

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

Zveřejněná podle §31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

2019-743

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.:

C07D 307/83 (2006.01)
C07D 307/80 (2006.01)
C07D 307/79 (2006.01)
C09K 15/08 (2006.01)
A61Q 11/02 (2006.01)
A61Q 11/00 (2006.01)

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

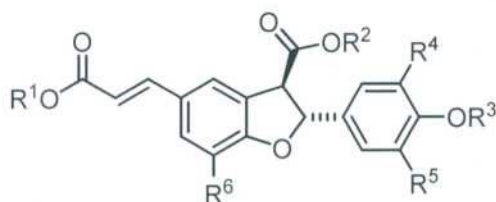
(22) Přihlášeno: **04.12.2019**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **16.06.2021**
(Věstník č. 24/2021)

- (71) Přihlašovatel:
Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc, CZ
- (72) Původce:
RNDr. Jiří Pospíšil, Ph.D., Olomouc, Neředín, CZ
Jiří Grúz, Bohuňovice, CZ
prof. Ing. Miroslav Strnad, CSc., DSc., Olomouc,
Neředín, CZ
RNDr. Lucie Janovská, Ph.D., Olomouc, Nové
Sady, CZ
prof. MUDr. Milan Kolář, Ph.D., Olomouc, Nové
Sady, CZ
Mgr. Lucie Rárová, Ph.D., Příbor, CZ
- (74) Zástupce:
HARBER IP s.r.o., Dukelských hrdinů 567/52,
170 00 Praha 7, Holešovice

(54) Název přihlášky vynálezu:
**Fenolické dihydrobenzofuranové deriváty,
léčebné a kosmetické přípravky obsahující
tyto deriváty a jejich použití**

- (57) Anotace:
Vynález se týká nových dihydrobenzofuranových derivátů a jejich použití jako kosmetických přípravků a léčiv. Tyto sloučeniny mají antibakteriální, protizánětlivé a antioxidační vlastnosti. Vynález se také týká kosmetických prostředků, přednostně antibakteriálních zubních past a formulací pro ústní vodu, které obsahují tyto deriváty jako aktivní sloučeniny.



Fenolické dihydrobenzofuranové deriváty, léčebné a kosmetické přípravky obsahující tyto deriváty a jejich použití

5 Oblast techniky

Vynález se týká nové generace fenolických sloučenin na bázi dihydrobenzofuranových derivátů, jejich použití v kosmetických a léčebných aplikacích a přípravků obsahujících tyto deriváty.

10

Dosavadní stav techniky

Zubní plak je pevná a houževnatá usazenina bakterií ústní dutiny. Kalcifikace (mineralizace) zubního plaku vede k zubnímu kameni. Tvorba zubního kamene závisí na přítomnosti plaku. Plak se tvoří a roste na povrchu zubů, zejména v cervikálních a mezizubních oblastech a prasklinách, také na zubních výplních, korunách, mostech a protézách. Plak je hlavní příčinou zubního kazu, plak a zubní kámen jsou příčinou zánětlivé destrukce gingiválních a periodontálních struktur podporujících zub (periodontitida).

Pro snížení tvorby plaku a výsledných chorob způsobených plakem bylo navrženo mnoho různých chemických činidel. Mechanické odstranění plaku je běžnou součástí ústní hygieny, ale průměrné čištění zubů vede pouze k částečnému odstranění plaku. Proto je indikováno další použití chemických antibakteriálních látek inhibujících tvorbu plaku v nepřístupných oblastech ústní dutiny. Takovými germicidy jsou mezi jinými fenolické sloučeniny, halogenované bis-fenoly (např. Hexachlorofen), organické sloučeniny rtuti, hydroxychinolin, jodované estery hydroxybenzoových kyselin, chloramin T a povrchově aktivní sloučeniny (detergenty). Tyto germicidy jsou vynikající laboratorní dezinfekční prostředky, ale relativně špatné inhibitory plaku *in vivo* na rozdíl od kationtových organických antibakteriálních činidel, např. vodorozpustné soli cetylpyridinia, kvartérních amoniových bází (např. benzalkoniumchlorid), alkylaminů (např. fluorid N,N,N'-tris-(2-hydroxyethyl)-N'-oktadecyl-1,3-diaminopropan) a kationtové amidiny, např. ve vodě rozpustné soli chlorhexidinů, jako je Hibitane, Alexidin a Vantocil.

Účinek ústních vod používaných denně a obsahujících cetylpyridiniumchlorid (Carter, HG, Barnes, GP, J Prev Dent 2, 10, 1975; Ciancio, SG a kol., J Dent Res 54 A, abstrakt 585, 1975), cetylpyridinium chlorid a kvartérní amoniovou bází (Domiphen bromid) (Barnes, GP a kol. J Periodontol 47, 419, 1976) nebo samotný benzethonium chlorid (Volpe, AR a kol. J Dent Res 48, 832, 1969) na tvorbu plaku je ve srovnání s amidiny relativně mírný. To je zřejmé při srovnání ústních vod obsahujících chlorhexidin diglukonát s jinými antibakteriálními ústními vodami (Gjerme, P. a kol., J Periodont Res 5, 102, 1970; Mühlemann, HR a kol., Helv Odont Acta 17, 89, 1973), včetně hexetidinu (Bergenholtz, A., Hänström, L., Community Dent Oral Epidemiol 2, 70, 1974). Bohužel, výplachy úst amidiny rychle vytvoří kosmeticky nepříjemné hnědé zbarvení zubů (Flötra, L. a kol. Scand J Dent Res 79, 119, 1971). Bylo také zjištěno, že kationtové detergenty a amidiny dráždí ústní sliznici, i když jsou použity v oplachovacích roztocích v doporučených terapeutických koncentracích (Flötra, L., J Periodont Res 8, Supp. 12, 41, 1973).

45

Podstata vynálezu

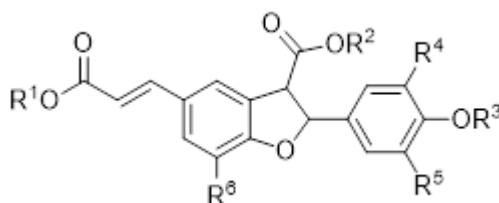
Cílem tohoto vynálezu je poskytnout novou generaci fenolických sloučenin vykazujících buď silné antioxidační vlastnosti, nebo vykazující schopnost regulovat expresi důležitého stresového transkripčního faktoru NRF2. Nová generace dihydrobenzofuranových derivátů jsou účinné látky s aplikacemi při prevenci a léčbě mnoha chorob spojených s oxidačním stresem v kůži, například psoriázy. Oxidační stres a jeho procesy jsou také nezbytné pro vývoj fibrózy u fibrózních poruch, jako je sklerodermie, GVHD, hypertrofické jizvy, NSF a další kožní patologie. Tento vynález dále poskytuje fenolické deriváty pro léčení periodontálního onemocnění a prevenci zubního kazu po

55

dobu dostatečnou k odstranění, usmrcení nebo inhibici růstu patogenů způsobujících periodontální onemocnění a zubní kaz. Nová generace dihydrobenzofuranových derivátů je určena pro použití k léčbě onemocnění zubů a kůže vyvolaných periodontálními bakteriemi a zvýšeným oxidačním stresem.

5

Předmětem tohoto vynálezu jsou fenolické dihydrobenzofuranové deriváty obecného vzorce **I**,



I

10 Kde

R^1 je vybrán ze skupiny zahrnující methyl, ethyl, *n*-propyl, *isopropyl* a allyl;

R^2 je vybrán ze skupiny zahrnující methyl, ethyl, *n*-propyl, *isopropyl* a allyl;

R^3 je vybrán ze skupiny zahrnující H, C1-C8 alkyl a C2-C7 alkenyl;

15 R^4 , R^5 jsou nezávisle vybrány ze skupiny zahrnující H, hydroxy a C1-C8 alkoxy,

R^6 je vybrán ze skupiny zahrnující H, hydroxy, C1-C8 alkyl, C1-C8 alkoxy a C2-C7 alkenyl.

Látky vzorce I mohou být opticky aktivní. Vzorec I zahrnuje tyto látky ve formě racemátů, ve formě opticky aktivních izomerů, i ve formě libovolných směsí opticky aktivních izomerů.

20

V tomto kontextu, a pokud není specifikováno jinak dle bezprostředního kontextu, mají obecné skupiny substituentů následující významy:

alkyl znamená rozvětvený či nerozvětvený alkylový řetězec obsahující 1 až 8 atomů uhlíku, s výhodou je alkyl vybrán ze skupiny obsahující methyl, ethyl, propyl, *isopropyl*, butyl, *isobutyl*, pentyl, *isopentyl*, hexyl, *isohexyl*;

25

alkenyl znamená rozvětvený či nerozvětvený alkenylový řetězec obsahující 2 až 7 uhlíků, s výhodou je alkenyl vybrán ze skupiny obsahující vinyl, allyl, 1-propenyl, 1-methylethenyl, but-1 až 3-enyl, pent-1 až 4-enyl, *isopentenyl*, hex-1 až 5-enyl, hept-1 až 6-enyl;

30

alkoxy znamená $-\text{O}-\text{R}_a$, kde R_a je definován výše, s výhodou je vybrán ze skupiny zahrnující methoxy, ethoxy, propoxy, butoxy, pentoxy;

hydroxy znamená $-\text{OH}$.

35 Ve výhodném provedení jsou nové deriváty vzorce **I** vybrány ze skupiny sestávající z dihydrobenzofuranových derivátů vzorce **I**, kde R^1 je methyl, ethyl, *n*-propyl, nebo *isopropyl*, R^2 je methyl, ethyl, *n*-propyl, nebo *isopropyl*, R^3 je vodík, methyl nebo ethyl, R^4 je vodík, methoxy nebo ethoxy, R^5 je vodík, methoxy nebo ethoxy, a R^6 je vodík, methoxy nebo ethoxy.

40 Ve výhodném provedení jsou dihydrobenzofuranové deriváty vzorce I vybrány ze skupiny zahrnující: methyl (2R,3R)-2-(4-hydroxyfenyl)-5-((E)-3-methoxy-3-oxoprop-1-en-1-yl)-2,3-dihydrobenzofuran-3-karboxylát; methyl (2S,3S)-2-(4-hydroxyfenyl)-5-((E)-3-methoxy-3-oxoprop-1-en-1-yl)-2,3-dihydrobenzofuran-3-karboxylát; ethyl (2R,3R)-2-(4-hydroxyfenyl)-5-((E)-3-methoxy-3-oxoprop-1-en-1-yl)-2,3-dihydrobenzofuran-3-karboxylát; ethyl (2S,3S)-2-(4-hydroxyfenyl)-5-((E)-3-methoxy-3-oxoprop-1-en-1-yl)-2,3-dihydrobenzofuran-3-karboxylát; ethyl (2R,3R)-5-((E)-3-ethoxy-3-oxoprop-1-en-1-yl)-2-(4-hydroxyfenyl)-2,3-dihydrobenzofuran-3-karboxylát; ethyl (2S,3S)-5-((E)-3-ethoxy-3-oxoprop-1-en-1-yl)-2-(4-hydroxyfenyl)-2,3-dihydrobenzofuran-3-karboxylát; methyl (2R,3R)-5-((E)-3-ethoxy-3-oxoprop-1-en-1-yl)-2-(4-hydroxyfenyl)-2,3-dihydrobenzofuran-3-karboxylát; methyl (2S,3S)-5-((E)-3-ethoxy-3-oxoprop-1-en-1-yl)-2-(4-hydroxyfenyl)-2,3-dihydrobenzofuran-3-karboxylát; methyl (2R,3R)-2-(4-

50

hydroxyfenyl)-5-((E)-3-oxo-3-propoxyprop-1-en-1-yl)-2,3-dihydrobenzofuran-3-karboxylát; methyl (2S,3S)-2-(4-hydroxyfenyl)-5-((E)-3-oxo-3-propoxyprop-1-en-1-yl)-2,3-dihydrobenzofuran-3-karboxylát; ethyl (2R,3R)-2-(4-hydroxyfenyl)-5-((E)-3-oxo-3-propoxyprop-1-en-1-yl)-2,3-dihydrobenzofuran-3-karboxylát; ethyl (2S,3S)-2-(4-hydroxyfenyl)-5-((E)-3-oxo-3-propoxyprop-1-en-1-yl)-2,3-dihydrobenzofuran-3-karboxylát; propyl (2R,3R)-2-(4-hydroxyfenyl)-5-((E)-3-oxo-3-propoxyprop-1-en-1-yl)-2,3-dihydrobenzofuran-3-karboxylát; propyl (2S,3SR)-2-(4-hydroxyfenyl)-5-((E)-3-oxo-3-propoxyprop-1-en-1-yl)-2,3-dihydrobenzofuran-3-karboxylát; propyl (2R,3R)-5-((E)-3-ethoxy-3-oxoprop-1-en-1-yl)-2-(4-hydroxyfenyl)-2,3-dihydrobenzofuran-3-karboxylát; propyl (2S,3S)-5-((E)-3-ethoxy-3-oxoprop-1-en-1-yl)-2-(4-hydroxyfenyl)-2,3-dihydrobenzofuran-3-karboxylát; propyl (2R,3R)-2-(4-hydroxyfenyl)-5-((E)-3-methoxy-3-oxoprop-1-en-1-yl)-2,3-dihydrobenzofuran-3-karboxylát; propyl (2S,3S)-2-(4-hydroxyfenyl)-5-((E)-3-methoxy-3-oxoprop-1-en-1-yl)-2,3-dihydrobenzofuran-3-karboxylát; propyl (2R,3R)-2-(4-hydroxyfenyl)-5-((E)-3-isopropoxy-3-oxoprop-1-en-1-yl)-2,3-dihydrobenzofuran-3-karboxylát; propyl (2S,3S)-2-(4-hydroxyfenyl)-5-((E)-3-isopropoxy-3-oxoprop-1-en-1-yl)-2,3-dihydrobenzofuran-3-karboxylát; ethyl (2R,3R)-2-(4-hydroxyfenyl)-5-((E)-3-isopropoxy-3-oxoprop-1-en-1-yl)-2,3-dihydrobenzofuran-3-karboxylát; ethyl (2S,3S)-2-(4-hydroxyfenyl)-5-((E)-3-isopropoxy-3-oxoprop-1-en-1-yl)-2,3-dihydrobenzofuran-3-karboxylát; methyl (2R,3R)-2-(4-hydroxyfenyl)-5-((E)-3-isopropoxy-3-oxoprop-1-en-1-yl)-2,3-dihydrobenzofuran-3-karboxylát; methyl (2S,3S)-2-(4-hydroxyfenyl)-5-((E)-3-isopropoxy-3-oxoprop-1-en-1-yl)-2,3-dihydrobenzofuran-3-karboxylát; isopropyl (2R,3R)-2-(4-hydroxyfenyl)-5-((E)-3-oxo-3-propoxyprop-1-en-1-yl)-2,3-dihydrobenzofuran-3-karboxylát; isopropyl (2S,3S)-2-(4-hydroxyfenyl)-5-((E)-3-oxo-3-propoxyprop-1-en-1-yl)-2,3-dihydrobenzofuran-3-karboxylát; isopropyl (2R,3R)-5-((E)-3-ethoxy-3-oxoprop-1-en-1-yl)-2-(4-hydroxyfenyl)-2,3-dihydrobenzofuran-3-karboxylát; isopropyl (2S,3S)-5-((E)-3-ethoxy-3-oxoprop-1-en-1-yl)-2-(4-hydroxyfenyl)-2,3-dihydrobenzofuran-3-karboxylát; isopropyl (2R,3R)-2-(4-hydroxyfenyl)-5-((E)-3-methoxy-3-oxoprop-1-en-1-yl)-2,3-dihydrobenzofuran-3-karboxylát; isopropyl (2S,3S)-2-(4-hydroxyfenyl)-5-((E)-3-methoxy-3-oxoprop-1-en-1-yl)-2,3-dihydrobenzofuran-3-karboxylát; isopropyl (2R,3R)-2-(4-hydroxyfenyl)-5-((E)-3-isopropoxy-3-oxoprop-1-en-1-yl)-2,3-dihydrobenzofuran-3-karboxylát; isopropyl (2S,3S)-2-(4-hydroxyfenyl)-5-((E)-3-isopropoxy-3-oxoprop-1-en-1-yl)-2,3-dihydrobenzofuran-3-karboxylát, methyl (E)-7-hydroxy-2-(4-hydroxyfenyl)-5-(3-methoxy-3-oxoprop-1-en-1-yl)-2,3-dihydrobenzofuran-3-karboxylát, methyl (E)-2-(4-ethoxyfenyl)-5-(3-methoxy-3-oxoprop-1-en-1-yl)-2,3-dihydrobenzofuran-3-karboxylát.

Nejvýhodnější dihydrobenzofuranové deriváty obecného vzorce I jsou vybrané ze skupiny zahrnující: methyl (2R,3R)-2-(4-hydroxyfenyl)-5-((E)-3-methoxy-3-oxoprop-1-en-1-yl)-2,3-dihydrobenzofuran-3-karboxylát; ethyl (2R,3R)-5-((E)-3-ethoxy-3-oxoprop-1-en-1-yl)-2-(4-hydroxyfenyl)-2,3-dihydrobenzofuran-3-karboxylát; propyl (2R,3R)-2-(4-hydroxyfenyl)-5-((E)-3-oxo-3-propoxyprop-1-en-1-yl)-2,3-dihydrobenzofuran-3-karboxylát; isopropyl (2R,3R)-2-(4-hydroxyfenyl)-5-((E)-3-isopropoxy-3-oxoprop-1-en-1-yl)-2,3-dihydrobenzofuran-3-karboxylát; methyl (2R,3R)-2-(4-hydroxy-3,5-dimethoxyfenyl)-5-((E)-3-methoxy-3-oxoprop-1-en-1-yl)-2,3-dihydrobenzofuran-3-karboxylát; methyl (2R,3R)-2-(4-hydroxy-3-methoxyfenyl)-5-((E)-3-methoxy-3-oxoprop-1-en-1-yl)-2,3-dihydrobenzofuran-3-karboxylát.

Dihydrobenzofuranové deriváty obecného vzorce I podle tohoto vynálezu mají širokou škálu biologických aktivit, mezi něž patří antioxidační, protizánětlivé, antibakteriální, antisenescenční a antiaging aktivity, což jsou aktivity zejména použitelné ve farmaceutických a kosmetických aplikacích. Látky podle tohoto vynálezu vykazují antioxidační a antibakteriální vlastnosti o zvýšené selektivitě a účinnosti a rovněž o minimální nebo žádné toxicitě v porovnání s analogy známými ze současného stavu techniky.

Předmětem vynálezu jsou dále dihydrobenzofuranové deriváty obecného vzorce I pro použití pro inhibici růstu mikroorganismů ústní dutiny a inhibici tvorby plaku na zubech a zubních náhradách, a tím pro zlepšení ústní hygieny a současné potlačení zánětu dásní (gingivitidy).

Předmětem vynálezu jsou dále dihydrobenzofuranové deriváty obecného vzorce I pro použití pro úplnou inhibici růstu plaku, aniž by došlo k podráždění ústní sliznice a k obarvení zubů.

5 Předmětem vynálezu jsou dále dihydrobenzofuranové deriváty obecného vzorce I pro inhibici růstu nebo pro usmrcení bakterií v ústní dutině (člověka či zvířete), přičemž se podá terapeuticky účinné množství dihydrobenzofuranového derivátu obecného vzorce I do ústní dutiny po dobu dostatečnou pro efektivní eradikaci uvedených bakterií.

10 V dalším provedení tento vynález také poskytuje dihydrobenzofuranové deriváty obecného vzorce I pro prevenci nebo léčení onemocnění způsobeného bakteriální infekcí podáváním účinného množství modulátoru bakteriálního růstu vzorce I.

15 Tento vynález dále poskytuje dihydrobenzofuranové deriváty obecného vzorce I pro inhibici růstu nebo pro usmrcení bakterií, kde uvedené bakterie jsou vybrány ze skupiny obsahující *Porphyromonas gingivalis*, *Strep. mutans*, *Strep. pyogenes*, *Bacteroides species*, *Actinobacillus action mycetemcomitons*, *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum*, *Campylobacter rectus*, *Eikenella corrodens*, *Peptostreptoloccus micros*, *Selenomonas sp.*, *Eubacterium sp.*, *Streptococcus species*, *Spirochetes treponema denticola*, a *Treponema pallidum*.

20 Tento vynález dále poskytuje zubní pastup obsahující dihydrobenzofuranové deriváty obecného vzorce I pro léčbu periodontálního onemocnění a prevenci zubního kazu, kde se zubní pasta aplikuje na zuby a dásně člověka nebo zvířete po dobu dostatečnou k odstranění, usmrcení nebo inhibici růstu patogenů způsobujících onemocnění parodontu nebo zubní kaz.

25 Tento vynález dále poskytuje nové antibakteriální formulace zubní pasty a ústní vody obsahující terapeuticky účinné množství jednoho nebo více nových dihydrobenzofuranových derivátů vzorce I a alespoň jednu pomocnou látku. Zubní pasta nebo ústní voda jsou zejména vhodné pro inhibici růstu nebo proeradikaci patogenů v ústní dutině lidí a zvířat.

30 Předmětem vynálezu jsou dále dihydrobenzofuranové deriváty obecného vzorce I pro použití pro antiseptické ošetření ústní dutiny, pro inhibici zánětů ústní sliznice a/nebo pro deodoraci ústní dutiny.

35 Tento vynález dále poskytuje farmaceutické kompozice (včetně zubních past a ústních vod) obsahující jednu nebo více sloučenin obecného vzorce I s farmaceuticky přijatelným nosičem.

Farmaceutické a kosmetické kompozice

40 Vhodné cesty pro systémovou aplikaci jsou orální, inhalační, topické, injekční (intravazální, intramuskulární, subkutánní), bukální, sublingualní a nasální. Pro terapii onemocnění skalpu a kůže jsou vhodnou lékovou formou roztoky, krémy a masti. Pro ošetření dutiny ústní jsou vhodnou lékovou formou ústní vody, zubní pasty, žvýkačky a roztoky.

45 Farmaceutický nebo kosmetický přípravek obsahuje od 1 do 95 % aktivní látky, přičemž jednorázové dávky obsahují přednostně od 20 do 90 % aktivní látky a při způsobech aplikace, které nejsou jednorázové, obsahují přednostně od 5 do 20 % aktivní látky. Jednotkové dávkové formy jsou např. potahované tablety, tablety, ampule, lahvičky nebo tobolky. Jiné formy aplikace jsou např. masti, krémy, pasty, pěny, tinktury, rtěnky, kapky, spreje, disperze atd. Příkladem jsou tobolky obsahující od 0,05 g do 1,0 g aktivní látky.

50 Farmaceutické přípravky podle předloženého vynálezu jsou připravovány známým způsobem, např. běžným mícháním, granulací, potahováním, rozpouštěcími nebo lyofilizačními procesy.

55 Přednostně jsou používány roztoky aktivních látek a dále také suspenze nebo disperze, obzvláště izotonické vodné roztoky, suspenze nebo disperze, které mohou být připraveny před použitím,

např. v případě lyofilizovaných preparátů obsahujících aktivní látku samotnou nebo s nosičem jako je mannitol. Farmaceutické přípravky mohou být sterilizovány a/nebo obsahují excipienty, např. konzervační přípravky, stabilizátory, zvlhčovačla a/nebo emulgátory, rozpouštěcí činidla, soli pro regulaci osmotického tlaku a/nebo pufrů. Jsou připravovány známým způsobem, např. běžným rozpouštěním nebo lyofilizací. Zmíněné roztoky nebo suspence mohou obsahovat látky zvyšující viskozitu, jako např. sodnou sůl karboxymethylcelulosity, dextran, polyvinylpyrrolidon nebo želatínu.

Olejové suspence obsahují jako olejovou složku rostlinné, syntetické nebo semisyntetické oleje obvyklé pro injekční účely. Oleje, které zde mohou být zmíněny, jsou obzvláště kapalné estery mastných kyselin, které obsahují jako kyselou složku mastnou kyselinu s dlouhým řetězcem majícím 8-22, s výhodou pak 12-22 uhlíkových atomů, např. kyselinu laurovou, tridekanovou, myristovou, pentadekanovou, palmitovou, margarovou, stearovou, arachidonovou a behenovou, nebo odpovídající nenasycené kyseliny, např. kyselinu olejovou, alaidikovou, eurikovou, brasidovou a linoleovou, případně s přísadkou antioxidantů, např. vitaminu E, beta-karotenu nebo 3,5-di-*tert*-butyl-4-hydroxytoluenu. Alkoholová složka těchto esterů mastných kyselin nemá více než 6 uhlíkových atomů a je mono- nebo polyhydričká, např. mono-, di- nebo trihydričké alkoholy jako metanol, etanol, propanol, butanol nebo pentanol a jejich isomery, ale hlavně glykol a glycerol. Estery mastných kyselin jsou s výhodou např. ethyl oleát, isopropyl myristát, isopropyl palmitát, „Labrafil M 2375“ (polyoxyethylen glycerol trioleát, Gattefoseé, Paříž), „Labrafil M 1944 CS“ (nenasycené polyglykolované glyceridy připravené alkoholů z oleje z meruňkových jader a složené z glyceridů a esterů polyethylen glykolu; Gattefoseé, Paříž), „Labrasol“ (nasycené polyglykolované glyceridy připravené alkoholů z TCM a složené z glyceridů a esterů polyethylen glykolu; Gattefoseé, Paříž) a/nebo „Miglyol 812“ (triglycerid nasycených mastných kyselin s délkou řetězce C₈ až C₁₂ od Hüls AG, Německo) a zvláště rostlinné oleje jako bavlníkový olej, mandlový olej, olivový olej, ricinový olej, sesamový olej, sójový olej a zejména olej z podzemnice olejné.

Příprava injekčního přípravku se provádí za sterilních podmínek obvyklým způsobem, např. plněním do ampulí nebo lahviček a uzavíráním obalů.

Např. farmaceutické přípravky pro orální použití se mohou získat smícháním aktivní látky s jedním nebo více tuhými nosiči, případnou granulací výsledné směsi, a pokud je to požadováno, zpracováním směsi nebo granulí do tablet nebo potahovaných tablet přísadou dalších neutrálních látek. Vhodné nosiče jsou obzvláště plnidla jako cukry, např. laktosa, sacharosa, mannitol nebo sorbitol, celulosové preparáty a/nebo fosforečnany vápníku, s výhodou fosforečnan vápenatý nebo hydrogenfosforečnan vápenatý, dále pojiva jako škroby, s výhodou kukuřičný, pšeničný, rýžový nebo bramborový škrob, methylcelulosa, hydroxypropylmethylcelulosa, sodná sůl karboxymethylcelulosity a/nebo polyvinylpyrrolidin, a/nebo pokud požadováno desintegrátory jako výše zmíněné škroby a dále karboxymethylový škrob, zesítený polyvinylpyrrolidin, alginová kyselina a její soli, s výhodou alginát sodný. Další neutrální látky jsou regulátory toku a lubrikanty, s výhodou kyselina salicylová, talek, kyselina stearová a její soli jako stearát hořečnatý a/nebo vápenatý, polyethylen glykol nebo jeho deriváty.

Jádra potahovaných tablet mohou být potažena vhodnými potahy, které mohou být odolné vůči žaludeční šťávě, přičemž používané potahy jsou mezi jinými koncentrované roztoky cukrů, které mohou obsahovat arabskou gumu, talek, polyvinylpyrrolidin, polyethylen glykol a/nebo oxid titaničitý, dále potahovací roztoky ve vhodných organických rozpouštědlech nebo směsích rozpouštědel, či pro přípravu potahů odolných vůči žaludeční šťávě roztoky vhodných celulosových preparátů jako acetylcelulosafталát nebo hydroxypropylmethylcelulosafталát. Barviva nebo pigmenty jsou přimíchávány do tablet nebo potahovaných tablet např. pro identifikaci nebo charakterizaci různých dávek účinné složky.

Farmaceutické přípravky, které mohou být užívány orálně, jsou také tvrdé tobolky ze želatiny nebo měkké uzavřené tobolky ze želatiny a změkčovačla jako glycerol nebo sorbitol. Tvrdé tobolky

5 mohou obsahovat aktivní látku ve formě granulí, smíchanou např. s plnidly jako je kukuřičný škrob, pojivy nebo lubrikanty jako talek nebo stearát hořečnatý, a se stabilizátory. V měkkých tobolkách je aktivní látka přednostně rozpuštěna nebo suspendována ve vhodných kapalných látkách neutrální povahy jako mazačí tuk, parafinový olej nebo kapalný polyethylen glykol či estery mastných kyselin a ethylen nebo propylen glykolu, přičemž je také možno přidat stabilizátory a detergenty např. typu esterů polyethylen sorbitanových mastných kyselin.

10 Další formy orálního podávání jsou např. sirupy připravované běžným způsobem, které obsahují aktivní složku např. v suspendované formě a v koncentraci okolo 5 až 20 %, přednostně okolo 10 % nebo podobné koncentrace, která umožňuje vhodnou individuální dávku, např. když je měřeno 5 nebo 10 ml. Ostatní formy jsou např. práškové nebo kapalné koncentráty pro přípravu koktejlů, např. v mléce. Takovéto koncentráty mohou být také baleny v množství odpovídajícím jednotkové dávce.

15 Přípravky vhodné pro parenterální podání jsou vodné roztoky aktivní složky ve formě rozpustné ve vodě, např. ve vodě rozpustná sůl nebo vodná injekční suspenze, která obsahuje látky zvyšující viskozitu, např. sodnou sůl karboxymethylcelulose, sorbitol a/nebo dextran, a stabilizátory tam kde je to vhodné. Aktivní látka může být také přítomna ve formě lyofilizátu společně s excipienty kde je to vhodné a může být rozpuštěna před parenterální aplikací přidáním vhodných rozpouštědel. 20 Roztoky, které jsou použity pro parenterální aplikaci, mohou být použity např. i pro infúzní roztoky. Preferovaná konzervovadla jsou s výhodou antioxidanty jako kyselina askorbová, nebo mikrobicidy kyselina sorbová či benzoová.

25 Masti jsou emulze oleje ve vodě, které obsahují ne více než 70 %, ale přednostně 20 až 50 % vody nebo vodné fáze. Tukovou fází tvoří zejména uhlovodíky, např. vazelina, parafinový olej nebo tvrdé parafiny, které přednostně obsahují vhodné hydroxysloučeniny jako mastné alkoholy a jejich estery, např. cetyl alkohol, nebo alkoholy lanolinu, s výhodou lanolin pro zlepšení kapacity pro vázání vody. Emulgátory jsou odpovídající lipofilní sloučeniny jako sorbitanové estery mastných kyselin (Spany), s výhodou sorbitan oleát nebo sorbitan isostearát. Aditiva k vodné fázi jsou např. 30 smáčedla jako polyalkoholy, např. glycerol, propylen glykol, sorbitol a/nebo polyethylen glykol, nebo konzervační prostředky či příjemně vonící látky.

Mastné masti jsou nevodné a obsahují jako bázi hlavně uhlovodíky, např. parafin, vazelínu nebo parafinový olej, a dále přírodní nebo semisyntetické tuky, např. hydrogenované kokosové triglyceridy mastných kyselin nebo, s výhodou, hydrogenované oleje, např. hydrogenovaný ricínový olej nebo olej z podzemnice olejné, a dále částečné glycerolové estery mastných kyselin, např. glycerol mono- a/nebo distearát. Dále obsahují např. mastné alkoholy, emulgátory a/nebo aditiva zmíněná v souvislosti s mastmi, která zvyšují příjem vody.

40 Krémy jsou emulze oleje ve vodě, které obsahují více než 50 % vody. Používané olejové báze jsou zejména mastné alkoholy, např. lauryl, cetyl nebo steryl alkoholy, mastné kyseliny, například palmitová nebo stearová kyselina, kapalné a pevné vosky, například isopropyl myristát, lanolin nebo včelí vosk, a/nebo uhlovodíky, například vazelína (petrolátum) nebo parafinový olej. Emulgátory jsou povrchově aktivní sloučeniny s převážně hydrofilními vlastnostmi, jako jsou odpovídající neiontové emulgátory, např. estery mastných kyselin polyalkoholů nebo jejich ethylenoxy adukty, např. estery polyglycerických mastných kyselin nebo polyethylen sorbitanové estery (Tween), dále polyoxyethylenové estery mastných alkoholů nebo polyoxyethylenové estery mastných kyselin, nebo odpovídající iontové emulgátory, jako alkalické soli sulfátů mastných alkoholů, s výhodou laurylsulfát sodný, cetylsulfát sodný nebo stearylsulfát sodný, které jsou 50 obvykle používány v přítomnosti mastných alkoholů, např. cetyl stearyl alkoholu nebo stearyl alkoholu. Aditiva k vodné fázi jsou mimo jiné činidla, která chrání krémy před vyschnutím, např. polyalkoholy jako glycerol, sorbitol, propylen glykol a polyethylen glykol, a dále konzervační činidla a příjemně vonící látky.

Pasty jsou krémy nebo masti obsahující práškové složky absorbující sekreci jako jsou oxidy kovů, např. oxidy titanu nebo oxid zinečnatý, a dále talek či silikáty hliníku, které mají za úkol vázat přítomnou vlhkost nebo sekreci.

- 5 V určitých provedeníh formulace obsahují alespoň jednu základní složku a aktivní složku obsahující fenolickou sloučeninu, výhodně vysoce vyčištěnou (tj. 98% a vyšší čistotu, výhodněji přibližně s 98,5% až 99% čistotu). Výhodné rozmezí koncentrace fenolové sloučeniny ve formulacích zubní pasty je od asi 1% do asi 40%. Jedna nebo více základních složek použitých ve
10 množství a typy takových základních složek jsou známé odborníkům v oboru. Příklady základních složek zahrnují, ale nejsou na ně omezeny, (a) sorbitol, polyol, který funguje jako zvlhčovadlo/sladidlo; b) voda, která funguje jako ředidlo; (c) oxid křemičitý (např. ZEODENT, prodáváný firmou Huber Corp.), který funguje jako brusivo, které pomáhá odstraňovat částice ze zubů; (d) glycerin, který také slouží jako zvlhčovadlo; (e) povrchově aktivní látky, jako je například
15 laurylsulfát sodný nebo Polysorbát 20; (f) pojiva a viskozitní činidla, jako je CEKOL celulózová guma, xanthamová guma; a (g) konzervační látky, jako je například benzoát sodný a methylparaben. Mohou být také použita aromatická a barvicí činidla (nebo bělidla, jako je oxid titaničitý). Zatímco identifikované základní složky mohou být skutečně použity v předkládaném vynálezu, mohou být použity jiné základní komponenty obvykle používané ve formulacích zubních
20 past, nyní známých nebo později objevených, aniž by došlo k odchýlení se od rozsahu a ducha předkládaného vynálezu.

Formulace zubní pasty s výhodou dále obsahuje farmaceuticky přijatelnou sloučeninu vápníku, výhodně čistý vápník a/nebo farmaceuticky přijatelnou sloučeninu hořčíku, jako je fosforečnan
25 hořečnatý, pro podporu silnějších zubů. Výhodné zubní pasta přípravky obsahují od asi 18% do asi 22% procent limonen. Výhodné procentní množství vápníku v rozmezí od asi 1,25% do asi 1,50%. Výhodné procentní množství rozmezí fosforečnan hořečnatý od asi 1,25% do asi 1,50%.

Formulace ústní vody pro intenzivní čištění ústní dutiny a podle vynálezu účinné při léčení
30 bakteriálních infekcí v ústech (nebo při inhibici růstu bakterií zodpovědných za takové infekce) zahrnují aktivní složku obsahující fenolickou sloučeninu obecného vzorce I, s výhodou vysoce purifikovanou formu (tj. 98,0% nebo vyšší) čistota, výhodněji 98,5% až 99,0%) a jednu nebo více základních složek běžně používaných ve formulacích ústní vody.

35 Příklady základních složek zahrnují (a) sorbitol; (b) polyethylenglykol (např. PEG 6) jako nosič a povrchově aktivní látku; (c) polysorbát (povrchově aktivní látka); (d) voda (ředidlo); a (e) aromatizační činidla (např. sukralóza). Výhodná formulace obsahuje (a) od asi 15% do asi 25% sorbitolu, (b) od asi 10% do asi 20% polyethylenglykolu, (c) od asi 2,5% do asi 7,5% polysorbátu 20, (d) od asi 2,5% do asi 15% d-limonenu, (e) od asi 45% do asi 65% vody, (f) od asi 0,2% do asi
40 0,5% sukralózy a asi 1,0% až 2,0% Belwood Wintergreen. Podávání ústní vody podle vynálezu je podobné běžným ústním vodám (tj. asi 30 ml umístěných v ústech a asi 30 sekund před vplynutím); podaná dávka a čas v ústech se však mohou lišit podle potřeby.

45 Pěny jsou aplikovány z tlakových nádob a jsou to kapalné emulze oleje ve vodě v aerosolové formě, přičemž jako hnací plyny jsou používány halogenované uhlovodíky, jako polyhalogenované alkany, např. dichlorfluormethan a dichlortetrafluorethan, nebo přednostně nehalogenované plynné uhlovodíky, vzduch, N₂O či oxid uhličitý. Používané olejové fáze jsou stejné jako pro masti a krémy a také jsou používána aditiva tam zmíněná.

50 Tinkтуры a roztoky obvykle obsahují vodně-etanolickou bázi, ke které jsou přimíchána zvlhčovadla pro snížení odpařování, jako jsou polyalkoholy, např. glycerol, glykoly a/nebo polyethylen glykol, dále promazávací jako estery mastných kyselin a nižších polyethylen glykolů, tj. lipofilní látky rozpustné ve vodné směsi nahrazující tukové látky odstraněné z kůže etanolem, a pokud je to nutné, i ostatní excipienty a aditiva.

55

Tento vynález dále poskytuje veterinární přípravky obsahující nejméně jednu aktivní složku společně s veterinárním nosičem. Veterinární nosiče jsou materiály pro aplikaci přípravku a mohou to být látky pevné, kapalné nebo plynné, které jsou inertní nebo přijatelné ve veterinární medicíně a jsou kompatibilní s aktivní složkou. Tyto veterinární přípravky mohou být podávány orálně, parenterálně nebo jakoukoli jinou požadovanou cestou.

Vynález se také vztahuje na procesy nebo metody pro léčení nemocí zmíněných výše. Látky mohou být podávány profylakticky nebo terapeuticky jako takové nebo ve formě farmaceutických přípravků, přednostně v množství, které je efektivní proti zmíněným nemocem, přičemž u teplokrevných živočichů, např. člověka, vyžadujícího takovéto ošetření, je látka používána zejména ve formě farmaceutického přípravku. Na tělesnou hmotnost okolo 70 kg je aplikována denní dávka látky okolo 0,1 až 5 g, s výhodou 0,5 až 2 g.

Příklady uskutečnění vynálezu

Následující příklady slouží k demonstraci vynálezu a nikterak nedokumentují rozsah vynálezu. Pakliže není uvedeno jinak, všechna procentuální zastoupení a množství se vztahují k hmotnostem daných látek.

Výchozí látky mohou být získány z komerčních zdrojů (Sigma, Aldrich, Fluka, Merck, etc.) nebo mohou být připraveny níže uvedenými postupy.

Tenkovrstvá chromatografie byla provedena na Silica 60 F₂₅₄ deskách (Merck) s využitím směsi CHCl₃/MeOH jako mobilní fáze. Skvrny odpovídající jednotlivým látkám byly detekovány pomocí UV světla (254 a 365 nm) anebo roztokem obsahujícím 6% vanillinu v absolutním EtOH s 1 % H₂SO₄. Purifikace pomocí sloupcové chromatografie byla provedena na sorbentu Davisil 40-63 mikronů (Grace Davision). Elementární analýza byla provedena pomocí Flash EA 1112 analyzátoru (Thermo Scientific).

Chromatografická čistota a molekulární hmotnost připravených látek byla určena pomocí separačního modulu Alliance 2695 (Waters) připojeného paralelně s DAD detektorem PDA 996 (Waters) a Q-ToF micro (Waters) benchtop quadrupole orthogonal acceleration time-of-flight tandem hmotnostním spektrometrem. Vzorky byly rozpuštěny v DMSO a následně zředěny na koncentraci 10 µg/ml přímo ve směsi kapalin využívaných jako počáteční mobilní fáze. Vzorky (10 µl) byly následně nastříknuty na RP-kolonu (kolonu s obrácenou fází) Symmetry C18 (150 mm x 2.1 mm x 3.5 µm, Waters) a děleny při průtoku 0.2 ml/min následujícím binárním gradientem: 0 min, 10% B; 0-24 min, lineární gradient do 90% B, následovaný 10 min isokratickou elucí pomocí 90% B. Po ukončení gradientu byla kolona re-ekvilibrována do původních podmínek. 15 mM roztok kyseliny mravenčí byl upraven na pH 4.0 pomocí hydroxidu amonného, a tato směs byla použita jako roztok (A); methanol byl použit pro rozpuštění organické složky (rozpuštědlo B). Eluent byl vpraven do DAD (skenovaný rozsah 210-400 nm, s 1,2 nm rozlišením) a ESI zdroj (teplota zdroje 110 °C, napětí na kapiláře +3,0 kV, napětí na hrotu +20 V, desolvatační teplota 250 °C). Dusík byl použit jako desolvatační plyn (500 l/h) a plyn na hrotu (50 l/h). Naměřená data byla získána v pozitivním (ESI+) ionizačním módu a rozpětí 50-1000 m/z.

¹H a ¹³C NMR spektra byla měřena pomocí Jeol ECA-500 NMR přístroje, který pracuje při frekvenci 500 MHz (¹H) a 126 MHz (¹³C) nebo pomocí přístroje Bruker Avance pracujícího při frekvenci 300 MHz (¹H) a 75 MHz (¹³C). Vzorky pro měření byly připraveny rozpuštěním dané substance v chloroformu-*d* a naměřené chemické posuny byly kalibrovány vůči píku reziduálního nedeuterovaného rozpouštědla CHCl₃ (7,27 ppm pro proton) anebo vůči rozpouštědlu chloroformu-*d* (77,23 ppm pro uhlík).

Příklad 1 *Methyl (2R,3R)-2-(4-hydroxyfenyl)-5-((E)-3-methoxy-3-oxoprop-1-en-1-yl)-2,3-dihydrobenzofuran-3-karboxylát* (sloučenina **1** v Tab. 1)

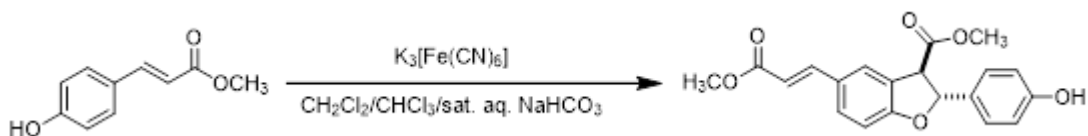


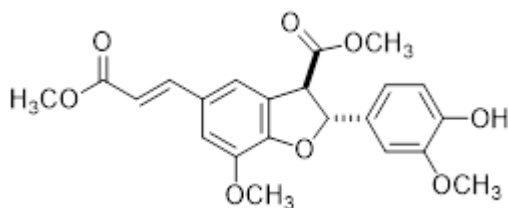
Schéma 1

Methyl kumarát (20g, 112 mmol, 0.5 equiv) byl rozpuštěn ve směsi CH₂Cl₂/CHCl₃ (56 + 504 mL; 1/9 (V/V); 0,2M vůči esteru) a výsledná směs byla míchána při laboratorní teplotě (RT) po dobu 5 min. Ve druhé reakční nádobě byl rozpuštěn K₃[Fe(CN)₆] (87g, 270 mmol, 1,2 equiv) v nasyceném vodném roztoku NaHCO₃ (560 mL, 0,2M vůči esteru). Výsledný homogenní hnědý roztok byl umístěn v přikávací nálevce a celá směs byla v průběhu 1 h rovnoměrně přikápana do roztoku methyl kumarátu. Výsledná směs byla míchána po dobu 48 h než byla organická vrstva oddestilována za sníženého tlaku.

Výsledná vodná fáze byla extrahována pomocí ethylacetátu (EtOAc) (4x500 mL) a spojené organické vrstvy byly promyty solankou (500 mL). Výsledná organická vrstva byla filtrována přes Celite®, filtrát byl sušen anhydridem Na₂SO₄ zahuštěn na rotační vakuové odparce (RVO). Odparek (22.05 g) byl následně čištěn pomocí kolonové chromatografie (SiO₂; hexan:EtOAc = 4:1->2:1) a poskytl 3,79 g (19%; čistota 98+%) výše zmíněné látky.

Žlutá pevná látka, chemický vzorec: C₂₀H₁₈O₆, výtěžek (%): 19, *trans/cis* = 21:1.
 HPLC-UV/VIS retenční čas, čistota (min., %): 27.1, 98.6.
 ESI⁺-MS *m/z* (rel. int. %, ion): 355.5 (10, M+H⁺), 295.1 (100, M-CO₂CH₂)⁺.
¹H NMR (500 MHz, Chloroform-*d*) δ (ppm): 3.80 (s, 3H), 3.82 (s, 3H), 4.27 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 5.95 (broad s, 1H), 6.08 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 6.31 (d, *J* = 15.9 Hz, 1H), 6.84 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 6.87 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 7.24 (d, *J* = 9.2 Hz, 2H), 7.41 (dd, *J* = 8.5, 1.9 Hz, 1H), 7.54 (t, *J* = 1.5 Hz, 1H), 7.65 (d, *J* = 15.9 Hz, 1H).
¹³C NMR (126 MHz, Chloroform-*d*) □ (ppm): 51.9, 53.1, 55.1, 86.5, 110.4, 115.2, 115.8, 125.1, 125.2, 127.6, 127.8, 131.0, 131.9, 145.0, 156.4, 161.3, 168.2, 171.1.

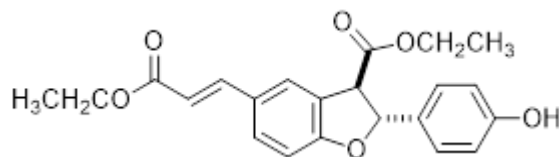
Příklad 2: Methyl (2*R*,3*R*)-2-(4-hydroxy-3-methoxyfenyl)-7-methoxy-5-((*E*)-3-methoxy-3-oxoprop-1-en-1-yl)-2,3-dihydrobenzofuran-3-karboxylát (sloučenina **9** v Tab. 1)



Připraven dle postupu v **Příkladu 1**.

Žlutá pevná látka, chemický vzorec: C₂₂H₂₂O₈, výtěžnost (%): 22, *trans/cis* = 9:1.
 HPLC-UV/VIS retenční čas, čistota (min., %): 27.8, 98.7.
 ESI⁺-MS *m/z* (rel. int. %, ion): 459 (23, [M+H]⁺).
 HRMS (FAB): vypočítáno (pro C₂₄H₂₆NaO₉⁺) 481.1469, nalezeno 481.1470.
¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 3.50 (s, 3H), 3.81 (s, 3H), 3.84 (s, 3H), 3.87 (s, 3H), 3.93 (s, 3H), 4.35 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 5.22 (s, 2H), 6.14 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 6.33 (d, *J* = 15.9 Hz, 1H), 6.92 (dd, *J* = 12.0, 2.5 Hz, 1H), 6.95 (s, 2H), 7.03 (d, *J* = 1.6 Hz, 1H), 7.13 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.19 (d, *J* = 1.3 Hz, 1H), 7.65 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H).
¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 51.9, 53.1, 55.6, 56.2, 56.3, 56.4, 87.4, 95.6, 109.8, 112.3, 115.8, 116.5, 118.1, 118.9, 125.8, 128.8, 133.8, 144.9, 146.9, 150.1, 150.1, 167.8, 170.9.

–Příklad 3: Ethyl (2*R*,3*R*)-5-((*E*)-3-ethoxy-3-oxoprop-1-en-1-yl)-2-(4-hydroxyfenyl)-2,3-dihydrobenzofuran-3-karboxylát (sloučenina **2** v Tab. 1)



5

Připraven dle postupu v **Příkladu 1**.

Žlutá pevná látka, chemický vzorec: C₂₂H₂₂O₆, výtěžnost (%): 20, *trans/cis* = 25:1.

10 HPLC-UV/VIS retenční čas, čistota (min., %): 27.9, 99.1.

ESI⁺-MS *m/z* (rel. int. %, ion): 383.5 (15, M+H)⁺.

¹H NMR (500 MHz, Chloroform-*d*) δ (ppm): 1.33 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H), 1.34 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H), 4.27 (d, *J* = 7.3 Hz, 4H), 6.09 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 6.30 (d, *J* = 15.6 Hz, 1H), 6.83 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 6.89 (s, 1H), 6.94 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 7.26 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H), 7.42 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 7.55 (s, 1H), 7.65 (d, *J* = 15.9 Hz, 1H), 7.80 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 9.87 (s, 1H).

¹³C NMR (126 MHz, Chloroform-*d*) δ (ppm): 14.4, 14.4, 55.2, 60.6, 62.0, 86.4, 110.4, 115.7, 116.0, 125.0, 125.3, 127.7, 130.0, 130.8, 132.4, 144.5, 156.0, 161.2, 167.5, 170.4.

20

Tabulka 1. Přehled fenolických derivátů připravených postupem podle příkladu 1

Slouč.	Fenolický derivát						CHN analýza [%C, %H]	Hmotnos tní analýza [M+H] ⁺
	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵	R ⁶		
1	Methyl	Methyl	H	H	H	H	67.8, 5.1	355
2	Ethyl	Ethyl	H	H	H	H	69.1, 5.8	383
3	Propyl	Propyl	H	H	H	H	70.2, 6.4	411
4	Isopropyl	isopropyl	H	H	H	H	70.2, 6.4	411
5	Methyl	Methyl	H	Methoxy	H	H	65.6, 5.2	385
6	Methyl	Methyl	H	Methoxy	Methoxy	H	63.8, 5.4	415
7	Methyl	Methyl	H	Methoxy	Methoxy	Methoxy	62.2, 5.4	445
8	Methyl	Methyl	Methyl	Methoxy	Methoxy	Methoxy	62.9, 5.7	459
9	Methyl	Methyl	H	H	Methoxy	Methoxy	63.8, 5.4	415
10	Methyl	Methyl	Methyl	H	H	Methoxy	66.3, 5.6	399
11	Methyl	Methyl	Methyl	H	H	H	68.5, 5.5	369
12	Ethyl	Ethyl	H	Methoxy	H	H	67.0, 5.9	413
13	Ethyl	Ethyl	H	Methoxy	Methoxy	H	65.2, 5.9	443
14	Ethyl	Ethyl	H	Methoxy	Methoxy	Methoxy	63.6, 6.0	473
15	Ethyl	Ethyl	Methyl	Methoxy	Methoxy	Methoxy	64.2, 6.2	487
16	Ethyl	Ethyl	H	Ethoxy	H	H	67.6, 6.2	427
17	Ethyl	Ethyl	H	Ethoxy	Ethoxy	H	66.4, 6.4	471
18	Ethyl	Ethyl	H	H	H	H	69.1, 5.8	383
19	Ethyl	Methyl	H	H	H	H	68.5, 5.5	369
20	Methyl	Ethyl	H	H	H	H	68.6, 5.5	369
21	Propyl	Propyl	H	H	H	H	70.2, 23.4	411
22	Isopropyl	Isopropyl	H	H	H	H	70.3, 23.4	411
23	Propyl	Propyl	H	Methoxy	H	H	68.2, 6.4	441

Slouč.	Fenolický derivát						CHN	Hmotnostní
	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵	R ⁶	analýza [%C, %H]	analýza [M+H] ⁺
24	Propyl	Propyl	H	H	H	Methoxy	68.2, 6.4	441
25	Propyl	Propyl	H	Methoxy	Methoxy	Methoxy	64.8, 6.44	501
26	Isopropyl	isopropyl	H	Methoxy	Methoxy	Methoxy	64.8, 6.44	501
27	Isopropyl	isopropyl	H	H	H	Methoxy	68.2, 6.4	441
28	Isopropyl	isopropyl	H	H	H	Isopropyloxy	69.2, 6.9	469
29	Isopropyl	isopropyl	Methyl	Methoxy	Methoxy	Methoxy	65.4, 6.7	515
30	Isopropyl	isopropyl	H	Ethoxy	Ethoxy	H	67.5, 6.9	499
31	Methyl	Methyl	Allyl	H	H	H	70.0, 5.6	395
32	Ethyl	Ethyl	Allyl	H	H	H	71.1, 6.2	423
33	Allyl	Allyl	Allyl	H	H	H	76.6, 5.9	447
34	Allyl	Methyl	H	H	H	H	69.5, 5.3	381
35	Allyl	Ethyl	H	H	H	H	70.0, 5.6	395
36	Methyl	Methyl	H	H	H	Hydroxy	64.9, 4.9	371
37	Methyl	Methyl	Ethyl	H	H	H	69.1, 5.8	383

Příklad 4 *In vitro* cytotoxická aktivita nových derivátů na normálních a nádorových živočišných buňkách

5

Nízká cytotoxicita je nezbytná pro použití těchto látek v zemědělství. Jedním z parametrů používaných jako základ pro cytotoxickou analýzu je metabolická aktivita životaschopných buněk. Například mikrotitrační analýza, kde se používá Calcein AM, je dnes rozšířena jako metoda kvantifikace buněčné proliferace a cytotoxicity. Tento test je využíván v programech pro screening léků a pro testy chemosensitivity. Testem se rozpoznají pouze životaschopné buňky. Množství zredukovaného Calceinu AM odpovídá počtu životaschopných buněk v kultuře.

K rutinnímu screeningu sloučenin byly použity buněčné linie BJ (fibroblasty předkožky člověka), G361 (lidský maligní melanom) a K562 (chronická myeloidní leukémie lidské kostní dřeně). Buňky byly udržovány v plastových kultivačních baňkách Nunc/Corning 80 cm² a kultivovány v buněčném kultivačním médiu (DMEM s 5 g/l glukózy, 2 mM glutaminu, 100 U/ml penicilinu, 100 x g/ml streptomycinu, 10% fetální telecí sérum, a hydrogenuhličitan sodný).

Buněčné suspenze byly připraveny a naředěny podle typu buněk a podle očekávané konečné hustoty buněk (2.500-30.000 buněk na jamku na základě charakteristik buněčného růstu), pipetovalo se 80 µl buněčné suspenze na 96-jamkové mikrotitrační destičky. Inokuláty byly stabilizovány 24 hodinovou preinkubací při 37 °C v atmosféře 5% CO₂. Jednotlivé koncentrace testovaných látek byly přidány v čase nula jako 20 µl alikvotní podíl do jamek mikrotitračních destiček. Obvykle se sloučeniny ředily do šesti koncentrací v čtyřnásobné ředící řadě. Při rutinním testování byla nejvyšší koncentrace v jamce 166,7 µM, změny této koncentrace závisí na dané látce. Všechny koncentrace byly testovány v triplicátech. Inkubace buněk s testovanými deriváty trvala 72 hodin při 37 °C, 100 % vlhkosti a v atmosféře 5% CO₂. Na konci inkubační periody byly buňky analyzovány po přidání roztoku Calceinu AM (Molecular Probes) a inkubace probíhala další 1 hodinu. Fluorescence (FD) byla měřena pomocí Labsystem FIA readeru Fluorskan Ascent (Microsystems). Přežití nádorových buněk (tumor cell survival-TCS) bylo spočítáno podle následujícího vztahu: $IC_{50} = (FD_{\text{jamka s derivátem}} / FD_{\text{kontrolní jamka}}) \times 100 \%$. Hodnota IC₅₀, která odpovídá koncentraci látky, kdy je usmrceno 50 % nádorových buněk, byla vypočtena ze získaných dávkových křivek (Tab. 2).

Nulová cytotoxicita je základním předpokladem pro použití těchto látek v kosmetických aplikacích. Pro vyhodnocení protinádorové aktivity byla testována toxicita nových derivátů na panelech obsahujících buněčné linie rozdílného histogenetického a druhového původu (Tab. 2). Ukázalo se, že pro všechny testované linie bylo působení nových sloučenin srovnatelné, kdežto nemaligní buněčné linie, tzn. NIH3T3 fibroblasty a normální lidské lymfocyty, byly vůči tomuto působení rezistentní. Jak je ukázáno v tabulce 2, IC_{50} pro NIH3T3 fibroblasty a normální lidské lymfocyty byla vždy vyšší než 166,7 μ M. Nové deriváty vykazují nulovou toxicitu pro normální i nádorové buňky v koncentracích vyšších nebo blízko 166,7 μ M a jsou proto mnohem vhodnější pro kosmetické aplikace než "klasické fenolické sloučeniny".

Nízká cytotoxicita (vysoká hodnota IC_{50}) je základním předpokladem pro použití těchto látek v kosmetických a medicínálních aplikacích. Nulová cytotoxická aktivita byla nalezena pro nové deriváty v porovnání s klasickými fenolickými látkami, které jsou známé z předchozích vynálezů (kys. kumarová...).

Tabulka 2: Cytotoxicita nových sloučenin pro různé buněčné linie/ IC_{50} (μ mol/l)

Sloučenina	K562	G361	BJ
Kys. kumarová	>150	>150	>150
1	29.9	65	>150
2	19.5	68	>150
4	>150	>150	>150
8	>150	>150	>150
25	>150	>150	>150
29	>150	>150	>150
30	>150	>150	>150

Příklad 5 Protizánětlivá aktivita

Jedním z důležitých parametrů specifické buněčné imunity je odezva lymfocytů na antigeny nebo polyklonální mitogeny. Většina normálních savčích periferních lymfocytů je v klidové fázi buněčného cyklu. Antigeny i nespecifické polyklonální mitogeny mají schopnost aktivovat lymfatické buňky, což je doprovázeno dramatickými změnami ve vnitrobuněčném metabolismu (mitochondriální aktivita, proteinová syntéza, syntéza nukleových kyselin, formování blastů a buněčná proliferace). Sloučeniny, které jsou schopné selektivně inhibovat proliferaci lymfocytů, jsou potenciálními imunosupresivy. Pro měření proliferační odpovědi lymfocytů bylo vyvinuto množství *in vitro* analýz. Nejběžněji používanou metodou je inkorporace 3 H-thymidinu.

Během buněčné proliferace dochází nejprve k replikaci DNA, poté je buňka rozdělena na dvě dceřiné buňky. Tento úzký vztah mezi buněčným zdvojením a DNA syntézou poskytuje možnost pro vyhodnocení intenzity buněčné proliferace. Když jsou přidány do buněčné kultury značené DNA prekurzory, dělicí se buňky inkorporují značené nukleotidy do své DNA. Tyto testy obvykle vyžadují použití radioaktivně značených nukleotidů, konkrétně tritiovaný thymidin ($[^3$ H]-TdR). Množství $[^3$ H]-TdR inkorporované do buněčné DNA je kvantifikováno pomocí scintilačního počítače.

Lidskou heparinizovanou periferní krev jsme získali od zdravých dobrovolníků punkcí z kubitální žíly. Krev byla naředěna v PBS (1:3) a mononukleární buňky byly odseparovány centrifugací ve Ficoll-Hypaque hustotním gradientu (Pharmacia, 1,077 g/ml) při 2200 g po dobu 30 minut. Při následující centrifugaci byly lymfocyty promývány v PBS, poté resuspendovány v buněčném kultivačním mediu (RPMI 1640, 2 mM glutamin, 100 U/ml penicilin, 100 μ g/ml streptomycin, 10 % fetální telecí sérum a hydrogenuhličitan sodný).

- Buňky byly naředěny na cílovou hustotu 1.100.000 buněk/ml a byly pipetovány (180 µl) do 96-ti jamkových mikrotitračních destiček. Testované látky byly přidány k buněčným suspenzím ve čtyřkovém ředění v 20 µl alikvotech/jamku v čase nula. Obvykle byly testované sloučeniny vyhodnocovány v šesti koncentracích s nejvyšší testovanou koncentrací 266.7 µM. Jednotlivé koncentrace derivátů byly testovány v dubletu. Lymfocyty ve všech jamkách s výjimkou nestimulovaných kontrol byly aktivovány přidáním 50 µl konkanavalinu A (25 µg/ml). Buněčné suspenze byly dále inkubovány 72 hodin při 37 °C a při 100 % vlhkosti v atmosféře 5 % CO₂. Na konci inkubace byly buňky analyzovány pomocí [³H]-TdR:
- 10 Buňky byly inkubovány s 0,5 µCi (20 µl zásobního roztoku 500 µCi/ml) na jamku po dobu 6 hodin při 37 °C a 5 % CO₂. V dalším kroku byl použit automatizovaný buněčný harvester pro lýzu buněk ve vodě a adsorpci DNA na filtr ze skleněných vláken o velikosti mikrotitračního panelu. DNA s inkorporovaným [³H]-TdR je zadržena na filtru, přičemž neinkorporovaný materiál filtrem prochází. Filtry byly usušeny při pokojové teplotě přes noc, uzavřeny v plastických sáčcích s 10-12 ml scintilační tekutiny. Množství [³H]-TdR přítomné na každém filtru bylo stanoveno scintilačním počítačem. Efektivní imunosupresivní dávka (ED) byla spočítána podle následujícího vzorce: $ED = (CCPM_{\text{jamka s test. derivátem}} / \text{průměrná } CCPM_{\text{kontrolní jamka}}) \times 100 \%$. Hodnota ED₅₀, což je koncentrace látky inhibující proliferaci 50 % lymfocytů, byla spočítána z dávkových křivek.
- 20 Pro vyhodnocení imunosupresivní aktivity nových fenolických sloučenin byla analyzována jejich schopnost inhibovat polyklonálním mitogenem stimulovanou proliferaci normálních lidských lymfocytů (Tab. 3). Naše výsledky ukazují, že tyto sloučeniny mají minimální vliv na inkorporaci ³H-thymidinu v klidových (nestimulovaných) lymfocytech, nicméně účinně inhibují proliferaci mitogenem aktivovaných lymfocytů. Efektivní imunosupresivní dávka nových derivátů za *in vitro* podmíněk byla v rozmezí 1 - 20 µM.

Tabulka 3: Imunosupresivní aktivity sloučenin podle vynálezu

Sloučenina č.	Lidské lymfocyty ED ₅₀ (µM)
Kys. kumarová	≥ 20.0
1	1.7
2	3.6
4	7.4
8	8.5
12	6.2
14	6.5
17	4.3
20	5.1
21	2.6
22	1.9
25	2.4
29	3.6
30	1.8

30 **Příklad 6** Schopnost vychytávat volné radikály stanovená metodou ORAC

- Schopnost vychytávat volné radikály *in vitro* byla stanovena metodou ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity). Stručně, fluorescein (100 µl, 500 mM) a 25 µl roztoku testované látky bylo přidáno do každé jamky na 96-jamkové mikrotitrační desce preinkubované na 37 °C. Následně bylo rychle přidáno 25 µL 250 mM AAPH, deska byla protřepána 5 s a fluorescence (Ex. 485 nm, Em. 510 nm) byla odečítána každé 3 minuty po dobu 90 minut s použitím fluorimetru Infinite 200 (TECAN, Switzerland). Takzvaná NAUC (Net Area Under Curve) byla použita k vyjádření

antioxidační aktivity vztažené na standard troloxu. Látky s hodnotou vyšší než 1 jsou efektivnější než trolox, což je hydrofilní ekvivalent vitamínu E.

Látka	ORAC (látka/trolox) Průměr ± SD (n=3)
Kys. kumarová	6.2±0.3*
1	1.0±0.1
2	0.1±0.0
4	12.8±1.3
8	3.2±0.4
12	2.1±0.2
20	4.3±0.2

5 **Příklad 7** Aktivace transkripčního faktoru Nrf2

Schopnost látek aktivovat Nrf2-dependentní expresi byla stanovena pomocí EpRE-LUX reportérové linie. Stručně, látky v koncentracích 100, 10, 1 a 0.1 μM byly inkubovány s 24 h s buňkami. Buňky byla zlyzovány (10 mM Tris, 2 mM DTT) a byl přidán pufr obsahující 0,2 mM luciferin pro spuštění luminiscenční reakce. Nárůst luminiscence byl změřen luminometrem Infinite M200 (TECAN). Látky s hodnotou Nrf2 větší než 1 jsou efektivnější než dimethylfumarát (DMF), což je silný aktivátor Nrf2 schválený pro léčbu psoriázy a roztroušené sklerózy.

Látka	Nrf2 (látka/DMF) Průměr ± SD (n=3)
Kumarová kyselina	0.24±0.02*
1	5.17±0.85
2	4.65±0.39
4	2.71±0.66

15 **Příklad 8** Antimikrobiální aktivita

Antimikrobiální aktivita syntetizovaných látek byla stanovena standardní ředící mikrometodou. Jednorázové mikrotitrační desky byly použity k provedení testu. Látky (10 mM) byly naředěny 50 krát do Brain heart infusion pro snížení koncentrace DMSO pod 2%, což je koncentrace, která neovlivňuje růst bakterií. Následovalo další ředění (2 až 512 krát) Breath heart infusion broth inokulovaným testovanými bakteriemi/kvasinkami/plísněmi v koncentraci 105 až 106 CFU mL⁻¹. Testované koncentrace látek byly 10 až 2000 μM . Minimální inhibiční koncentrace (MIC) bakterií, kvasinek a plísní byla odečtena po 48 hodinách inkubace při 30 °C.

25 Tabulka 4: Antimikrobiální aktivita látek proti zubním patogenům vyjádřena jako MIC (μM)

Kmen patogenu		1	2	4
<i>Streptococcus mitis</i>	CCM 7411	> 2000	> 2000	250
<i>Streptococcus mutans</i>	CCM 7409	125	62.5	125
<i>Streptococcus sanguinis</i>	CCM 4047	> 2000	> 2000	250
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	CCM 4833	> 2000	> 2000	250
<i>Actinomyces odontolyticus</i>	CCM 4740	250	62.5	125
<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	CCM 3790	> 2000	250	250

Tabulka 5: Antimikrobiální aktivita látek proti obecným patogenům vyjádřena jako MIC (μM)

Kmen patogenu		1	2	3
<i>Staphylococcus aureus</i>	CCM 3953	>1000	>1000	250
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	CCM 7221	>1000	>1000	250
<i>Enterococcus faecalis</i>	CCM 4224	>1000	>1000	500
<i>Listeria monocytogenes</i>	CCM 4699	>1000	>1000	500
<i>Bacillus cereus</i>	CCM 2010	250	31	250
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	CCM 3955	>1000	>1000	>1000
<i>Escherichia coli</i>	CCM 3954	>1000	>1000	500
<i>Clostridium perfringens</i>	CCM 5744	>1000	>1000	250
<i>Fusobacterium simiae</i>	CCM 3660	>1000	>1000	500
<i>Candida albicans</i>	ATCC 90028	1000	>1000	500
<i>Aspergillus niger</i>	CCM 8189	>1000	>1000	500

Příklad 9 Amesův Test

5 Testovaná látka (**1, 2, 3, 4**) byla testována na mutagenitu bakteriálním testem reverzních mutací. Provedení testu bylo založeno na metodě EU B.13/14 Mutagenicity – Reverse mutation test using bacteria, která je analogem metodiky OECD Test Guideline No. 471. Byly použity čtyři indikátory kmene *Salmonella typhimurium* TA 98, TA 100, TA 1535, TA 1537 a také byl použit jeden kmen

10 *Escherichia coli* WP2 uvrA. Testovaná látka se rozpustila v dimethylsulfoxidu (DMSO) a byla testována v dávkách 10 až 1000 μg na jednu desku, která byla aplikována na plotny v objemu 0,1 ml. Experimenty byly prováděny s metabolickou aktivací se supernatantem z krysích jater a směsi kofaktorů stejně jako bez metabolické aktivace. Pracovní postup byl proveden podle dokumentů Metody B. 13 / 14, Mutagenicity – Reverse mutation test using bacteria, Council Regulation (EC)

15 No.440/2008. Published in O. J. L 142, 2008 a podle metodiky OECD Test Guideline 471, Bacterial Reverse Mutation Test. Adopted July 21, 1997. Při testování v uspořádání uvedeném výše se každá testovaná látka projevila jako nemutagenní pro všechny použité testovací kmeny s metabolickou aktivací stejně jako bez metabolické aktivace.

Příklad 10 In vitro test dráždivosti pokožky

Látka **1** byla testována na *in vitro* dráždivost kůže na lidském epidermálním modelu EpiDermTM. Test byl proveden v souladu se OECD směrnici No. 439: *In Vitro* Skin Irritation: Reconstructed Human Epidermis Test Method (2015) and Protocol for: In Vitro EpiDermTM Skin Irritation Test

25 For use with MatTek Corporation's Reconstructed Human Epidermal Model EPI-200-SIT. V předběžných experimentech nebyla detekována redukce MTT ani barevná interference, V hlavním experimentu po preinkubaci tkání bylo přidáno 25 mg látky **1** na zvlhčenou tkáň a rozetřeno po celé ploše tkáně. Délka expozice byla 60 minut. Tři tkáně byly použity pro vzorek, tři pro pozitivní a tři pro negativní kontrolu. Po odstranění vzorku byly tkáně inkubovány 42 hodin.

30 Následovala tří hodinová inkubace s MTT a dvouhodinová extrakce za třepání. Optická densita (OD_{570}) isopropylalkoholového extraktu byla změřena na spektrometru. Relativní buněčná viabilita byla spočítána pro každou tkáň jako % průměrné viability negativní kontroly. V popsáném experimentu byla průměrná viabilita ošetřených tkání 96%, např. viabilita byla >50%. Efekt látky **1** v modelu EpiDermTM byl negativní (tkáně nebyly poškozeny). V souladu s klasifikačními kritérii

35 je testovaná látka **1** považována za nepatřící do žádné kategorie vztahující se k dráždivosti kůže.

Příklad 11 Formulace ústní vody

Formulace ústní vody byla vyrobena kombinací následujících složek:

40 Polyol 20,0%
PEG 6 / Ultra PEG 300 15,0%

- Polysorbát 20 5,0%
- Fenolický derivát 0,1%
- Voda 57,6%
- Sukralóza 0,30%
- 5 Belwood Wintergreen 2,0%

Příklad 12 *Formulace zubní pasty*

Výhodná formulace zubní pasty obsahuje od asi 10% do asi 40% d-limonenu (98,0% nebo vyšší čistota, výhodněji 98,5% -99,0%); od přibližně 15% do přibližně 35% sorbitolu; od asi 15% do asi 30% silikagelu (např. ZEODENT 113 a ZEODENT 165), od asi 10% do asi 20% vody; od přibližně 5% do přibližně 15% glycerinu, od přibližně 2% do přibližně 7% povrchově aktivní látky (např. Polysorbát 20), od přibližně 1% do přibližně 2% aromatického činidla (včetně sacharinu sodného), od přibližně 0,5% do přibližně 1,5% oxidu titaničitého, od asi 0,5% do asi 1,5% pojiva (např. guma CEKOL 2000), od asi 0,05% do asi 0,15% konzervačního činidla (např. benzoátu sodného), od asi 0,25% do asi 1,75% čistého vápníku, a od asi 0,10% do asi 1,75% fosforečnanu hořečnatého.

A) Formulace zubní pasty byla vyrobena kombinací následujících složek:

- 25,00% polyol (sorbitol)
- 20,00% Zeodent 113 (oxid křemičitý abasivní)
- 20 0,20% fenolický derivát (sloučenina 1, čistota alespoň 99,5%)
- 33,19% vody
- 10,00% Glycerin Natural
- 5,00% polysorbát 20
- 2,70% Zeodent 165 (abrazivní oxid křemičitý)
- 25 1,00% Flavour 484 (značka Walmart)
- 1,00% oxid titaničitý
- 1,00% CMC 9M31XF / Cekol 2000 (pojivová guma)
- 0,45% vápníku
- 0,25% sacharinu
- 30 0,11% fosforečnan hořečnatý
- 0,10% benzoát sodný

A) A toothpaste formulation was manufactured by combining the following components:

- 25.00% polyol (sorbitol)
- 20.00% Zeodent 113 (oxid křemičitý abasivní)
- 35 Předchozí složky byly spojeny následujícím způsobem: Sacharid sodný a benzoát sodný byly rozpuštěny ve vodě a ponechány stranou. Cekol a glycerin byly spojeny a za současného smíchání těchto dvou složek byl přidán polyol. Roztok sacharinu sodného a benzoátu sodného byl poté přidán do směsi Cekol/glycerin a polyolu. Poté byl do směsi přidán Zeodent 165 a dobře promíchán, poté následoval Zeodent 113, který byl opět dobře promíchán, dokud nebyla směs bez hrudek. Oxid titaničitý, polysorbát 20 a d-limonen byly smíchány se směsí a míchány, dokud nebyla směs hladká. Nakonec byl přidán fosforečnan vápenatý a hořečnatý a následně ochucováadlo (tj. příchut' 484).
- 40

Příklad 13 *Farmaceutické přípravky*

- 45 Přípravky obvykle obsahují 0,1 až 99 % z hmotnosti, obzvláště 0,1 až 95 % hmotnosti, směsi účinných látek obsahující fenolický derivát obecného vzorce 1 podle tohoto vynálezu, 1 až 99,9 % hmotnosti pevné nebo kapalné přípravky, a od 0 do 25 % hmotnosti, obzvláště 0,1 až 25 % hmotnosti, povrchově aktivního činidla. Zatímco komerční produkty jsou obvykle formulovány jako koncentráty, konečný uživatel bude normálně používat zředěné formulace. Tyto prostředky mohou také obsahovat další přísady, jako jsou stabilizátory, například rostlinné oleje nebo epoxidované rostlinné oleje (epoxidovaný kokosový, řepkový olej nebo sójový olej), činidla proti pění, například silikonový olej, konzervační látky, regulátory viskozity, pojidla, látky způsobující lepivost a také hnojiva nebo jiné aktivní složky. Výhodné formulace mají zejména
- 50 následující složení: (% = hmotnostní procenta):
- 55

A1: Suché Kapsle

5 5000 Tobolek, z nichž každá obsahuje 0,25 g fenolického derivátu, se připraví následujícím způsobem:

Složení: Léčivá látka: 1250 g; Talek 180 g; Pšeničný škrob: 120 g; Stearát hořečnatý: 80 g; Laktóza 20 g.

10 Postup přípravy: Rozetřené látky jsou tlačeny přes síto s velikostí ok 0,6 mm. Dávka 0,33 g směsi je přenesena do želatinové tobolky pomocí stroje na plnění tobolek.

A2: Měkké tobolky

5000 měkkých želatinových tobolek, z nichž každá obsahuje 0,05 g fenolický derivát jako účinnou látku, se připraví následujícím způsobem:

15 Složení: 250 g Účinná látka + 21 g Lauroglycol

20 Postup přípravy: Prášková aktivní složka je suspendována v Lauroglykol® (propylenglykol laurát, Gattefossé SA, Saint Priest, Francie) a rozetřena ve vlhkém pulverizátoru na velikost částic asi 1 až 3 mm. Dávka o velikosti 0,419 g směsi je potom přenesena do měkkých želatinových tobolek pomocí přístroje na plnění tobolek.

A3: Měkké tobolky

25 5000 měkkých želatinových tobolek, z nichž každá obsahuje 0,05 g sloučeniny obecného vzorce 1 jako účinnou látku, se připraví následujícím způsobem:

Složení: 250 g účinné složky v 1 l PEG 400, 1 litr Tween 80.

30 Postup přípravy: Prášková aktivní složka je suspendována v PEG 400 (polyethylenglykol o mh mezi 380 a 420, Sigma, Fluka, Aldrich, USA) a Tween 80 (polyoxyethylen sorbitan monolaurát, Atlas Chem Inc., Inc., USA, dodává Sigma, Fluka, Aldrich, USA) a rozetřena ve vlhkém pulverizátoru na velikost částic asi 1 až 3 mm. Dávka o velikosti 0,43 g směsi je potom přenesena do měkkých želatinových tobolek pomocí přístroje na plnění tobolek.

Příklad 14 Gelový přípravek

35

Formulace masť byla testována během pilotní klinické studie se 4 dobrovolníky s psoriázou, což je onemocnění kůže. Složky jsou uvedeny v gramech na 100 g.

látka	Obsah
Látka 1	1.0 g
Butylhydroxytoluenum	0.2 g
Butylparaben	0.2 g
Diethyleneglycol monoethyl ether	10.0 g
Silica colloidalis anhydrica	5.0 g
Propylene glycol laurate	83.6 g

40 Gel této konzistence může být navíc modifikován přidáním oxidu křemičitého, colloidalis anhydrica. Také se opět předpokládá, že transdermální systém Transcutol P/Lauroglycol FCC zvýší účinnost látky 1. Oxid křemičitý colloidalis anhydrica pravděpodobně zpomalí penetraci účinné látky.

Příklad 15 *Postup přípravy kožní masti*

Složky masti jsou uvedeny v gramech na 200 g:

Látka	Obsah
Látka 1	2.0 g
Butylhydroxytoluenum	0.4 g
Butylparaben	0.4 g
Diethyleneglycol monoethyl ether	20.0 g
Glycerol dibehenate	44.0 g
Propylene glycol laurate	133.2 g

5

Doporučený postup

Fáze A: 2 g látky **1** se rozpustí ve 20 g Transcutol P za stálého míchání při teplotě místnosti v oddělené skleněné nebo nerezové nádobě. Proces rozpouštění může být urychlen zahříváním roztoku na maximální teplotu 40 °C.

10

Fáze B: 0.4 g Nipanox BHT a 0,4 g Nipabutyl se rozpustí za stálého míchání v 133,2 g Lauroglycolu FCC při teplotě přibližně 70 °C, v další samostatné skleněné nebo nerezové nádobě. Čirý olejovitý roztok se zahřívá na teplotu přibližně 80 °C a 44 g Compritol 888 ATO se tavi v něm, za stálého míchání. Čirý olejovitý roztok se ochladí na cca 60 °C za stálého míchání a ochlazení a smísí se s fází A. Vzniklá bělavá mast je rozdělena na přibližně 15 g porce a plní se do předem připravených plastových nádob.

15

Příklad 16 *Formulace přípravku pro lokální aplikaci na kůži*

Prostředek pro místní aplikaci na kůži obsahuje následující složky podle hmotnostních %:

20

Aktivní složka:	Látka 1	0,1%
Olejová fáze:	Cetylalkohol	5,0%
	Glycerylmonostearát	15,0%
	Sorbitanmonooleát	0,3%
	Polysorbát 80 USP	0,3%
	Methylcelulózová 100 cps	1,0%
	Methylparaben	0,25%
	Propylparaben	0,15%
	Vyčištěná voda q.s.	na 100%

25

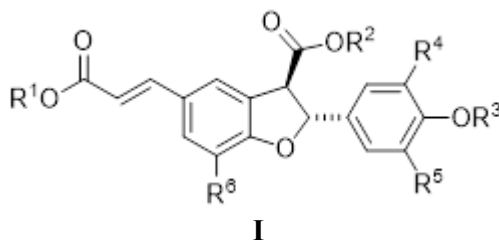
30

Methylparaben a propylparaben se rozpustí v horké vodě a následně se v ní disperguje i methylcelulóza. Směs se pak ochladí na 60 °C, dokud se methylcelulóza nerozpustí. Směs se potom zahřívá na 72 °C a přidá se do olejové fáze, která se zahřívá na teplotu 70 °C za stálého míchání. Dihydrobenzofuranové deriváty obecného vzorce 1 se přidá při teplotě 35 °C a výsledná směs se míchá až do okamžiku rozptýlení. Tento prostředek se aplikuje na kůži přinejmenším každý den, dokud se nedosáhne požadovaného zmírnění stárnutí kůže (proti stárnutí).

35

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Dihydrobenzofuranový derivát obecného vzorce I,



kde

10

R¹ je vybrán ze skupiny zahrnující methyl, ethyl, *n*-propyl, *isopropyl* a allyl;

R² je vybrán ze skupiny zahrnující methyl, ethyl, *n*-propyl, *isopropyl* a allyl;

R³ je vybrán ze skupiny zahrnující H, C1-C8 alkyl a C2-C7 alkenyl;

R⁴, R⁵ jsou nezávisle vybrány ze skupiny zahrnující H, hydroxy a C1-C8 alkoxy,

15

R⁶ je vybrán ze skupiny zahrnující H, hydroxy, C1-C8 alkyl, C1-C8 alkoxy a C2-C7 alkenyl.

2. Dihydrobenzofuranový derivát obecného vzorce I podle nároku 1, kde R¹ je methyl, ethyl, *n*-propyl, nebo *isopropyl*, R² je methyl, ethyl, *n*-propyl, nebo *isopropyl*, R³ je vodík, methyl nebo ethyl, R⁴ je vodík, methoxy nebo ethoxy, R⁵ je vodík, methoxy nebo ethoxy, a R⁶ je vodík, methoxy nebo ethoxy.

20

3. Dihydrobenzofuranový derivát obecného vzorce I podle nároku 1, vybraný ze skupiny látek zahrnující methyl (2*R*,3*R*)-2-(4-hydroxyfenyl)-5-((*E*)-3-methoxy-3-oxoprop-1-en-1-yl)-2,3-dihydrobenzofuran-3-karboxylát methyl (2*S*,3*S*)-2-(4-hydroxyfenyl)-5-((*E*)-3-methoxy-3-oxoprop-1-en-1-yl)-2,3-dihydrobenzofuran-3-karboxylát; ethyl (2*R*,3*R*)-2-(4-hydroxyfenyl)-5-((*E*)-3-methoxy-3-oxoprop-1-en-1-yl)-2,3-dihydrobenzofuran-3-karboxylát; ethyl (2*S*,3*S*)-2-(4-hydroxyfenyl)-5-((*E*)-3-methoxy-3-oxoprop-1-en-1-yl)-2,3-dihydrobenzofuran-3-karboxylát; ethyl (2*R*,3*R*)-5-((*E*)-3-ethoxy-3-oxoprop-1-en-1-yl)-2-(4-hydroxyfenyl)-2,3-dihydrobenzofuran-3-karboxylát.

25

30

4. Dihydrobenzofuranový derivát obecného vzorce I podle kteréhokoliv z nároků 1 až 3 pro použití jako antioxidanty v rostlinách, savcích nebo u lidí, zejména jako antioxidanty pro inhibici oxidace lipidů, proteinů a DNA v rostlinách, savcích nebo lidech.

35

5. Dihydrobenzofuranový derivát obecného vzorce I podle kteréhokoliv z nároků 1 až 3 pro použití jako léčiva.

40

6. Dihydrobenzofuranový derivát obecného vzorce I podle kteréhokoliv z nároků 1 až 3 pro použití pro léčbu kožních onemocnění, jakými jsou akné, erytém a zarudnutí, a/nebo jako protizánětlivých léčiv.

7. Dihydrobenzofuranový derivát obecného vzorce I podle kteréhokoliv z nároků 1 až 3 pro použití pro léčbu zánětu, pro urychlení hojení lézí a pro poskytnutí úlevy od bolesti a dalších imunologických reakcí vyplývajících ze zánětu.

45

8. Dihydrobenzofuranový derivát obecného vzorce I podle kteréhokoliv z nároků 1 až 3 pro inhibici růstu nebo pro usmrcení bakterií v ústní dutině.

9. Dihydrobenzofuranový derivát obecného vzorce I podle kteréhokoliv z nároků 1 až 3 pro prevenci nebo léčení nemoci způsobené bakteriální infekcí podáváním účinného množství modulátoru bakteriálního růstu.
- 5 10. Dihydrobenzofuranový derivát obecného vzorce I podle kteréhokoliv z nároků 1 až 3 pro inhibici růstu nebo usmrcení bakterií, kde uvedené bakterie jsou vybrány ze skupiny zahrnující *Porphyromonas gingivalis*, *Strep. mutans*, *Strep. pyogenes*, *Bacteroides species*, *Actinobacillus action mycetemcomitons*, *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum*, *Campylobacter rectus*, *Eikenella corrodens*, *Peptostreptoloccus micros*, *Selenomonas sp.*, *Eubacterium sp.*,
10 *Streptococcus species*, *Spirochetes treponema denticola*, *Bacilus cereus*, a *Treponema pallidum*.
11. Dihydrobenzofuranový derivát obecného vzorce I podle kteréhokoliv z nároků 1 až 3 pro léčbu periodontálních chorob a prevenci zubního kazu.
- 15 12. Dihydrobenzofuranové deriváty obecného vzorce I podle kteréhokoliv z nároků 1 až 3 pro použití jako kosmetika.
13. Farmaceutický nebo kosmetický přípravek, **vyznačující se tím**, že obsahuje jeden nebo více derivátů obecného vzorce I podle některého z nároků 1 až 3 a alespoň jednu pomocnou látku.
20
14. Farmaceutický nebo kosmetický přípravek podle nároku 13, **vyznačující se tím**, že je jím zubní pasta nebo ústní voda.