 2011;30:1004–11. doi:10.1016/j.poly.2010.12.049.
- [44] Piskorz J, Konopka K, Düzgüneş N, Gdaniec Z, Mielcarek J, Goslinski T. Diazepinoporphyrazines Containing Peripheral Styryl Substituents and Their Promising Nanomolar Photodynamic Activity against Oral Cancer Cells in Liposomal Formulations. *ChemMedChem* 2014;9:1775–82. doi:10.1002/cmdc.201402085.
- [45] Trivedi ER, Vesper BJ, Weitman H, Ehrenberg B, Barrett AGM, Radosevich JA, *et al.* Chiral *bis*-Acetal Porphyrazines as Near-infrared Optical Agents for Detection and Treatment of Cancer. *Photochem Photobiol* 2010;86:410–7. doi:10.1111/j.1751-1097.2009.00681.x.
- [46] Buhleier E, Wehner W, Vögtle F. “Cascade”- and “Nonskid-Chain-like” Syntheses of Molecular Cavity Topologies. *Synthesis* 1978;1978:155–8. doi:10.1055/s-1978-24702.
- [47] Mlynarczyk DT, Kocki T, Goslinski T. Dendrimer Structure Diversity and Tailorability as a Way to Fight Infectious Diseases. In: Seehra MS, editor. *Nanostructured Mater. - Fabr. Appl.*, InTech; 2017. doi:10.5772/67660.
- [48] Tulu M, Aghatabay NM, Senel M, Dizman C, Parali T, Dulger B. Synthesis, characterization and antimicrobial activity of water soluble dendritic macromolecules. *Eur J Med Chem* 2009;44:1093–9. doi:10.1016/j.ejmech.2008.06.016.
- [49] Tillo A, Stolarska M, Kryjewski M, Popenda L, Sobotta L, Jurga S, *et al.* Phthalocyanines with bulky substituents at non-peripheral positions – Synthesis and physico-chemical properties. *Dyes Pigments* 2016;127:110–5. doi:10.1016/j.dyepig.2015.12.017.
- [50] Setaro F, Ruiz-González R, Nonell S, Hahn U, Torres T. Synthesis, photophysical studies and $1O_2$ generation of carboxylate-terminated zinc phthalocyanine dendrimers. *J Inorg Biochem* 2014;136:170–6. doi:10.1016/j.jinorgbio.2014.02.007.
- [51] Battah S, Balaratnam S, Casas A, O’Neill S, Edwards C, Batlle A, *et al.* Macromolecular delivery of 5-aminolaevulinic acid for photodynamic therapy using dendrimer conjugates. *Mol Cancer Ther* 2007;6:876–85. doi:10.1158/1535-7163.MCT-06-0359.
- [52] Majoros IJ, Myc A, Thomas T, Mehta CB, Baker JR. PAMAM Dendrimer-Based Multifunctional Conjugate for Cancer Therapy: Synthesis, Characterization, and Functionality. *Biomacromolecules* 2006;7:572–9. doi:10.1021/bm0506142.
-

-
- [53] Svenson S, Tomalia D. Dendrimers in biomedical applications—reflections on the field. *Adv Drug Deliv Rev* 2005;57:2106–29. doi:10.1016/j.addr.2005.09.018.
- [54] Michaud G, Visini R, Bergmann M, Salerno G, Bosco R, Gillon E, *et al.* Overcoming antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms using glycopeptide dendrimers. *Chem Sci* 2016;7:166–82. doi:10.1039/C5SC03635F.
- [55] Mishra MK, Kotta K, Hali M, Wykes S, Gerard HC, Hudson AP, *et al.* PAMAM dendrimer-azithromycin conjugate nanodevices for the treatment of Chlamydia trachomatis infections. *Nanomedicine Nanotechnol Biol Med* 2011;7:935–44. doi:10.1016/j.nano.2011.04.008.
- [56] Balogh L, Swanson DR, Tomalia DA, Hagnauer GL, McManus AT. Dendrimer–Silver Complexes and Nanocomposites as Antimicrobial Agents. *Nano Lett* 2001;1:18–21. doi:10.1021/nl005502p.
- [57] Khairnar GA, Chavan-Patil AB, Palve PR, Bhise SB, Mourya VK, Kulkarni CG. Dendrimers: potential tool for enhancement of antifungal activity. *Int J PharmTech Res* 2010;2:736–9.
- [58] Rao BN, Fathima SR, Viswanath V, Prakash KG, Padmini DS, Reddy PS. Novel Citric Acid Dendritic Hydrogels for the Delivery of Econazole Nitrate and its Antifungal Activity. *J Appl Pharm Sci* 2016;6:094–102.
- [59] Jain K, Verma AK, Mishra PR, Jain NK. Characterization and evaluation of amphotericin B loaded MDP conjugated poly(propylene imine) dendrimers. *Nanomedicine Nanotechnol Biol Med* 2015;11:705–13. doi:10.1016/j.nano.2014.11.008.
- [60] Starpharma | VivaGel®. Starpharma <https://starpharma.com/vivagel> (dostęp 23 stycznia 2019).
- [61] Tulu M, Serol A. Dendrimers as Antibacterial Agents. In: Bobbarala V, editor. *Search Antibact. Agents*, InTech; 2012. doi:10.5772/46051.
- [62] Staniszewska M, Bondaryk M, Zielińska P, Urbańczyk-Lipkowska Z. The *in vitro* effects of new D186 dendrimer on virulence factors of *Candida albicans*. *J Antibiot (Tokyo)* 2014;67:425–32. doi:10.1038/ja.2014.25.
- [63] Heredero-Bermejo I, Copa-Patiño JL, Soliveri J, García-Gallego S, Rasines B, Gómez R, *et al.* In vitro evaluation of the effectiveness of new water-stable cationic carbosilane dendrimers against *Acanthamoeba castellanii* UAH-T17c3 trophozoites. *Parasitol Res* 2013;112:961–9. doi:10.1007/s00436-012-3216-z.
-

-
- [64] Muz B, de la Puente P, Azab F, Azab AK. The role of hypoxia in cancer progression, angiogenesis, metastasis, and resistance to therapy. *Hypoxia* 2015;3:83–92. doi:10.2147/HP.S93413.
- [65] Ormond A, Freeman H. Dye Sensitizers for Photodynamic Therapy. *Materials* 2013;6:817–40. doi:10.3390/ma6030817.
- [66] Josefsen LB, Boyle RW. Photodynamic therapy: novel third-generation photosensitizers one step closer? *Br J Pharmacol* 2008;154:1–3. doi:10.1038/bjp.2008.98.
- [67] ClinicalTrials.gov <https://clinicaltrials.gov/> (dostęp 23 stycznia 2019).
- [68] Wu D, Liu Z, Fu Y, Zhang Y, Tang N, Wang Q, *et al.* Efficacy of 2-(1-hexyloxyethyl)-2-devinyl pyropheophorbide-a in photodynamic therapy of human esophageal squamous cancer cells. *Oncol Lett* 2013;6:1111–9. doi:10.3892/ol.2013.1493.
- [69] Pucelik B, Arnaut LG, Stochel G, Dąbrowski JM. Design of Pluronic-Based Formulation for Enhanced Redaporfin-Photodynamic Therapy against Pigmented Melanoma. *ACS Appl Mater Interfaces* 2016;8:22039–55. doi:10.1021/acsami.6b07031.
- [70] Kataoka H, Nishie H, Hayashi N, Tanaka M, Nomoto A, Yano S, *et al.* New photodynamic therapy with next-generation photosensitizers. *Ann Transl Med* 2017;5. doi:10.21037/atm.2017.03.59.
- [71] Rapozzi V. *Resistance to photodynamic therapy in cancer*. Cham: Springer; 2015.
- [72] Ryskova L, Buchta V, Slezak R. Photodynamic antimicrobial therapy. *Open Life Sci* 2010;5. doi:10.2478/s11535-010-0032-2.
- [73] Stuzhin PA, Tarakanov P, Shiryaeva S, Zimenkova A, Koifman OI, Viola E, *et al.* Porphyrazines with annulated diazepine rings 4: Synthesis and properties of MgII tetradiazepinoporphyrazine carrying exocyclic styryl fragments. *J Porphyr Phthalocyanines* 2012;16:968–76. doi:10.1142/S1088424612501052.
- [74] Fadel M, Kassab K, Abdel Fadeel D. Zinc phthalocyanine-loaded PLGA biodegradable nanoparticles for photodynamic therapy in tumor-bearing mice. *Lasers Med Sci* 2010;25:283–92. doi:10.1007/s10103-009-0740-x.
- [75] Shilyagina NY, Peskova NN, Lermontova SA, Brilkina AA, Vodeneev VA, Yakimansky AV, *et al.* Effective delivery of porphyrazine photosensitizers to cancer cells by polymer brush nanocontainers. *J Biophotonics* 2017;10:1189–97. doi:10.1002/jbio.201600212.
-

-
- [76] Synatschke CV, Nomoto T, Cabral H, Förtsch M, Toh K, Matsumoto Y, *et al.* Multicompartment Micelles with Adjustable Poly(ethylene glycol) Shell for Efficient *in Vivo* Photodynamic Therapy. *ACS Nano* 2014;8:1161–72. doi:10.1021/nn4028294.
- [77] Yudintsev AV, Shilyagina NY, Dyakova DV, Lermontova SA, Klapshina LG, Guryev EL, *et al.* Liposomal Form of Tetra(Aryl)Tetracyanoporphyrine: Physical Properties and Photodynamic Activity *In Vitro*. *J Fluoresc* 2018;28:513–22. doi:10.1007/s10895-018-2212-9.
- [78] Kandela IK, McAuliffe KJ, Cochran LE, Barrett AGM, Hoffman BM, Mazar AP, *et al.* Discovery of the Antitumor Effects of a Porphyrine Diol (Pz 285) in MDA-MB-231 Breast Tumor Xenograft Models in Mice. *ACS Med Chem Lett* 2017;8:705–9. doi:10.1021/acsmchemlett.7b00063.
- [79] Yuzhakova DV, Lermontova SA, Grigoryev IS, Muravieva MS, Gavrina AI, Shirmanova MV, *et al.* *In vivo* multimodal tumor imaging and photodynamic therapy with novel theranostic agents based on the porphyrine framework-chelated gadolinium (III) cation. *Biochim Biophys Acta BBA - Gen Subj* 2017;1861:3120–30. doi:10.1016/j.bbagen.2017.09.004.
- [80] Klajnert B, Rozanek M, Bryszewska M. Dendrimers in Photodynamic Therapy. *Curr Med Chem* 2012;19:4903–12. doi:10.2174/0929867311209024903.
- [81] Zhou T, Battah S, Mazzacupa F, Hider RC, Dobbin P, MacRobert AJ. Design of Bifunctional Dendritic 5-Aminolevulinic Acid and Hydroxypyridinone Conjugates for Photodynamic Therapy. *Bioconj Chem* 2018;29:3411–28. doi:10.1021/acs.bioconjchem.8b00574.
- [82] Narsireddy A, Vijayashree K, Adimoolam MG, Manorama SV, Rao NM. Photosensitizer and peptide-conjugated PAMAM dendrimer for targeted *in vivo* photodynamic therapy. *Int J Nanomedicine* 2015;10:6865–78. doi:10.2147/IJN.S89474.
- [83] Hutnick MA, Ahsanuddin S, Guan L, Lam M, Baron ED, Pokorski JK. PEGylated Dendrimers as Drug Delivery Vehicles for the Photosensitizer Silicon Phthalocyanine Pc 4 for Candidal Infections. *Biomacromolecules* 2017;18:379–85. doi:10.1021/acs.biomac.6b01436.
- [84] Lijewski S, Gierszewski M, Sobotta L, Piskorz J, Kordas P, Kucinska M, *et al.* Photophysical properties and photochemistry of a sulfanyl porphyrine bearing isophthaloxybutyl substituents. *Dyes Pigments* 2015;113:702–8. doi:10.1016/j.dyepig.2014.10.004.
-

-
- [85] Mlynarczyk DT, Lijewski S, Falkowski M, Piskorz J, Szczolko W, Sobotta L, *et al.* Dendrimeric Sulfanyl Porphyrazines: Synthesis, Physico-Chemical Characterization, and Biological Activity for Potential Applications in Photodynamic Therapy. *ChemPlusChem* 2016;81:460–70. doi:10.1002/cplu.201600051.
- [86] Martin JT, Standing HA. The effects of sodium chloride, pyridine and ethyl alcohol on the absorptionspectra of certain azo dyes in aqueous solution. *J Text Inst Trans* 1949;40:T671–88. doi:10.1080/19447024908660047.
- [87] Falkowski M, Rebis T, Piskorz J, Popenda L, Jurga S, Mielcarek J, *et al.* Improved electrocatalytic response toward hydrogen peroxide reduction of sulfanyl porphyrazine/multiwalled carbon nanotube hybrids deposited on glassy carbon electrodes. *Dyes Pigments* 2016;134:569–79. doi:10.1016/j.dyepig.2016.08.014.
- [88] Lee S, White AJP, Williams DJ, Barrett AGM, Hoffman BM. Synthesis of Near-IR Absorbing/Emitting Porphyrazine Derivatives with Tunable Solubility. *J Org Chem* 2001;66:461–5. doi:10.1021/jo001220y.
- [89] Theodorou V, Skobridis K, Tzakos AG, Ragoussis V. A simple method for the alkaline hydrolysis of esters. *Tetrahedron Lett* 2007;48:8230–3. doi:10.1016/j.tetlet.2007.09.074.
- [90] Chawla P, Maheshwari R, Saraf SA. Synthesis and evaluation of anti-inflammatory and antimicrobial activity of 2,5-disubstituted-1,3,4-oxadiazoles. *Pharma Chem* 2010;2:38–45.
- [91] Soai K, Oyamada H, Takase M, Ookawa A. Practical Procedure for the Chemoselective Reduction of Esters by Sodium Borohydride. Effect of the Slow Addition of Methanol. *Bull Chem Soc Jpn* 1984;57:1948–53. doi:10.1246/bcsj.57.1948.
- [92] Yamakawa T, Masaki M, Nohira H. A New Reduction of Some Carboxylic Esters with Sodium Borohydride and Zinc Chloride in the Presence of a Tertiary Amine. *Bull Chem Soc Jpn* 1991;64:2730–4. doi:10.1246/bcsj.64.2730.
- [93] Prasad ASB, Kanth JVB, Periasamy M. Convenient methods for the reduction of amides, nitriles, carboxylic esters, acids and hydroboration of alkenes using NaBH₄/I₂ system. *Tetrahedron* 1992;48:4623–8. doi:10.1016/S0040-4020(01)81236-9.
- [94] Hernanz D, Camps F, Guerrero A, Delgado A. Synthesis and configurational assignment of (R) and (S)-2-bromohexadecanoic acids. *Tetrahedron Asymmetry* 1995;6:2291–8. doi:10.1016/0957-4166(95)00305-9.
-

-
- [95] Höger S. Methoxycarbonyl-Terminated Dendrons via the Mitsunobu Reaction: An Easy Way to Functionalized Hyperbranched Building Blocks. *Synthesis* 1997;1997:20–2. doi:10.1055/s-1997-1500.
- [96] Gierszewski M, Falkowski M, Sobotta L, Stolarska M, Popena L, Lijewski S, *et al.* Porphyrazines with peripheral isophthaloxyalkylsulfanyl substituents and their optical properties. *J Photochem Photobiol Chem* 2015;307–308:54–67. doi:10.1016/j.jphotochem.2015.04.003.
- [97] Sugita I, Shimizu S, Fukuda T, Kobayashi N. Nickel and palladium complexes of seco-tribenzoporphyrazines derived from one-pot condensation of 1,3-diiminoisoindoline. *Tetrahedron Lett* 2013;54:1599–601. doi:10.1016/j.tetlet.2013.01.057.
- [98] Montalban AG, Lange SJ, Beall LS, Mani NS, Williams DJ, White AJ, *et al.* Seco-porphyrazines: synthetic, structural, and spectroscopic investigations. *J Org Chem* 1997;62:9284–9289.
- [99] Nemykin VN, Polshyna AE, Makarova EA, Kobayashi N, Lukyanets EA. Unexpected formation of the nickel seco-tribenzoporphyrazine with a tribenzotetraazachlorin-type absorption spectrum. *Chem Commun* 2012;48:3650. doi:10.1039/c2cc30760j.
- [100] Sakellariou EG, Montalban AG, Beall SL, Henderson D, Meunier HG, Phillips D, *et al.* Novel peripherally functionalized seco-porphyrazines: synthesis, characterization and spectroscopic evaluation. *Tetrahedron* 2003;59:9083–90. doi:10.1016/j.tet.2003.09.060.
- [101] Baum SM, Trabanco AA, Montalban AG, Micallef AS, Zhong C, Meunier HG, *et al.* Synthesis and Reactions of Aminoporphyrazines with Annulated Five- and Seven-Membered Rings. *J Org Chem* 2003;68:1665–70. doi:10.1021/jo026484u.
- [102] Kozlov AV, Stuzhin PA. New Porphyrazinoid Containing Pyrazine in Place of One Pyrrole Ring. *Macroheterocycles* 2014;7:170–3. doi:10.6060/mhc140270s.
- [103] Sakellariou EG, Montalban AG, Meunier HG, Rumbles G, Phillips D, Ostler RB, *et al.* Peripherally Metalated Secoporphyrazines: A New Generation of Photoactive Pigments. *Inorg Chem* 2002;41:2182–7. doi:10.1021/ic0111583.
- [104] Montalban AG, Meunier HG, Ostler RB, Barrett AGM, Hoffman BM, Rumbles G. Photoperoxidation of a Diamino Zinc Porphyrazine to the *seco*-Zinc Porphyrazine: Suicide or Murder? *J Phys Chem A* 1999;103:4352–8. doi:10.1021/jp9905068.
- [105] Fuchter MJ, Hoffman BM, Barrett AGM. Ring-Opening Metathesis Polymer Sphere-Supported *seco*-Porphyrazines: Efficient and Recyclable Photooxygenation Catalysts. *J Org Chem* 2006;71:724–9. doi:10.1021/jo052156t.
-

-
- [106] Gonca E, Baklaci ÜG, Dinçer HA. Seco-porphyrazines with eight (p-tolyl) and (o-tolyl) units. *J Porphyr Phthalocyanines* 2008;12:116–122.
- [107] Mani NS, Beall LS, White AJP, Williams DJ, Barrett AGM, Hoffman BM. Serendipitous desymmetrisation during porphyrazine synthesis: an X-ray crystallographic study of 2,3,7,8,12,13,17,18-octakis(dimethylamino)-2-secoporphyrazine-2,3-dione. *J Chem Soc Chem Commun* 1994:1943. doi:10.1039/c39940001943.
- [108] Altunkaya M, Gonca E. Synthesis and characterization of new soluble fluorinated seco-porphyrazines. *Polyhedron* 2011;30:1035–9. doi:10.1016/j.poly.2011.01.003.
- [109] Nazli A, Gonca E, Gül A. Partially oxidized porphyrazines. *J Porphyr Phthalocyanines* 2006;10:996–1002.
- [110] Gonca E, Keskin B. Synthesis and characterization of soluble *seco* -porphyrazines with bulky substituents. *J Coord Chem* 2009;62:2875–82. doi:10.1080/00958970902962220.
- [111] Gonca E, Baklaci ÜG, Dinçer HA. Synthesis and spectral properties of novel seco-porphyrazines with eight 4-biphenyl groups. *Polyhedron* 2008;27:2431–5. doi:10.1016/j.poly.2008.04.025.
- [112] Nie H, Stern CL, Hoffman BM, Barrett AG. Decapitation of dihydroporphyrzinediol derivatives: synthesis and X-ray structure of a novel seco-porphyrazine. *Chem Commun* 1999:703–704.
- [113] Guinchard X, Fuchter MJ, Ruggiero A, Duckworth BJ, Barrett AGM, Hoffman BM. Multigram Synthesis of a Water-Soluble Porphyrazine and Derived *seco* -Porphyrazine Labeling Agents. *Org Lett* 2007;9:5291–4. doi:10.1021/ol702481x.
- [114] Bellec N, Garrido Montalban A, Williams DBG, Cook AS, Anderson ME, Feng X, *et al.* Porphyrzinediols: Synthesis, Characterization, and Complexation to Group IVB Metallocenes. *J Org Chem* 2000;65:1774–9. doi:10.1021/jo9916840.
- [115] Wierzchowski M, Sobotta L, Skupin-Mrugalska P, Kruk J, Jusiak W, Yee M, *et al.* Phthalocyanines functionalized with 2-methyl-5-nitro-1H-imidazolethoxy and 1,4,7-trioxanonyl moieties and the effect of metronidazole substitution on photocytotoxicity. *J Inorg Biochem* 2013;127:62–72. doi:10.1016/j.jinorgbio.2013.06.012.
- [116] Montalban AG, Lange SJ, Beall LS, Mani NS, Williams DJ, White AJP, *et al.* Seco-Porphyrazines: Synthetic, Structural, and Spectroscopic Investigations. *J Org Chem* 1997;62:9284–9. doi:10.1021/jo971599x.
-

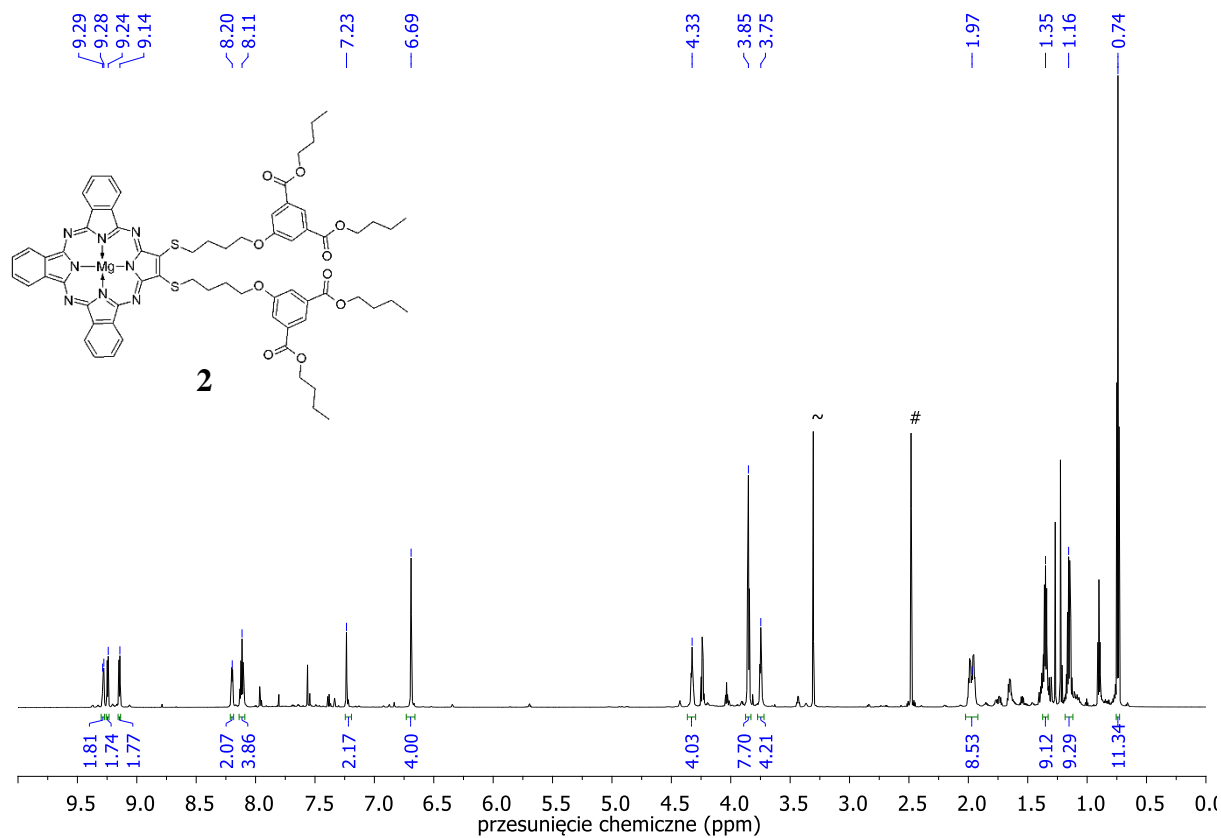
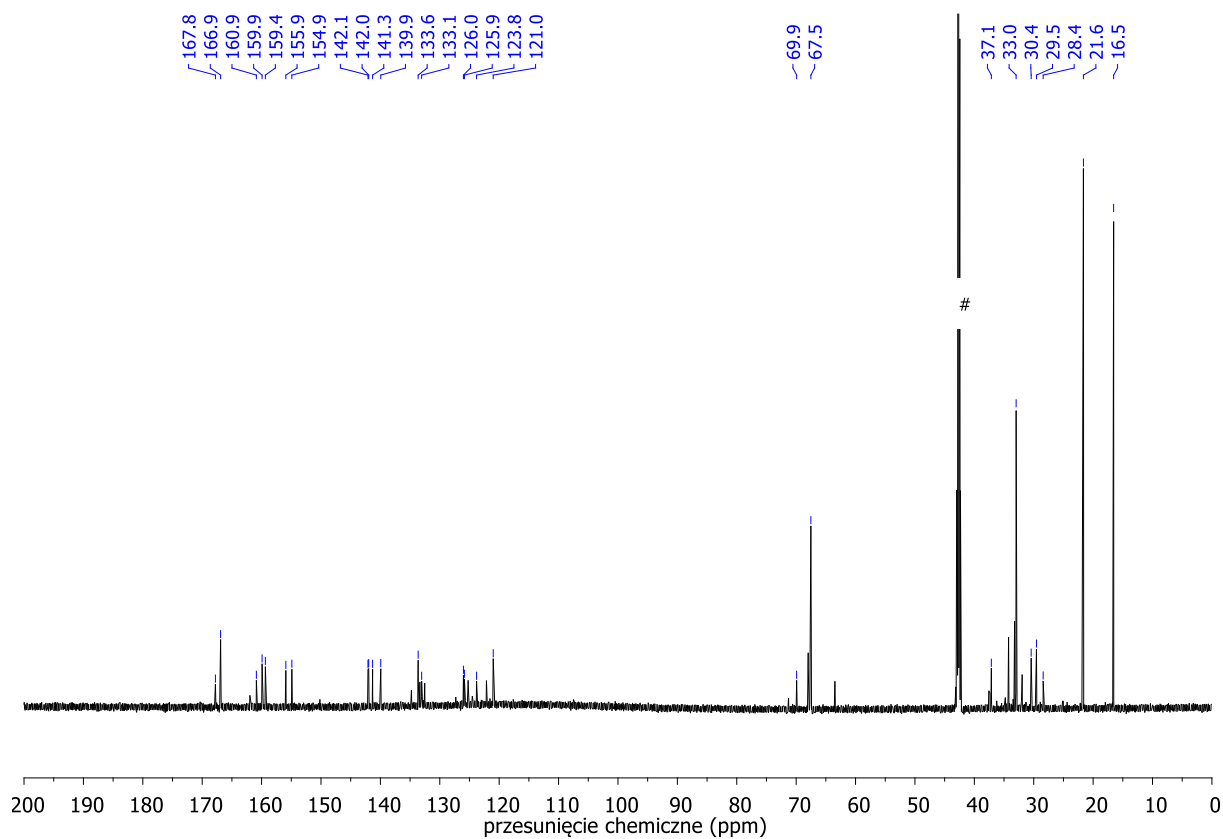
-
- [117] Schramm CJ, Hoffman BM. Octakis(alkylthio)tetraazaporphyrins. *Inorg Chem* 1980;19:383–5. doi:10.1021/ic50204a020.
- [118] Osaka I, McCullough RD. Advances in Molecular Design and Synthesis of Regioregular Polythiophenes. *Acc Chem Res* 2008;41:1202–14. doi:10.1021/ar800130s.
- [119] Wieczorek E, Mlynarczyk DT, Kucinska M, Długaszewska J, Piskorz J, Popenda L, *et al.* Photophysical properties and photocytotoxicity of free and liposome-entrapped diazepinoporphyrazines on LNCaP cells under normoxic and hypoxic conditions. *Eur J Med Chem* 2018;150:64–73. doi:10.1016/j.ejmech.2018.02.064.
- [120] Tillo A, Mlynarczyk DT, Popenda L, Wicher B, Kryjewski M, Szczolko W, *et al.* Synthesis and singlet oxygen generation of pyrazinoporphyrazines containing dendrimeric aryl substituents. *New J Chem* 2017;41:3586–94. doi:10.1039/C6NJ03886G.
- [121] Jamaat PR, Davarani SSH, Fumani NS, Masoumi L, Safari N. A new facile electrochemical method for functionalization of porphyrin. *J Porphyr Phthalocyanines* 2008;12:85–93. doi:10.1142/S108842460800011X.
- [122] Uslu Kobak RZ, Öztürk ES, Koca A, Gül A. The synthesis and cyclotetramerisation reactions of aryloxy-, arylalkyloxy-substituted pyrazine-2,3-dicarbonitriles and spectroelectrochemical properties of octakis(hexyloxy)-pyrazinoporphyrazine. *Dyes Pigments* 2010;86:115–22. doi:10.1016/j.dyepig.2009.12.003.
- [123] Mørkved EH, Holmaas LT, Kjøsén H, Hvistendahl G, Leskelä M, Polamo M, *et al.* Preparation of Magnesium Azaphthalocyanines by Cyclotetramerisation of S-Substituted 4,5-Disulfanylpurazine-2,3-dicarbonitriles. *Acta Chem Scand* 1996;50:1153–6. doi:10.3891/acta.chem.scand.50-1153.
- [124] Seotsanyana-Mokhosi I, Kuznetsova N, Nyokong T. Photochemical studies of tetra-2,3-pyridinoporphyrazines. *J Photochem Photobiol Chem* 2001;140:215–22. doi:10.1016/S1010-6030(01)00427-0.
- [125] Chełminiak-Dudkiewicz D, Ziegler-Borowska M, Stolarska M, Sobotta L, Falkowski M, Mielcarek J, *et al.* The chitosan – Porphyrine hybrid materials and their photochemical properties. *J Photochem Photobiol B* 2018;181:1–13. doi:10.1016/j.jphotobiol.2018.02.021.
- [126] Michel SLJ, Hoffman BM, Baum SM, Barrett AGM. Peripherally Functionalized Porphyrines: Novel Metallomacrocycles with Broad, Untapped Potential. *Prog. Inorg. Chem.*, Wiley-Blackwell; 2002, p. 473–590. doi:10.1002/0471227110.ch8.
-

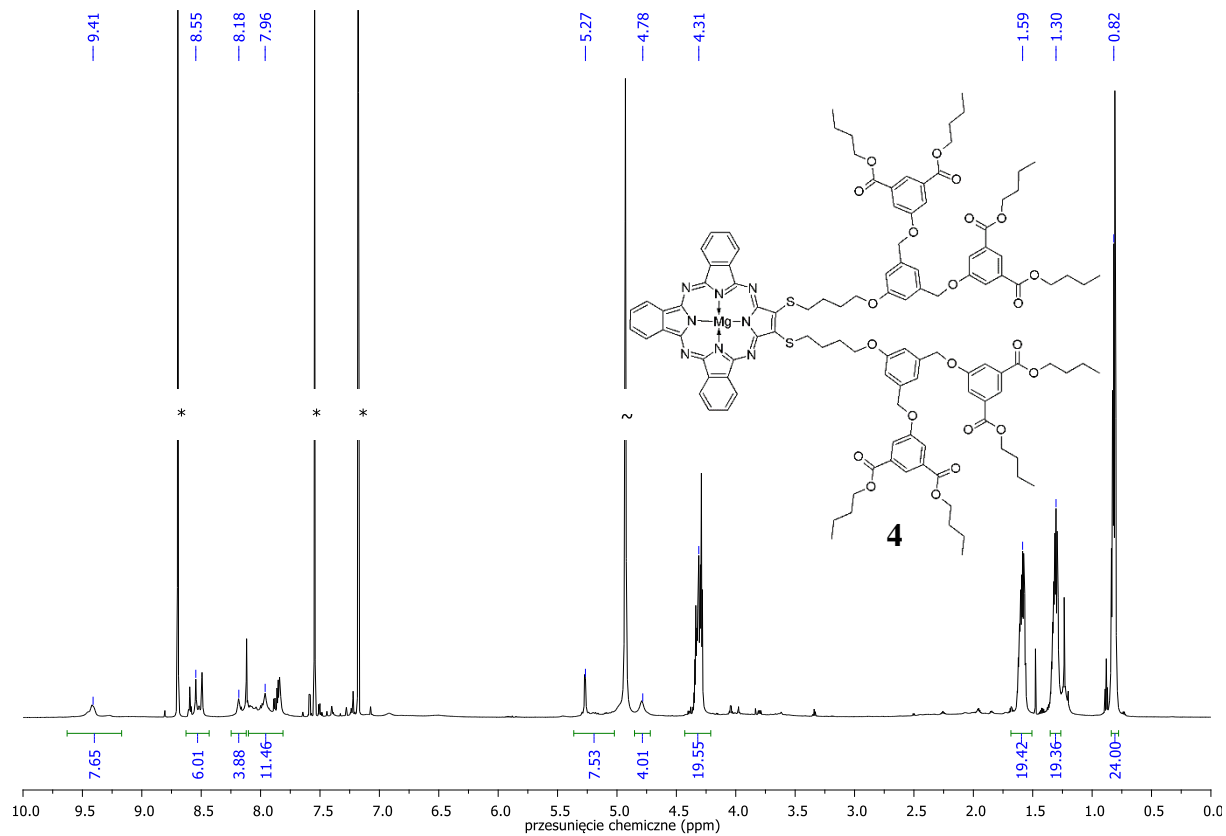
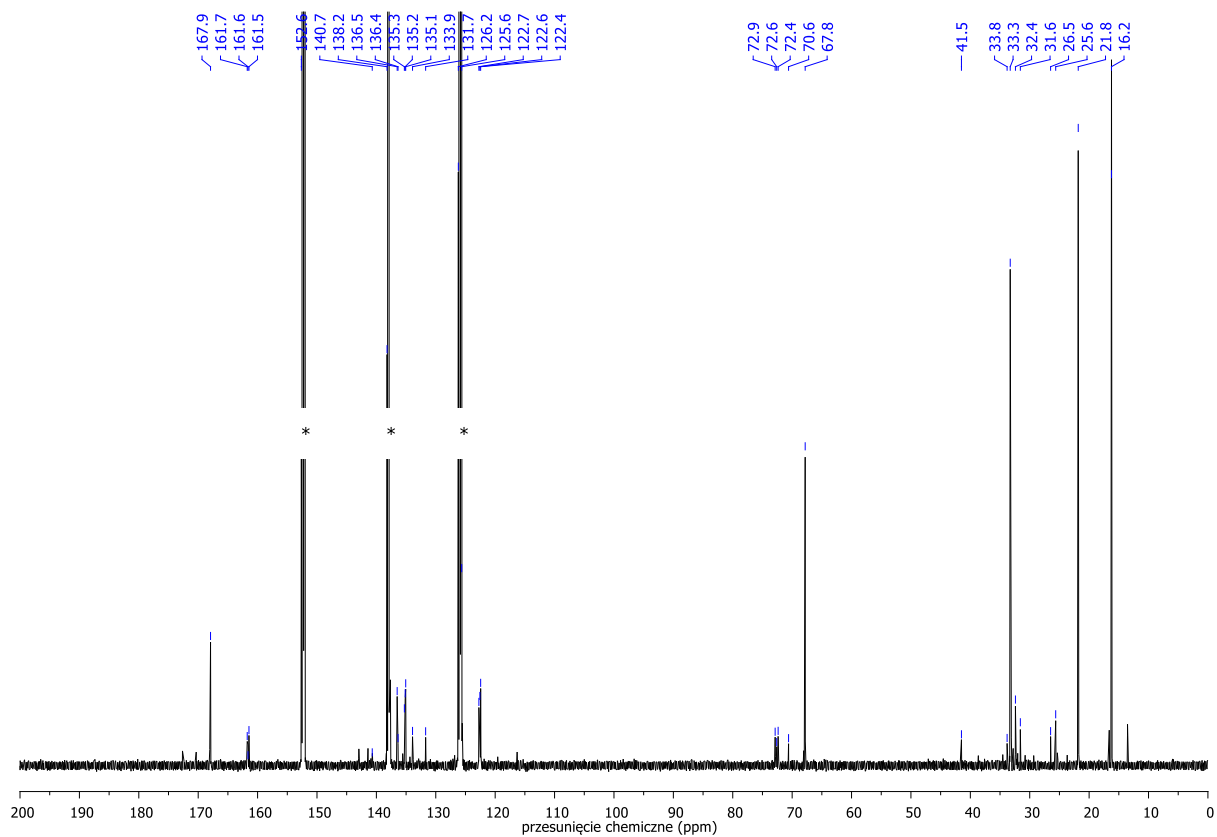
-
- [127] Alves E, Faustino MA, Neves MG, Cunha A, Tome J, Almeida A. An insight on bacterial cellular targets of photodynamic inactivation. *Future Med Chem* 2014;6:141–64. doi:10.4155/fmc.13.211.
- [128] Jori G, Fabris C, Soncin M, Ferro S, Coppelotti O, Dei D, *et al.* Photodynamic therapy in the treatment of microbial infections: Basic principles and perspective applications. *Lasers Surg Med* 2006;38:468–81. doi:10.1002/lsm.20361.
- [129] Długaszewska J, Szczolko W, Koczorowski T, Skupin-Mrugalska P, Teubert A, Konopka K, *et al.* Antimicrobial and anticancer photodynamic activity of a phthalocyanine photosensitizer with N-methyl morpholiniumethoxy substituents in non-peripheral positions. *J Inorg Biochem* 2017;172:67–79. doi:10.1016/j.jinorgbio.2017.04.009.

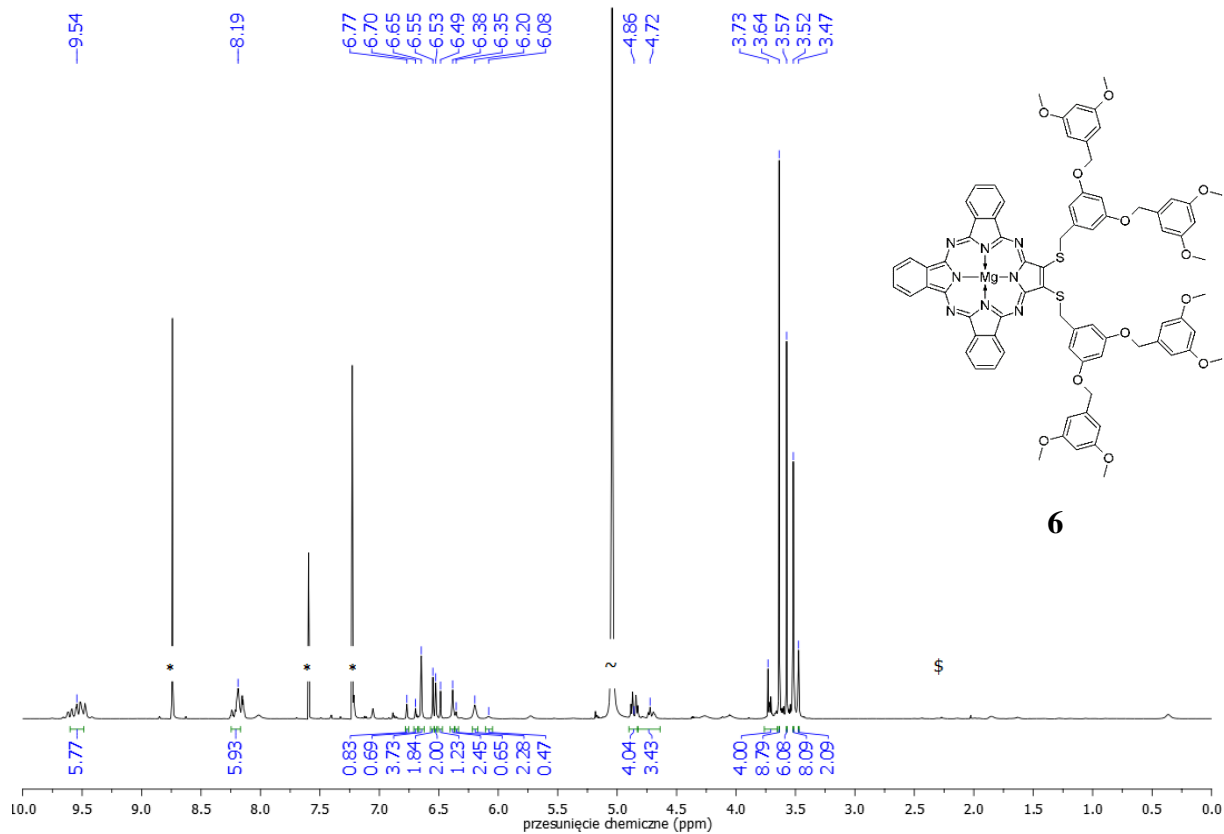
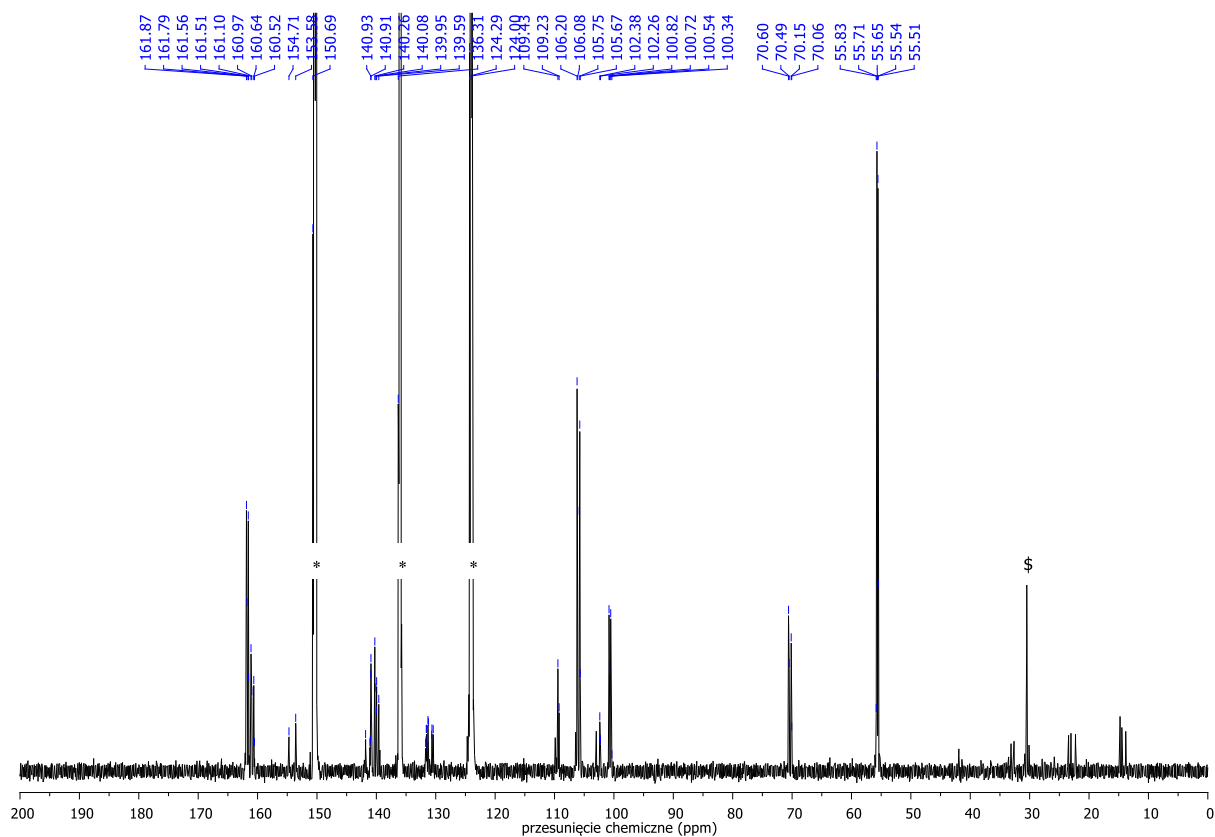
12. Supplement

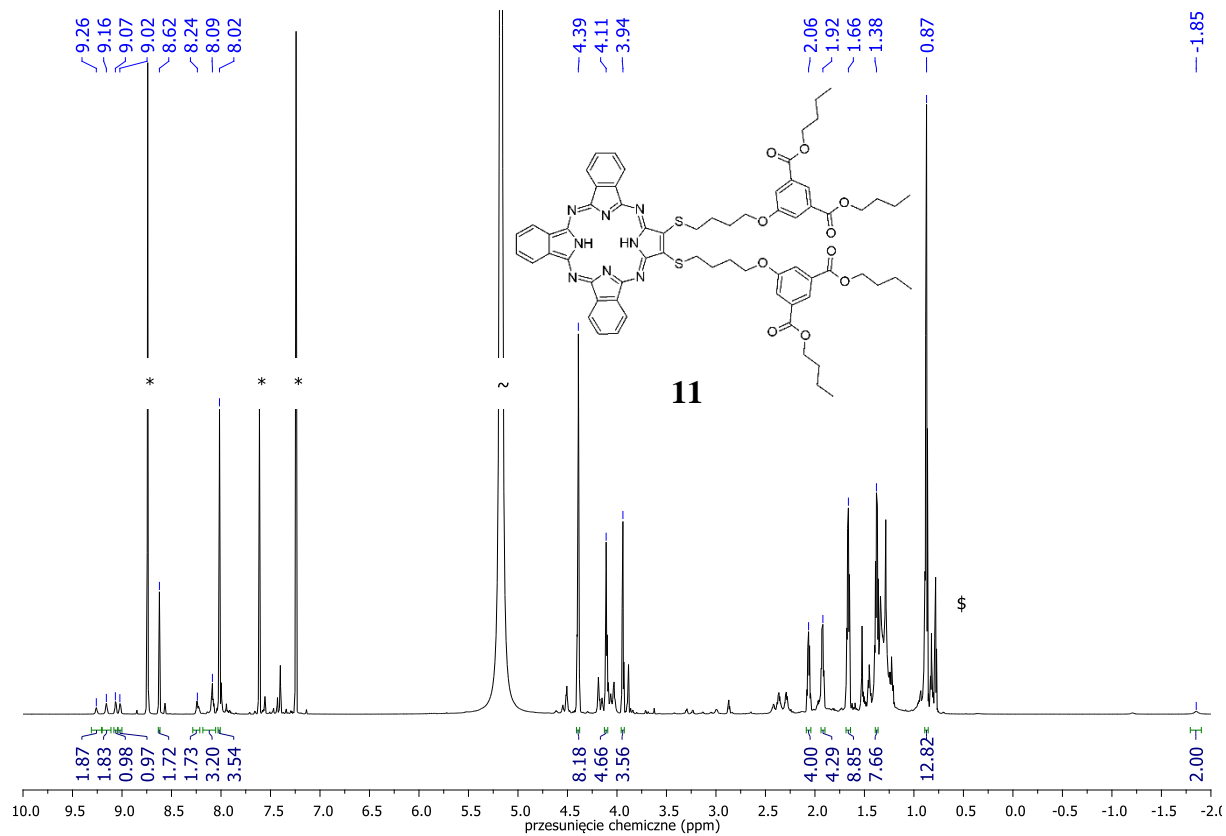
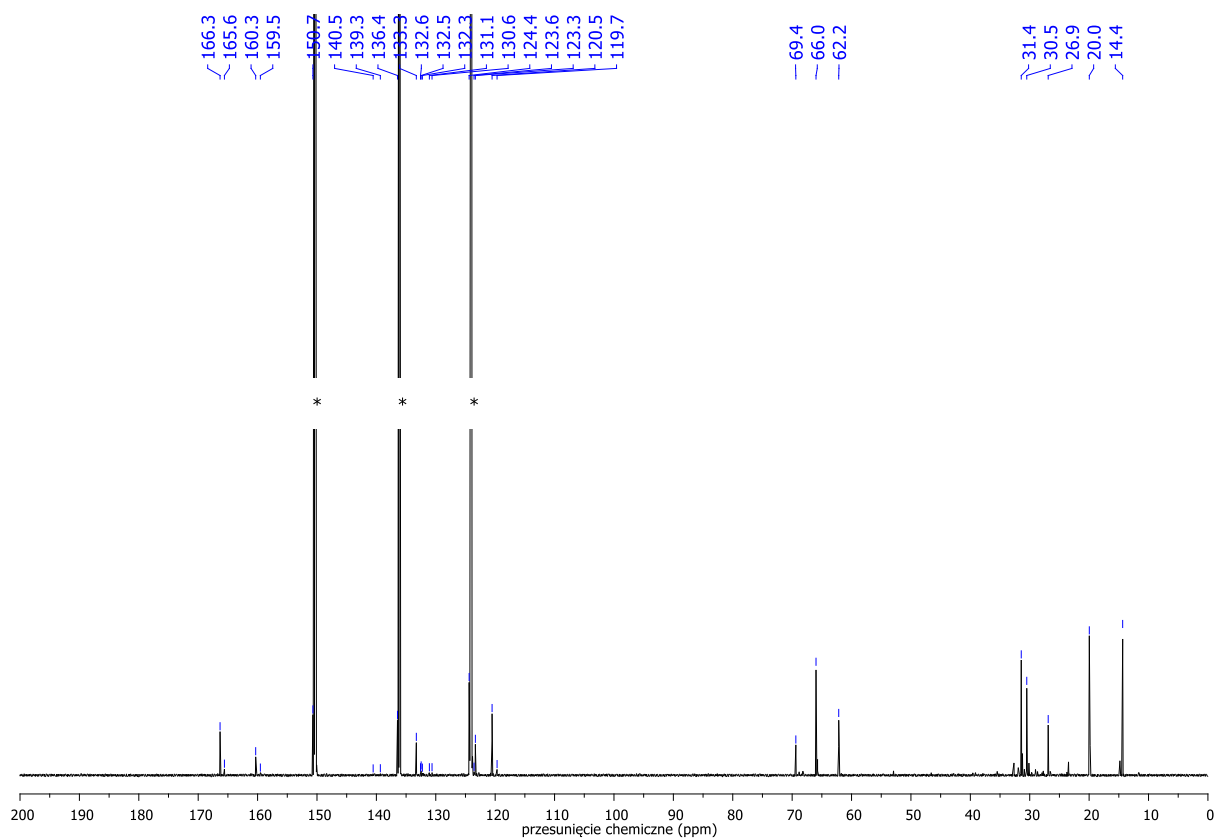
W suplemencie zastosowano następujące oznaczenia sygnałów rozpuszczalników występujących w widmach NMR:

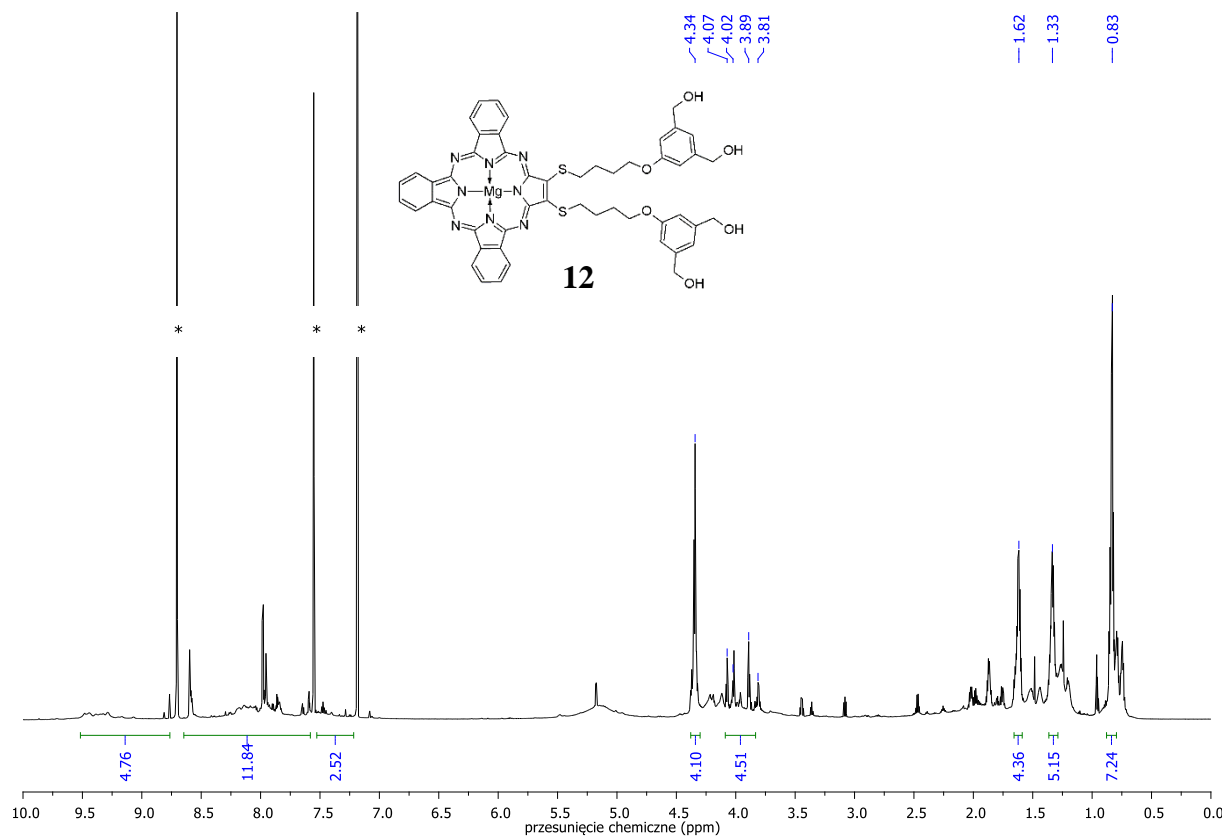
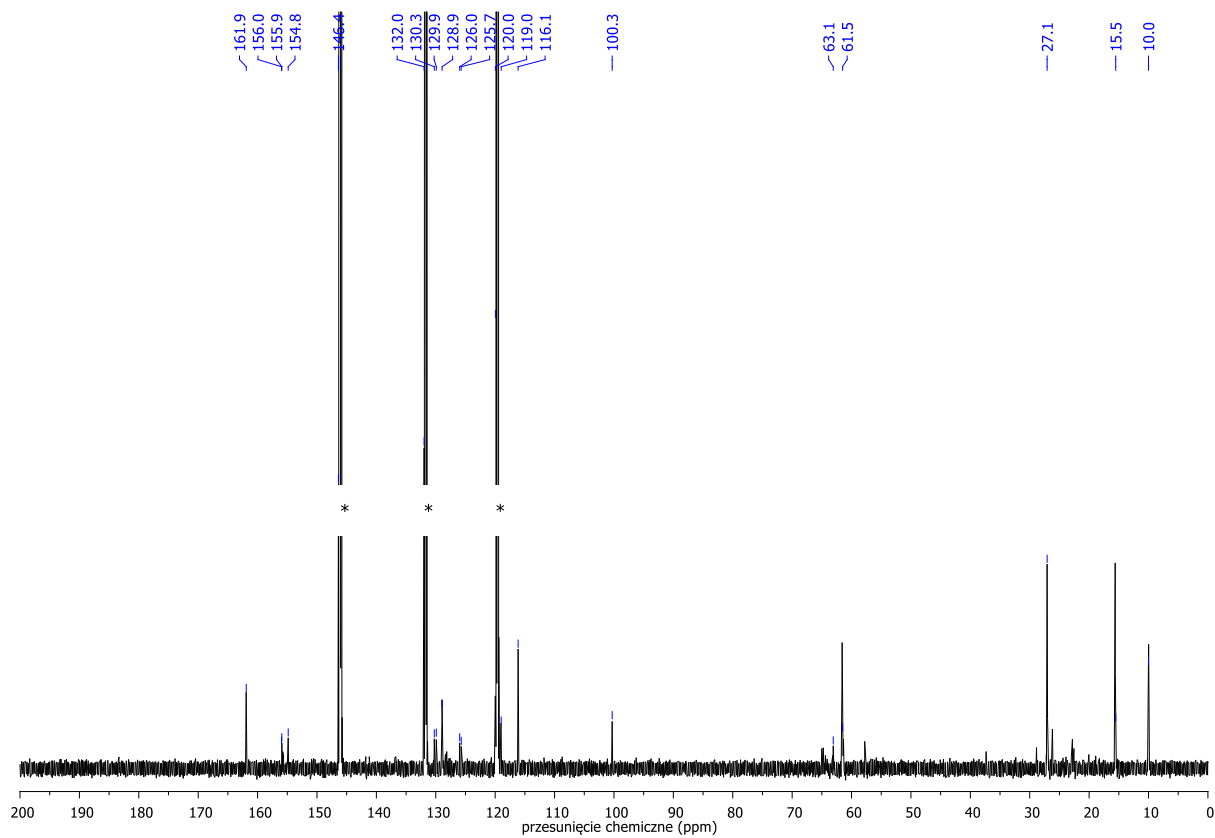
*	–	sygnał reszkowy pirydyny- d_5
#	–	sygnał reszkowy DMSO- d_6
~	–	woda (tylko w widmach ^1H NMR)
%	–	chloroform
\$	–	heksan

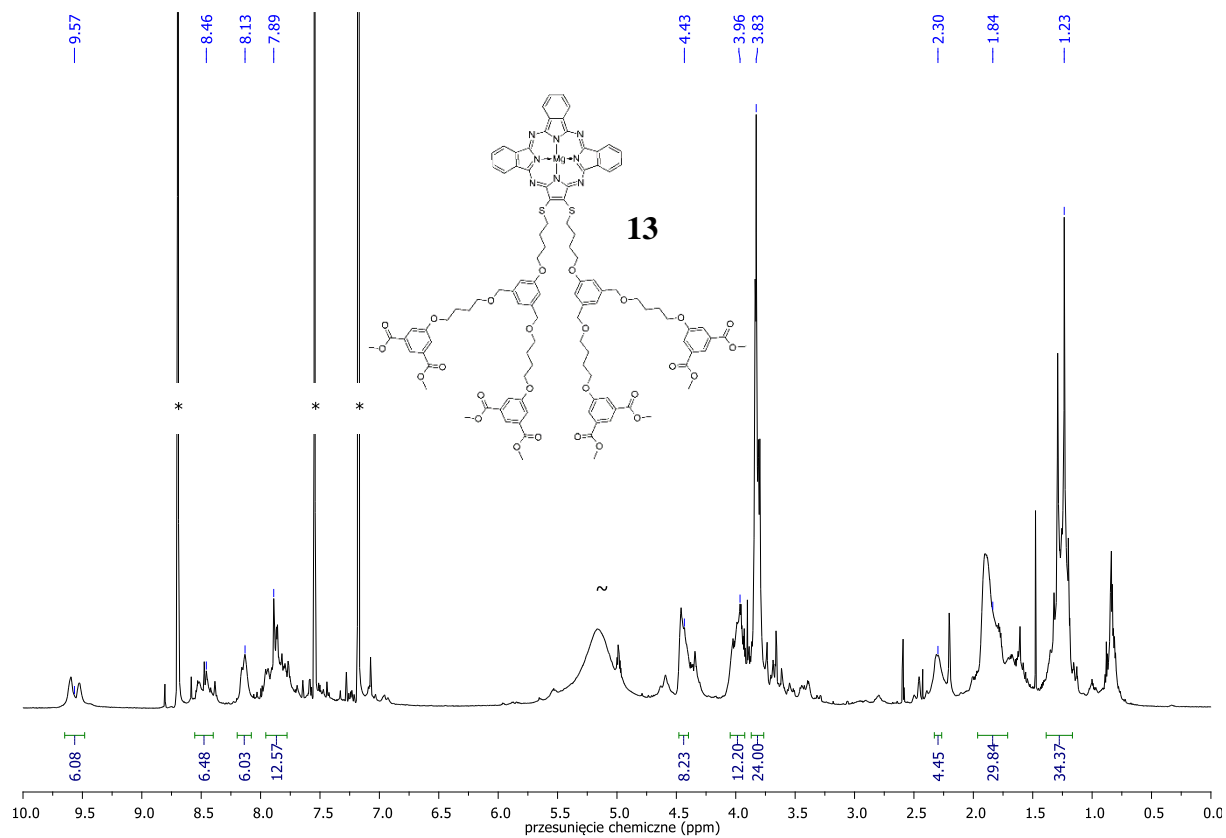
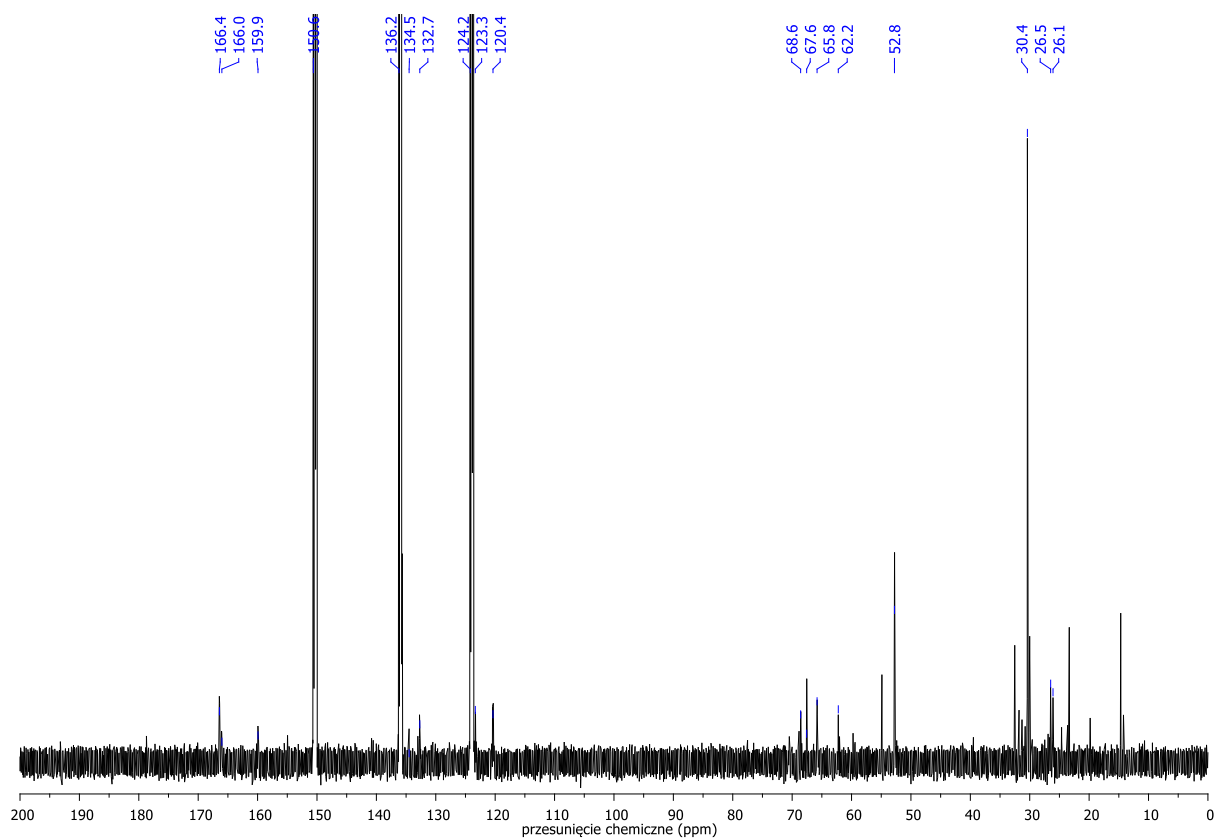
Widmo ^1H NMR związku **2**.Widmo ^{13}C NMR związku **2**.

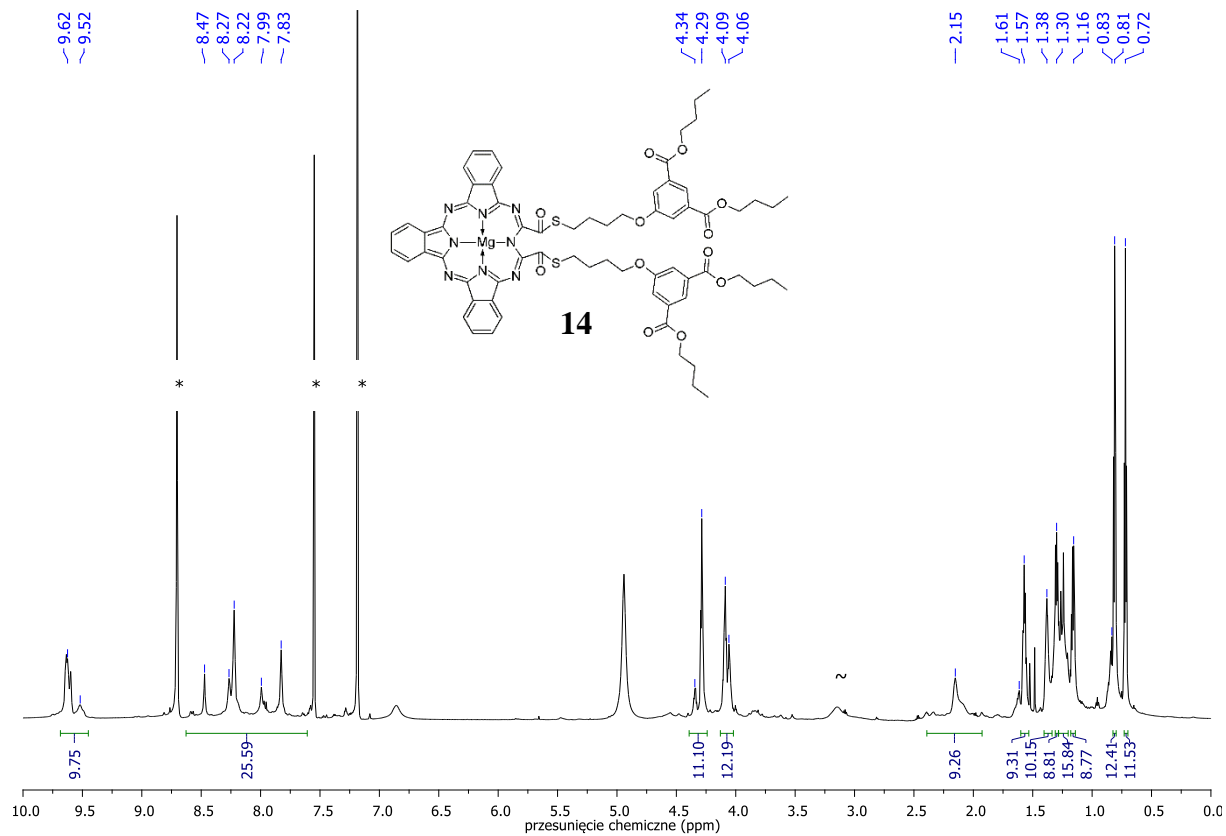
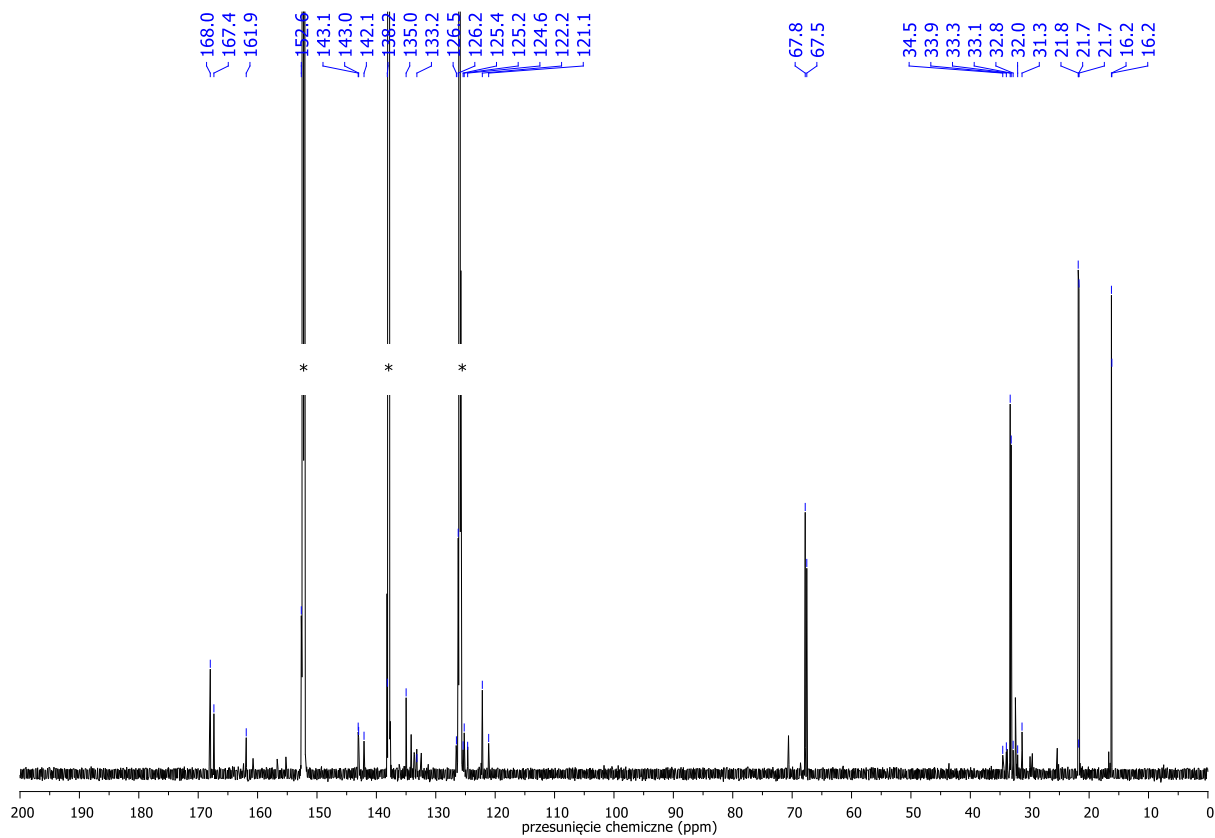
Widmo ^1H NMR związku **4**.Widmo ^{13}C NMR związku **4**.

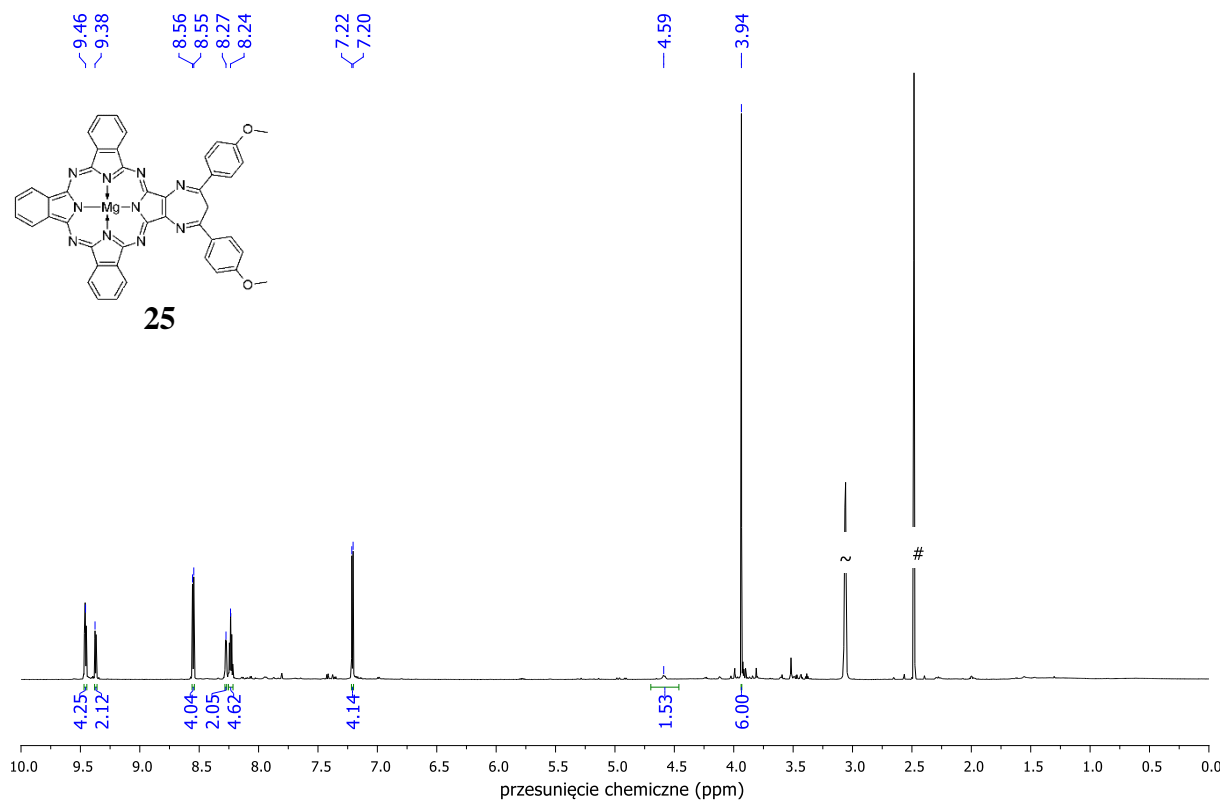
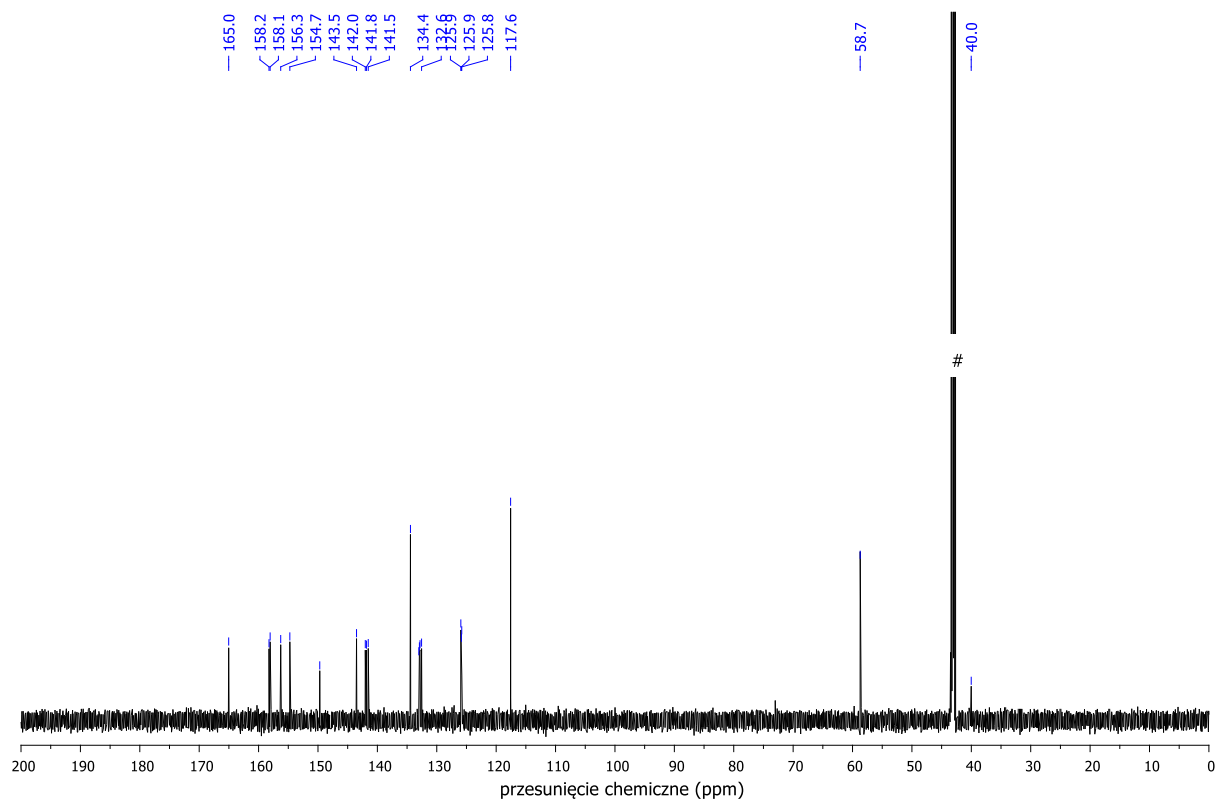
Widmo ^1H NMR związku **6**.Widmo ^{13}C NMR związku **6**.

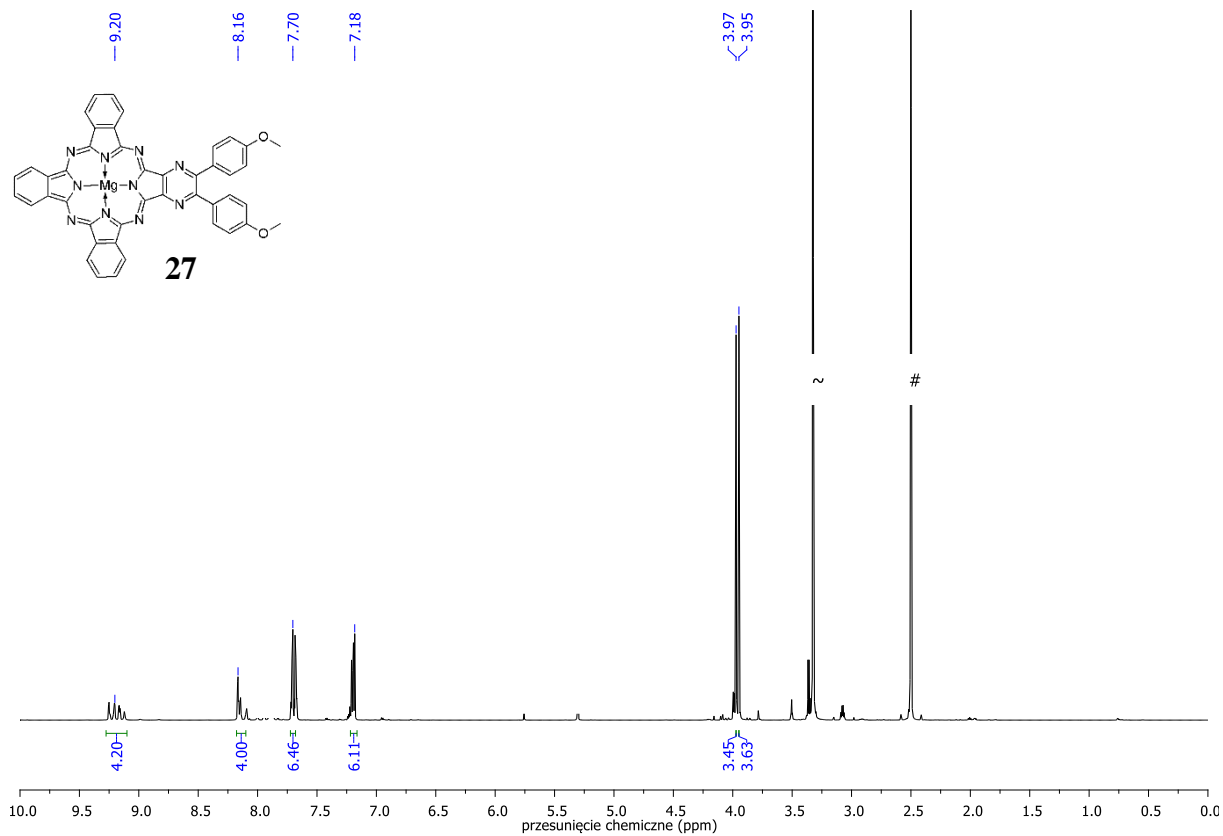
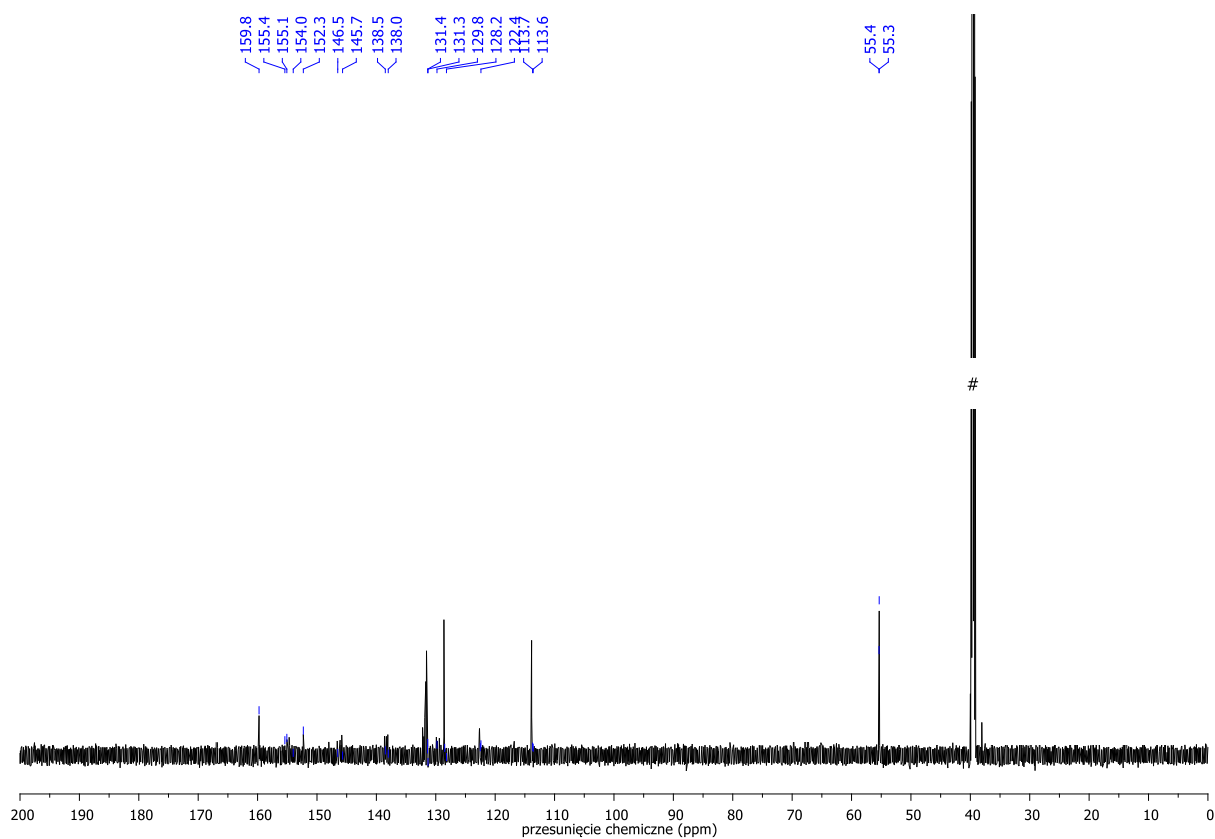
Widmo ^1H NMR związku **11**.Widmo ^{13}C NMR związku **11**.

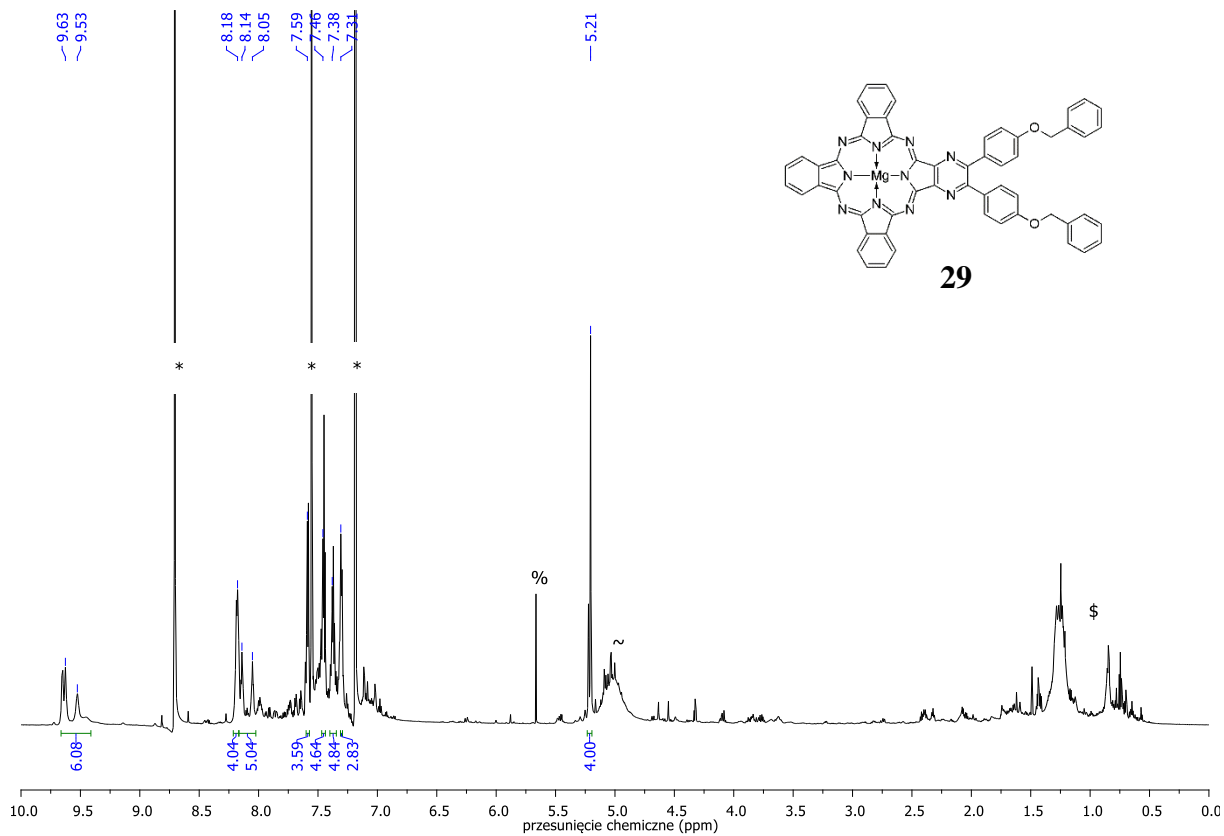
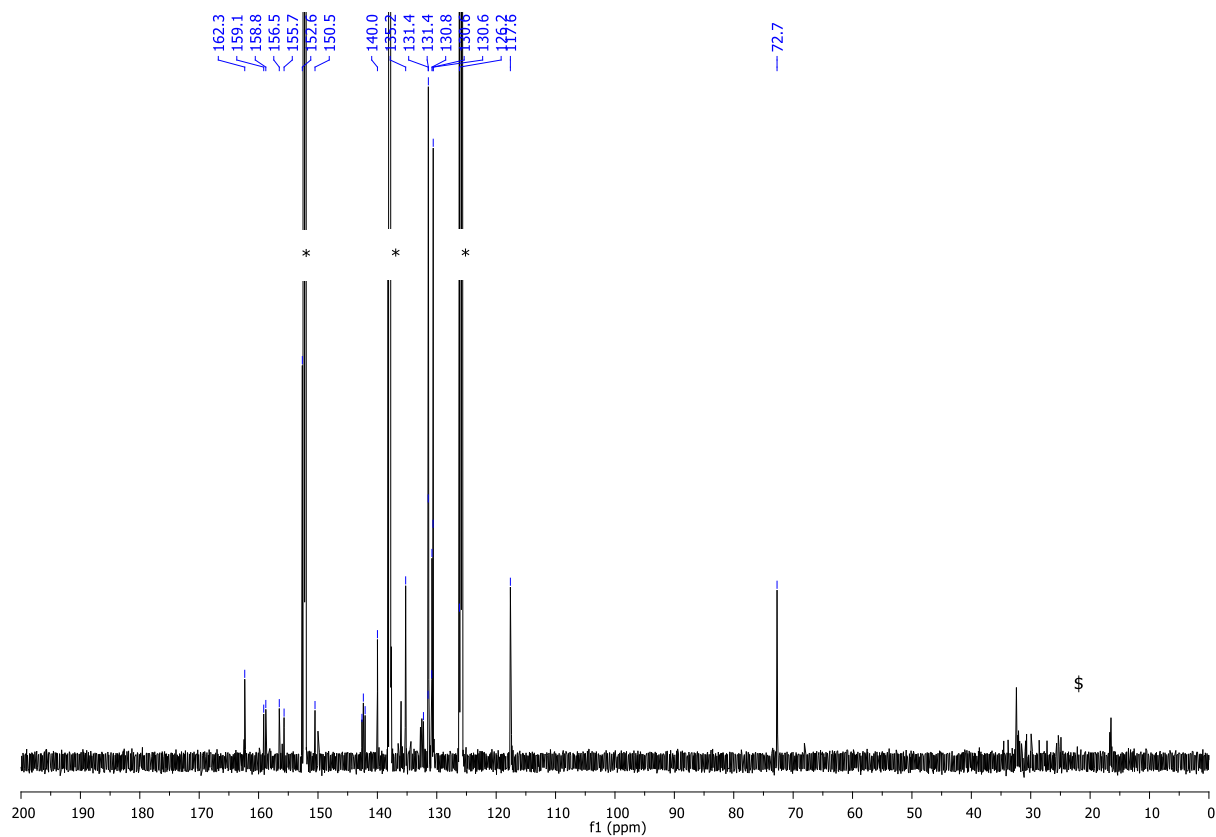
Widmo ^1H NMR związku **12**.Widmo ^{13}C NMR związku **12**.

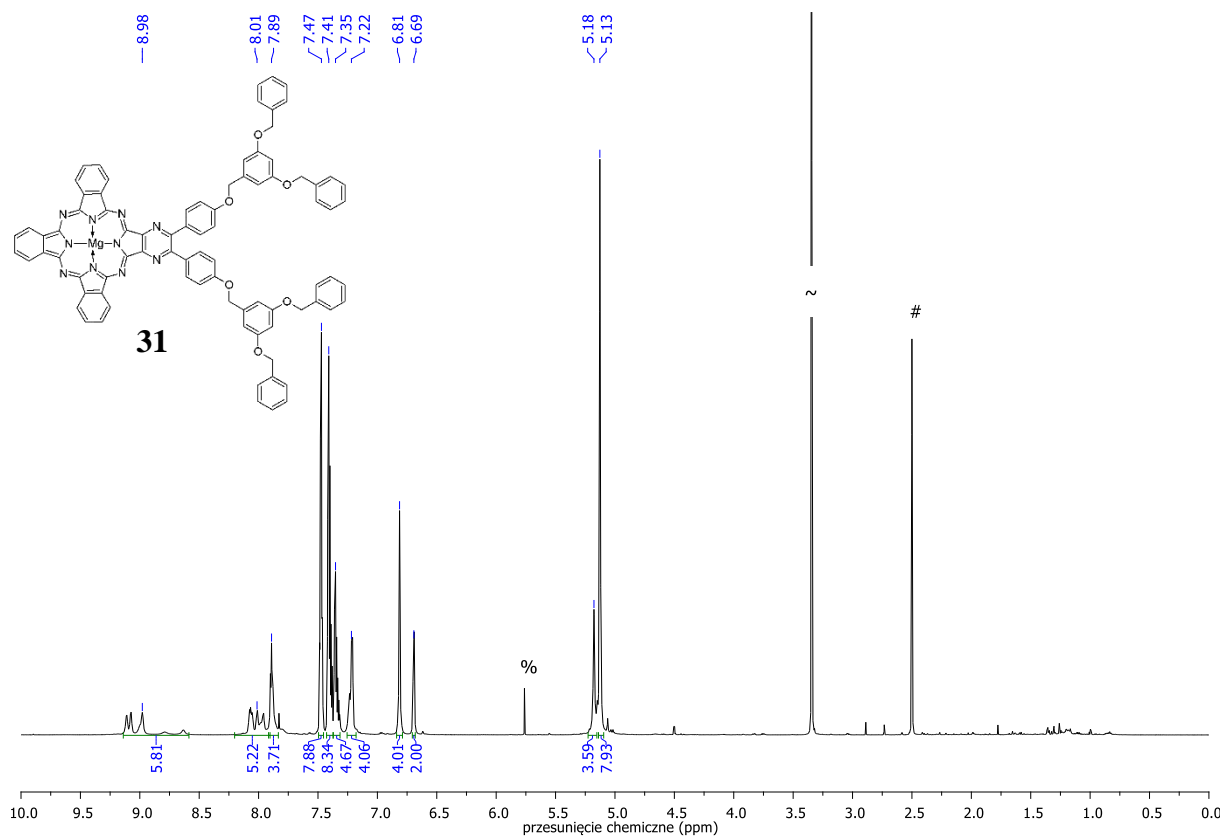
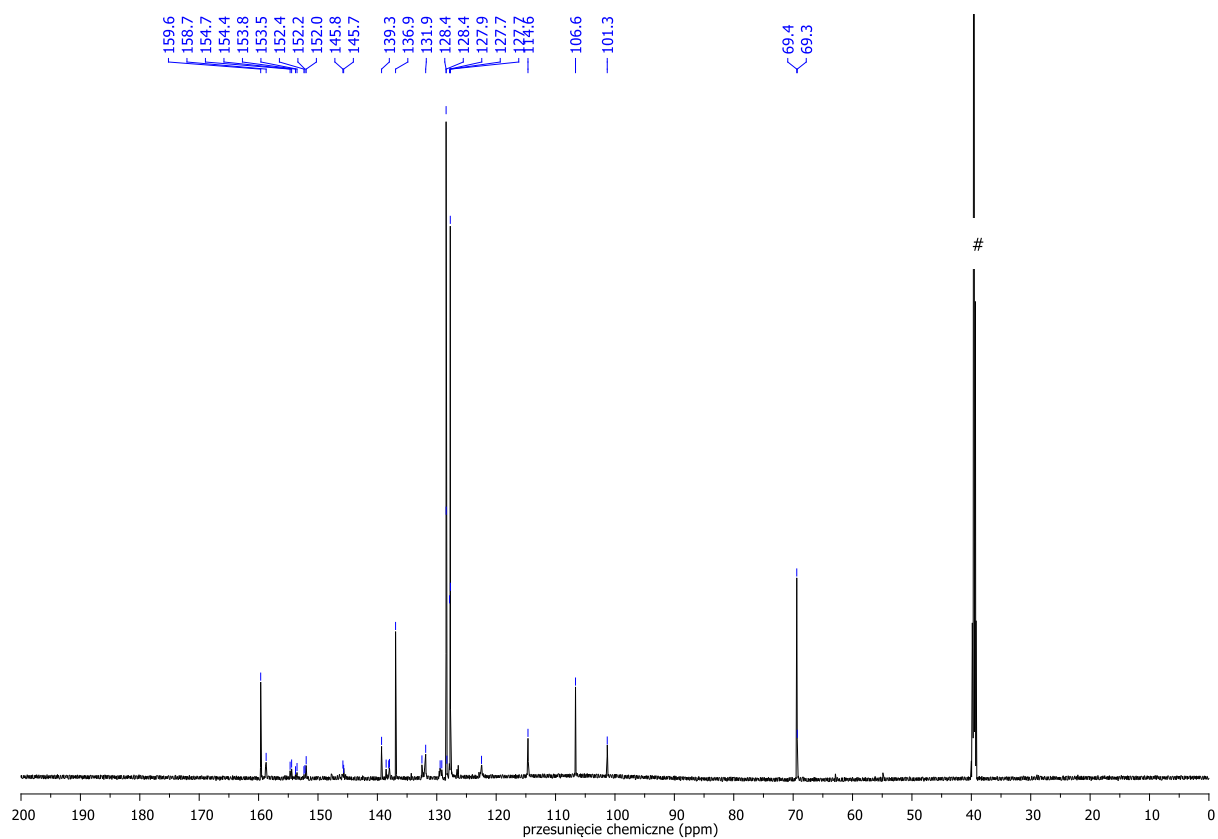
Widmo ^1H NMR związku **13**.Widmo ^{13}C NMR związku **13**.

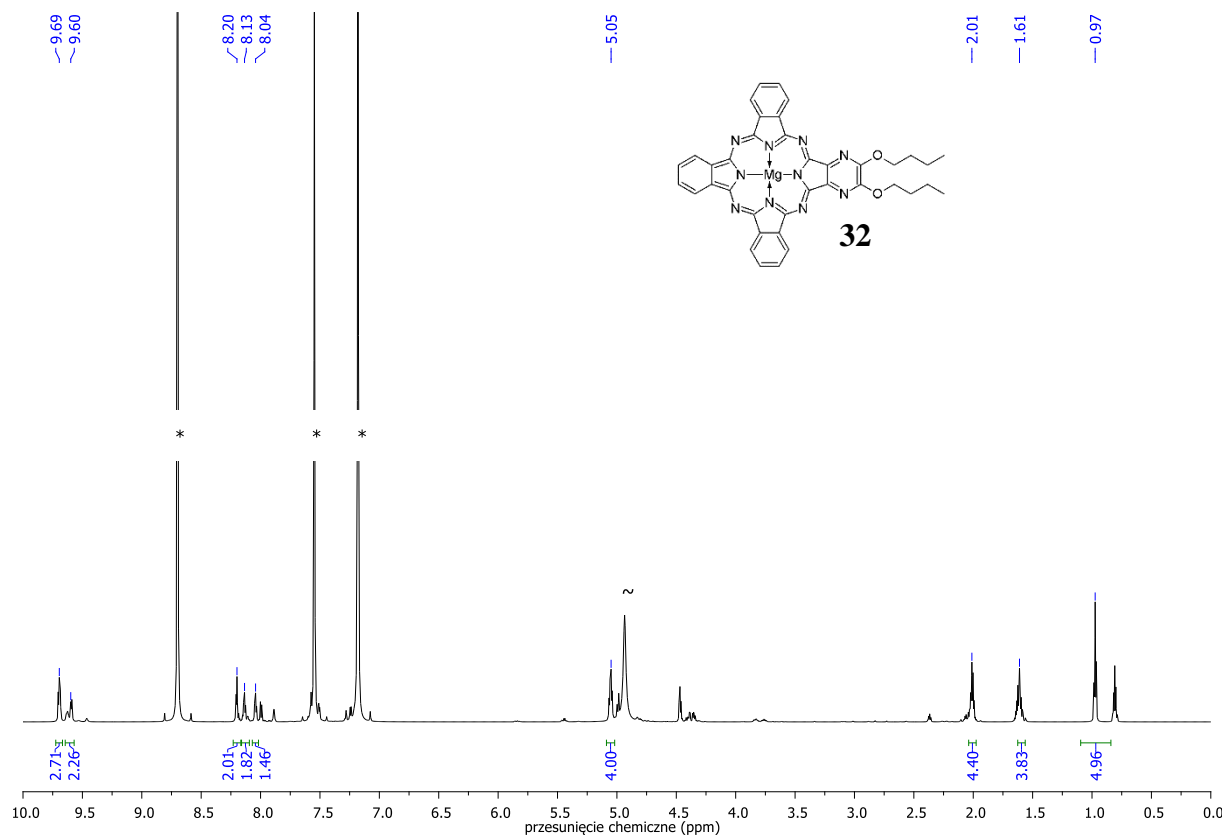
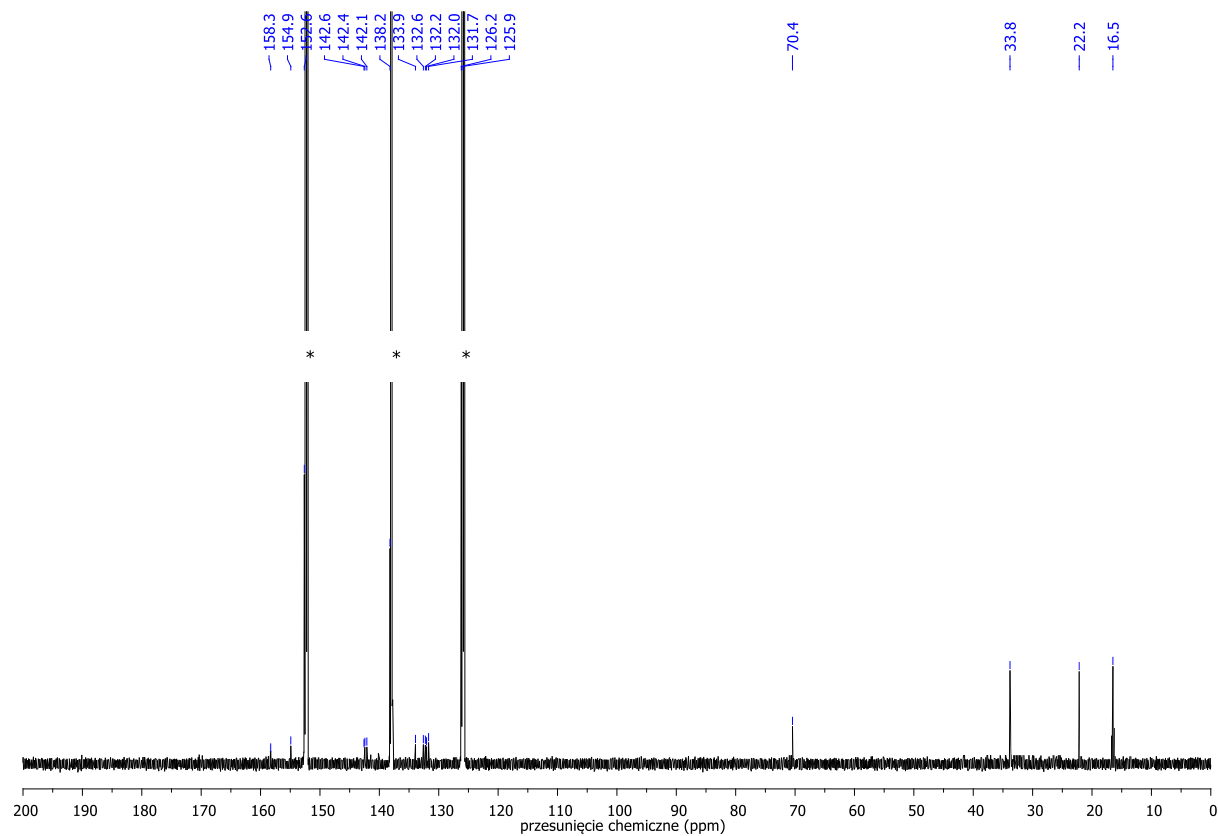
Widmo ^1H NMR związku 14.Widmo ^{13}C NMR związku 14.

Widmo ^1H NMR związku 25.Widmo ^{13}C NMR związku 25.

Widmo ^1H NMR związku **27**.Widmo ^{13}C NMR związku **27**.

Widmo ^1H NMR związku **29**.Widmo ^{13}C NMR związku **29**.

Widmo ^1H NMR związku **31**.Widmo ^{13}C NMR związku **31**.

Widmo ^1H NMR związku **32**.Widmo ^{13}C NMR związku **32**.

Dariusz Młynarczyk
Imię i nazwisko

Poznań,.....

OŚWIADCZENIE

Niniejszym oświadczam, że jestem autorem rozprawy doktorskiej pt.:

„Tribenzoporfirazyny o potencjalnym zastosowaniu w terapii fotodynamicznej - synteza i charakterystyka fizykochemiczna”.

Informuję, że udzielam/~~nie udzielam~~¹ nieodpłatnie Uniwersytetowi Medycznemu w Poznaniu (UMP) licencji niewyłącznej do korzystania z ww. pracy bez ograniczeń czasowych i terytorialnych na następujących polach eksploatacji²

- przechowywanie i archiwizowanie pracy w zakresie wprowadzania jej do pamięci komputera oraz do jej zwielokrotniania, udostępniania i obrotu w formie elektronicznej
- udostępnienie pracy w Czytelni Naukowej Biblioteki Głównej UMP

Jednocześnie informuję, że³

- wyrażam zgodę na nieodpłatne opublikowanie całości manuskryptu mojej pracy doktorskiej w Wielkopolskiej Bibliotece Cyfrowej (WBC)
- nie wyrażam zgody na opublikowanie manuskryptu mojej pracy doktorskiej w Wielkopolskiej Bibliotece Cyfrowej, ponieważ zobowiązuję się
 - w terminie nie dłuższym niż 6 miesięcy od daty podpisania niniejszego oświadczenia do przygotowania publikacji opartej na wynikach pracy doktorskiej i wysłania do wydawnictwa,
 - opublikowania ww. wyników w okresie kolejnych 18 miesięcy,
 - afiliowania ww. pracy na rzecz Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu
- nie wyrażam zgody na opublikowanie manuskryptu mojej pracy doktorskiej z uwagi na zawarty w niej niejawnny charakter informacji

Przyjąłem do wiadomości fakt obowiązku niezwłocznego poinformowania Dziekanatu Wydziału **Farmaceutycznego** UMP o wysłaniu manuskryptu do wydawnictwa oraz przyjęciu publikacji do druku⁴. W przypadku niepoinformowania Dziekanatu w terminie o ww. faktach zezwalam Uniwersytetowi Medycznemu w Poznaniu na opublikowanie całości mojej pracy doktorskiej w WBC⁵.

.....
Data i podpis

¹ niepotrzebne skreślić

² właściwe pola zaznaczyć

³ należy wybrać jedną z trzech podanych niżej możliwości

⁴ dotyczy wyłącznie sytuacji, w której autor rozprawy doktorskiej prosi o odroczenie publikacji manuskryptu w WBC z uwagi na zamiar opublikowania zawartych w niej wyników w czasopiśmie/czasopismach naukowych

⁵ Art. 14, ust. 1, Ustawa o prawie autorskim i prawach pokrewnych z dnia 4 lutego 1994 r. (Dz.U. 1994 Nr 24 poz. 83)

OŚWIADCZENIE

Niniejszym oświadczam, iż jestem autorem pracy doktorskiej pt.:

„Tribenzoporfirazy o potencjalnym zastosowaniu w terapii fotodynamicznej - synteza i charakterystyka fizykochemiczna”

Praca ta została przeze mnie napisana samodzielnie (bez jakiegokolwiek udziału osób trzecich), przy wykorzystaniu wykazanej w pracy literatury przedmiotu i materiałów źródłowych, stanowi ona pracę oryginalną nie narusza praw autorskich oraz dóbr osobistych osób trzecich i jest wolna od jakichkolwiek zapożyczeń.

Oświadczam również, że wymieniona praca nie zawiera danych i informacji, które zostały uzyskane w sposób niedozwolony prawem oraz nie była dotychczas przedmiotem żadnej urzędowej procedury związanej z uzyskaniem tytułu doktora nauk farmaceutycznych.

Dariusz Młynarczyk

.....