

(19)  
ČESKÁ  
REPUBLIKAÚŘAD  
PRŮMYSLOVÉHO  
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: 2020-78  
 (22) Přihlášeno: 18.02.2020  
 (40) Zveřejněno: 25.08.2021  
 (Věstník č. 34/2021)  
 (47) Uděleno: 01.12.2021  
 (24) Oznámení o udělení ve věstníku: 12.01.2022  
 (Věstník č. 2/2022)

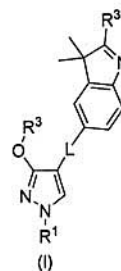
C07D 403/06 (2006.01)  
 A61K 31/4155 (2006.01)  
 A61P 35/00 (2006.01)  
 A61P 31/04 (2006.01)  
 A61K 41/00 (2020.01)

(56) Relevantní dokumenty:  
 James NS, Chen Y, Joshi P, et al. Evaluation of polymethine dyes as potential probes for near infrared fluorescence imaging of tumors: part - 1. Theranostics. 2013;3(9):692-702. Published 2013 Aug 21. ISSN: 1838-7640; doi:10.7150/thno.5922; Gabrielė Varvuolytė, Lukáš Malina, Aurimas Bieliauskas, Barbora Hošíková, Helena Simerská, Hana Kolářová, Neringa Kleizienė, Vladimír Kryštof, Algirdas Šačkus, Asta Žukauskaitė: Synthesis and photodynamic properties of pyrazole-indole hybrids in the human skin melanoma cell line G361. Dyes and Pigments, 2020, Available online 12-07-2020, ISSN 0143-7208, <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2020.108666>.

(73) Majitel patentu:  
 Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc, CZ  
 Kauno Technologijos Universitetas, 44249 Kaunas,  
 LT

(72) Původce:  
 Gabriele Varvuolyte, 53180 Margininku kaimas,  
 Kauno raj., LT  
 Lukáš Malina, Šternberk, CZ  
 Aurimas Bieliauskas, 46391 Kaunas, LT  
 Barbora Hošíková, Prostějov, CZ  
 Helena Simerská, Olomouc, Neředín, CZ  
 Hana Kolářová, Hněvotín, CZ  
 Neringa Kleiziene, 48147 Kaunas, LT  
 Miroslav Strnad, Olomouc, Neředín, CZ  
 Egle Arbačiauskiene, 44282 Kaunas, LT  
 Vladimír Kryštof, Olomouc, CZ  
 Algirdas Šačkus, 44326 Kaunas, LT  
 Asta Žukauskaite, Olomouc, CZ

(74) Zástupce:  
 HARBER IP s.r.o., Dukelských hrdinů 567/52,  
 170 00 Praha 7, Holešovice



(54) Název vynálezu:  
**Pyrazol-indolové konjugáty pro  
 fotodynamickou léčbu rakoviny a  
 bakteriálních infekcí**

(57) Anotace:  
 Předkládané řešení se týká nových pyrazol-indolových derivátů obecného vzorce I konjugovaných ethenovými, buta-1,3-dienovými nebo ethylenovými linkery a obsahujícími substituenty v polohách R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup> a R<sup>3</sup>, které lze použít při fotodynamické terapii nádorů nebo bakteriálních infekcí. Řešení dále zahrnuje farmaceutické přípravky obsahující konjugované pyrazol-indolové deriváty.

## Pyrazol-indolové konjugáty pro fotodynamickou léčbu rakoviny a bakteriálních infekcí

### Oblast techniky

5

Předkládané řešení se týká nových konjugovaných pyrazol-indolových derivátů, které mají nízkou toxicitu ve tmě a naopak získávají fotodynamické vlastnosti proti nádorům a bakteriím po ozáření světlem. Popsán je také způsob přípravy nových sloučenin a meziproductů pro jejich přípravu, a rovněž i jejich použití jako léčiva.

10

### Dosavadní stav techniky

Fotodynamická terapie (PDT) je nechirurgická, minimálně invazivní léčba, která využívá léky citlivé na světlo (fotosenzibilizátor, PS), zdroj světla a kyslík k produkci cytotoxických reaktivních forem kyslíku (ROS), které zase způsobují abnormální destrukci buněk (Tampa et al., *Oncol. Lett.* 17 (2019) 4085). V dnešní době se léčba pomocí PDT využívá u řady kožních onemocnění, jako je psoriáza, akné, bakteriální infekce, nebo u některých typů rakovin, jako je karcinom bazálních buněk, karcinom skvamózních buněk, melanom, rakovina plic, hlavy, úst, hrtanu, močového měchýře, nebo nazofaryngeální, vaginální a cervikální karcinomy (Svanberg and Bendsoe, *Lasers Med. Appl.* (2013) 760; Usuda et al., *J. Thorac. Oncol.* 1 (2006) 489).

Klinicky používanými fotosenzibilizátory jsou obvykle makromolekulární porfyrinoidní sloučeniny, jako jsou porfyriny, chloriny, bakteriochloriny, ftalocyaniny, například porfimer sodný (HPD), mono-L-aspartylechlorin e6 (NPe6), palladium bacteroefofoforbid (WST-11), temoporfin, verteporfin, redaporfin (Dabrowski et al., *Photobiol. Sci.* 14 (2015) 1765–1780; Dos Santos et al., *J. Cancer Metastasis Treat.* 5 (2019) 25) nebo prekurzory endogenního protoporfyrinu IX (PpIX), tj. kyselina 5-aminolevulinová (ALA), methyaminolevulinát (MAL) a hexaminolevulinát (HAL).

Na druhou stranu bylo zjištěno, že řada dalších sloučenin s prodlouženými konjugovanými systémy má fotodynamické vlastnosti, například bórdipyrometheny, také známé jako BODIPYs (Zhang et al., *Acta Pharm. Sin. B.* 8 (2018) 137), jejich analogy aza-BODIPYs (Awuah and You, *RSC Adv.* 2 (2012) 11169), antrachinony (Comini et al., *Phytomedicine.* 18 (2011) 1093), xantheny (Gianotti et al., *Chem. - A Eur. J.* 20 (2014) 10921), kyaniny (Usama et al., *ACS Appl. Bio Mater.* 1 (2018) 1195), kurkuminoidy (Tonon et al., *J. Contemp. Dent. Pract.* 16 (2015) 1), fenothiaziny a benzofenothiaziny (Cincotta et al., *Cancer Res.* 54 (1994) 1249; Saucin and Van de Vorst, *Radiat. Environ. Biophys.* 17 (1980) 159). Je známo, že pro zvýšení fotodynamických vlastností fotosenzibilizátorů je kromě použití prodloužené  $\pi$  konjugace možná rovněž kovalentní dimerizace výchozí struktury, zavedení TEMPO nebo substituce těžkými atomy (chlor, brom, jod), případně chelatace s kovy (Atchison et al., *Chem. Commun.* 53 (2017) 2009). Přes četné pokroky a znalosti získané v této oblasti (Abrahamse and Hamblin, *Biochem. J.* 473 (2016) 347), je vývoj fotosenzibilizátorů vhodných pro PDT náročný úkol, protože tyto sloučeniny musí splňovat mnoho požadavků, jako je nízká toxicita ve tmě, ale silná fotocytotoxicita, absorpce dlouhých vlnových délek, selektivita vůči cílovým buňkám atd. (Huang, *Technol. Cancer Res. Treat.* 4 (2005) 283). Proto syntéza nových typů fotosenzibilizátorů zůstává v současné organické chemii stále relevantní.

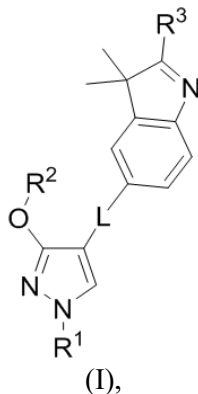
Předkládaný vynález poskytuje řadu nových substituovaných derivátů konjugovaného pyrazol-indolu, které jsou využitelné pro fotodynamickou terapii, a proto je lze použít jako protinádorová fotosenzibilizující léčiva při léčbě kožních a epitelálních nádorů přístupných světelnému záření nebo jako antimikrobiální fotosenzibilizující činidla.

50

Podstata vynálezu

5 Předmětem předkládaného řešení jsou nové deriváty konjugovaného pyrazolu a indolu, které mají fotodynamické vlastnosti a nízkou toxicitu ve tmě, což je činí použitelnými pro použití jako protinádorová léčiva a antibiotika.

K dosažení tohoto předmětu řešení jsou navrženy pyrazol-indolové deriváty obecného vzorce I



ve kterém

15 L je vybrán ze skupiny zahrnující  $-\text{CH}=\text{CH}-$ ,  $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}-$ ,  $-\text{C}\equiv\text{C}-$ ;

$\text{R}^1$  je fenyl, který může být nesubstituovaný nebo případně substituovaný 1 až 2 substituenty vybranými ze skupiny obsahující fluor, methyl a methoxy skupinu;

20  $\text{R}^2$  je C1-C8 alkyl, s výhodou C1-C6 alkyl, který může být rozvětvený nebo lineární, přičemž v alkylu může případně být jeden nebo dva atomy uhlíku nahrazeny heteroatomem vybraným ze skupiny obsahující O, N nebo S;

25  $\text{R}^3$  je fenyl, který může být nesubstituovaný nebo případně substituovaný 1 až 2 substituenty vybranými ze skupiny zahrnující F, Cl a methoxy;

nebo jejich farmaceuticky přijatelné soli.

30 Předkládané řešení s výhodou zahrnuje sloučeniny obecného vzorce I, kde L je  $-\text{CH}=\text{CH}-$ ,  $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}-$ , nebo  $-\text{C}\equiv\text{C}-$ ;  $\text{R}^1$  je fenyl;  $\text{R}^2$  je hexyl;  $\text{R}^3$  je fenyl.

Obecné skupiny substituentů mají následující význam:

35 methyl znamená skupinu  $-\text{CH}_3$ ,

methoxy znamená skupinu  $-\text{OCH}_3$ ,

40 alkyl znamená rozvětvený nebo nerozvětvený alkylový řetězec obsahující 1 až 8 atomů uhlíku, s výhodou vybranou ze skupiny zahrnující methyl, ethyl, propyl, isopropyl, butyl, isobutyl, pentyl, isopentyl, hexyl, isohexyl, heptyl, isoheptyl, oktyl. Alkyl s atomem uhlíku nahrazeným heteroatomem může být například 2-methoxyethyl.

45 Předmětem tohoto řešení jsou konjugované pyrazol-indolové deriváty obecného vzorce I pro použití jako léčiva.

Dalším předmětem tohoto řešení jsou konjugované pyrazol-indolové deriváty obecného vzorce I pro použití jako fotosenzibilizátory pro inhibici buněčné proliferace a/nebo indukci buněčné smrti.

5 Předmětem tohoto řešení jsou rovněž konjugované pyrazol-indolové deriváty obecného vzorce I pro použití při léčbě poruch, vybraných ze skupiny zahrnující rakovinu, kožní onemocnění, zánětlivá onemocnění a bakteriální infekce.

10 Dalším předmětem tohoto řešení jsou konjugované pyrazol-indolové deriváty obecného vzorce I pro použití při výrobě léčiva pro léčení onemocnění vybraných ze skupiny zahrnující psoriázu, akné, bakteriální infekce, karcinom bazálních buněk, karcinom skvamózních buněk, melanom, rakovina plic, hlavy, úst, hrtanu, močového měchýře, nebo nazofaryngeální, vaginální a cervikální karcinomy.

15 Kromě terapeutických aplikací lze předmětné sloučeniny použít jako regulátory buněčné proliferace buněk *in vitro*, například v buněčných a tkáňových kulturách.

Dalším předmětem tohoto řešení jsou konjugované pyrazol-indolové deriváty obecného vzorce I jako fotosenzibilizující sloučeniny při protinádorových terapiích.

20 Předmětem tohoto řešení jsou také konjugované pyrazol-indolové deriváty obecného vzorce I pro použití při léčbě bakteriálních a mikrobiálních infekcí kůže, ústní dutiny, vnitřních povrchů horních cest dýchacích a vnitřních povrchů genito-močového traktu. Sloučeniny podle vynálezu mají antimikrobiální aktivitu alespoň proti grampozitivním bakteriím.

25 Po aplikaci konjugovaných pyrazol-indolových derivátů obecného vzorce I se na místo ošetření aplikuje světelné záření. Výhodná vlnová délka aktivačního záření je mezi 400 nm a 450 nm, s výhodou odpovídající maximu absorpce daného derivátu. Záření může být nekoherentní, například ze zdroje na bázi diod, nebo koherentní (laserové). Dle konstrukce světelného zdroje lze ozařovat jak povrchové léze, tak léze uvnitř těla (vnitřní dutiny), např. zdroji s optickými vlákny.

30 Řešení také zahrnuje farmaceutický prostředek, který obsahuje alespoň jeden konjugovaný pyrazol-indolový derivát a vhodný farmaceuticky přijatelný nosič.

35 Nové sloučeniny podle tohoto řešení mohou být použity samy o sobě nebo jako meziprodukty při přípravě nových sloučenin, které mají širokou škálu diagnostických, terapeutických a průmyslových aplikací.

Mimořádně výhodnými sloučeninami jsou tyto deriváty obecného vzorce I:

40 5-{[3-(Hexyloxy)-1-fenyl-1H-pyrazol-4-yl] ethynyl}-3,3-dimethyl-2-fenyl-3H-indol (5),

5-{(E)-2-[3-(Hexyloxy)-1-fenyl-1H-pyrazol-4-yl]ethenyl}-3,3-dimethyl-2-fenyl-3H-indol (7),

45 5-{(1E,3E)-4-[3-(Hexyloxy)-1-fenyl-1H-pyrazol-4-yl]buta-1,3-dien-1-yl}-3,3-dimethyl-2-fenyl-3H-indol (10).

Farmaceutické přípravky

50 Terapeutický 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, čípky 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.

55

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

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 pomocné látky, např. konzervační přípravky, stabilizátory, zvlhčovačlá a/nebo emulgátory, rozpouštěcí činidla, soli pro regulaci osmotického tlaku a/nebo pufrů. Jsou připravovány známým způsobem, např. 10 běžným rozpouštěním nebo lyofilizací. Zmíněné roztoky nebo suspenze mohou obsahovat látky zvyšující viskozitu, jako např. sodnou sůl karboxymethylcelulózy, dextran, polyvinylpyrrolidon nebo želatinu.

Olejové suspenze obsahují jako olejovou složku rostlinné, syntetické nebo semisyntetické oleje 15 obvyklé pro injekční účely. Oleje, které zde mohou být zmíněny, jsou obzvláště kapalně estery mastných kyselin, které obsahují jako kyselou složku mastnou kyselinu s dlouhým řetězcem majícím 8 až 22, s výhodou pak 12 až 22 uhlíkových atomů, např. kyselinu laurovou, tridekanovou, myristovou, pentadodekanovou, palmitovou, margarovou, stearovou, arachidonovou a behenovou, nebo odpovídající nenasycené kyseliny, např. kyselinu olejovou, alaidovou, erukovou, brasidovou 20 a linolenovou, případně s přídavkem antioxidantů, např. vitamínu E,  $\beta$ -karotenu nebo 3,5-di-*terc*-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. ethyloleát, isopropylmyristát, isopropylpalmitát, 25 „Labrafil M 2375“ (polyoxyethylenglyceroltrioleát, Gattefoscé, Paříž), „Labrafil M 1944 CS“ (nenasycené polyglykolované glyceridy připravené alkoholůzou oleje z meruňkových jader a složené z glyceridů a esterů polyethylenglykolu; Gattefoscé, Paříž), „Labrasol“ (nasycené polyglykolované glyceridy připravené alkoholůzou TCM a složené z glyceridů a esterů polyethylenglykolu; Gattefoscé, Paříž) a/nebo „Miglyol 812“ (triglycerid nasycených mastných 30 kyselin s délkou řetězce C8 až C12 od Hüls AG, Německo) a zvláště rostlinné oleje jako bavlníkový olej, mandlový olej, olivový olej, ricinový olej, sezamový olej, sójový olej a zejména olej z podzemnice olejné.

Příprava injekčního přípravku se provádí za sterilních podmínek obvyklým způsobem, např. 35 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, 40 zpracováním směsi nebo granulí do tablet nebo potahovaných tablet přídavkem dalších neutrálních látek.

Vhodné nosiče jsou obzvláště plnidla jako cukry, např. laktóza, sacharóza, mannitol nebo sorbitol, celulosové preparáty a/nebo fosforečnany vápníku, s výhodou fosforečnan vápenatý nebo 45 hydrogen fosforečnan vápenatý, dále pojiva jako škroby, s výhodou kukuřičný, pšeničný, rýžový nebo bramborový škrob, methylcelulóza, hydroxypropylmethylcelulóza, sodná sůl karboxymethylcelulózy a/nebo polyvinylpyrrolidin, a/nebo pokud požadováno desintegrátory jako výše zmíněné škroby a dále karboxymethylový škrob, zesítěný 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 50 vápenatý, polyethylen glykol nebo jeho deriváty.

Jádra potahovaných tablet mohou být potažena vhodnými potahy, které mohou být odolné vůči 55 žaludeční šťávě, přičemž používané potahy jsou mezi jinými koncentrované roztoky cukrů, které mohou obsahovat arabskou gumu, talek, polyvinylpyrrolidin, polyethylenglykol a/nebo oxid titaničitý, dále potahovací roztoky ve vhodných organických rozpouštědlech nebo směsích

rozpouštědel, či pro přípravu potahů odolných vůči žaludeční šťávě roztoky vhodných celulóзовých preparátů jako acetylcelulózaftalát nebo hydroxypropylmethylcelulózaftalát. Barviva nebo pigmenty jsou přimíchávány do tablet nebo potahovaných tablet, např. pro identifikaci nebo charakterizaci různých dávek účinné složky.

5

Farmaceutické přípravky, které mohou být užívány orálně, jsou také tvrdé tobolky ze želatiny nebo měkké uzavřené tobolky ze želatiny a změkčovadla jako glycerol nebo sorbitol. Tvrdé tobolky 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 mazací tuk, parafinový olej nebo kapalný polyethylenglykol či estery mastných kyselin a ethylen nebo propylenglykolu, 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.

20

Farmaceutické přípravky, které mohou být používány rektálně, jsou, např. čípky, které obsahují kombinaci aktivní látky se základem. Vhodné základy jsou, např. přírodní nebo syntetické triglyceridy, parafinové uhlovodíky, polyethylen glykoly nebo vyšší alkoholy.

25

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 karboxymethylcelulózy, sorbitol a/nebo dextran, a stabilizátory tam kde je to vhodné. Aktivní látka může být také přítomna ve formě lyofilizátu společně s pomocnou látkou, kde je to vhodné a může být rozpuštěna před parenterální aplikací přidáním vhodných rozpouštědel. Roztoky, které jsou použity pro parenterální aplikaci, mohou být použity, např. i pro infuzní roztoky. Preferovaná konzervovadla jsou s výhodou antioxidanty jako kyselina askorbová, nebo mikrobicidy kyselina sorbová či benzoová.

30

Tinktury a roztoky obvykle obsahují vodně-ethanolicou 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 ethanolem, a pokud je to nutné, i ostatní pomocné látky a aditiva.

35

Řešení se také vztahuje na postupy nebo metody pro léčení nemocí zmíněných výše. Látky mohou být podávány zejména 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.

45

Objasnění výkresů

5 Obr. 1 zobrazuje životaschopnost buněk G361 ošetřených sloučeninami 5, 7 a 10, a inkubovaných ve tmě.

Obr. 2 ukazuje produkci reaktivních forem kyslíku v buněčné linii G361 ošetřené sloučeninou 7 při 0,052  $\mu\text{M}$  a ozářené 50  $\text{J}/\text{cm}^2$  (414 nm).

10 Obr. 3 ukazuje změny mitochondriálního membránového potenciálu v buněčné linii G361 ošetřené sloučeninou 7 při 0,052  $\mu\text{M}$  a ozářené 50  $\text{J}/\text{cm}^2$  (414 nm).

15 Obr. 4 ukazuje detekci poškození DNA kometovým testem v buňkách G361 vizualizovaných pomocí SYBR Green. A - neošetřené kontrolní buňky; B - buňky ošetřené sloučeninou 7 při 0,052  $\mu\text{M}$  a ozářené 50  $\text{J}/\text{cm}^2$  (414 nm).

Obr. 5 ukazuje nárůst fosforylace histonu H2A.X na Ser-139 v buňkách G361 ošetřených látkou 7 po ozáření světlem (414 nm).

20 Obr. 6 ilustruje antibakteriální účinek sloučeniny 7 v kombinaci s ozářením modrým světlem (414 nm).

Příklady uskutečnění vynálezu

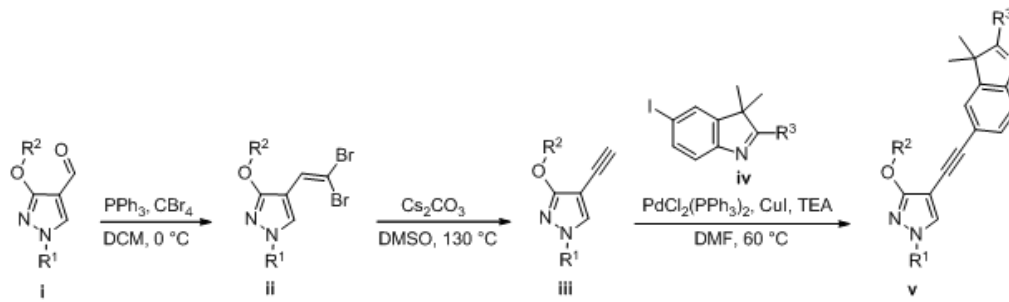
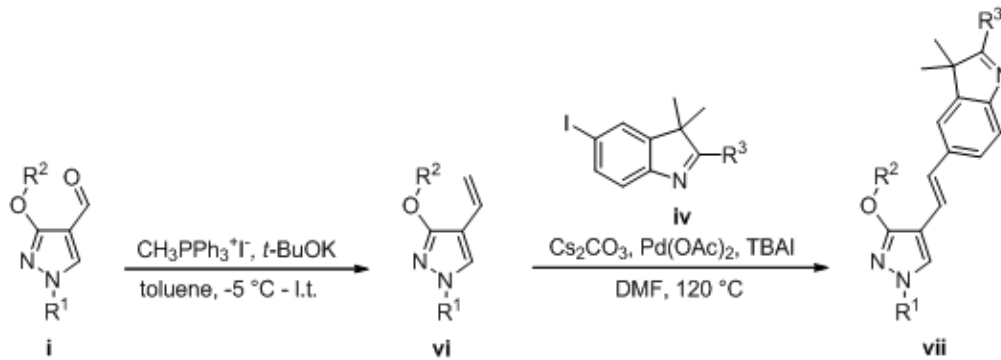
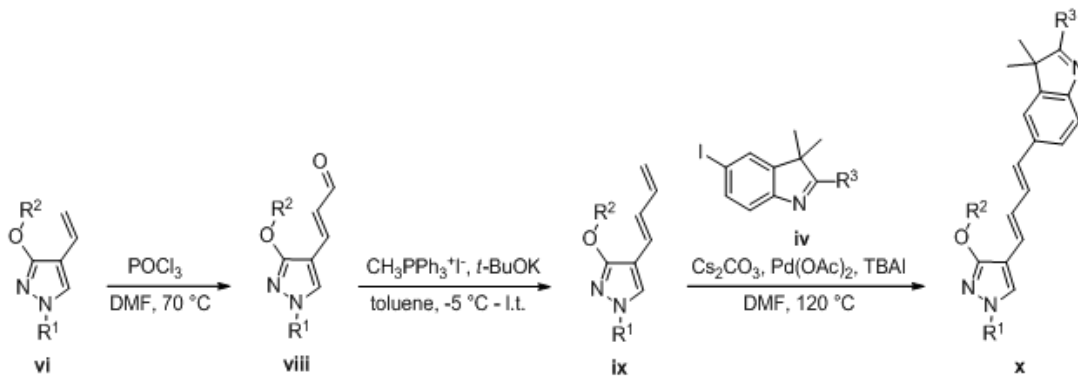
25

Všechny chemikálie a rozpouštědla byly zakoupeny od komerčních dodavatelů a použity bez dalšího čištění, pokud není uvedeno jinak. Před použitím byl *N,N'*-dimethylformamid vysušen aktivovaným molekulovým sítem (4 Å), zatímco toluen a dichlormethan byly destilovány nad bezvodým síranem sodným. Všechny reakce byly prováděny v baňkách sušených v sušárně pod argonovou atmosférou za magnetického míchání. Pro kontrolu průběhu reakcí pomocí tenkovrstvé chromatografie (TLC) byly použity desky Macherey-Nagel™ ALUGRAM® Xtra SIL G/UV254. Výsledky TLC byly vizualizovány pomocí UV lampy (vlnové délky 254 a 365 nm) nebo jodovými parami. Připravené látky byly separovány za pomoci sloupcové kapalinové chromatografie ve skleněných kolonách (stacionární fáze-silikagel, vysoce čistý stupeň 9385, velikost pórů 60 Å, velikost částic –230 až 400 mesh, dodavatel Sigma-Aldrich).  $^1\text{H}$  a  $^{13}\text{C}$  NMR spektra byla zaznamenána při teplotě místnosti na spektrometru Bruker Avance III 700 (700 MHz pro  $^1\text{H}$  a 176 MHz pro  $^{13}\text{C}$ ) v  $\text{CDCl}_3$  jako rozpouštědle. FT-IC spektra byla změřena na spektrometru Bruker Vertex 70v s integrovaným příslušenstvím Platinum ATR. Teploty tání krystalických látek byly stanoveny pomocí přístroje Buchi M-565 (teplotní gradient - 2  $^\circ\text{C}/\text{min}$ ) a jsou nekorigované. Spektra hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením (HRMS) byla získána na spektrometru Bruker MicrOTOF-Q III v  $\text{ESI}^+$  módu. UV-Vis absorpční a fluorescenční spektra byla zaznamenána na čtečce mikrodestiček Infinity M200 Pro Tecan.

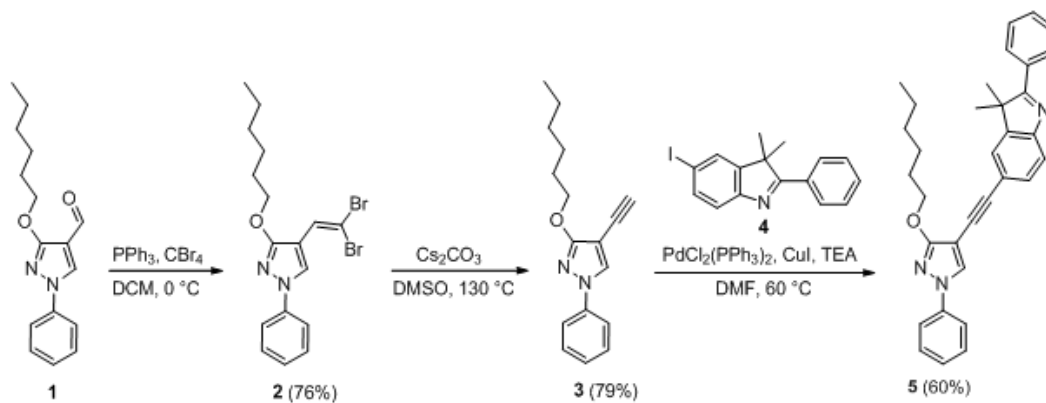
45

Uvedené sloučeniny vzorce I lze připravit podle obecných schémat 1-3 uvedených níže:

Schéma 1 Syntéza sloučenin vzorce I, když L je  $-\text{C}\equiv\text{C}-$ :

Schéma 2 Syntéza sloučenin vzorce I, když L je  $-\text{CH}=\text{CH}-$ :Schéma 3 Syntéza sloučenin vzorce I, když L je  $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}-$ :

Syntetické schéma cílové sloučeniny 5-{{3-(hexyloxy)-1-fenyl-1H-pyrazol-4-yl}ethynyl}-3,3-dimethyl-2-fenyl-3H-indol 5 (příklady 1 až 3):



15



## Příklad 1 4-(2,2-Dibromethenyl)-3-(hexyloxy)-1-fenyl-1H-pyrazol (meziprodukt 2)

Tetrabrommethan (6633 mg, 20 mmol) byl rozpuštěn v suchém dichlormethanu (25 ml) při -10 °C a následně byl po kapkách přidán roztok trifenyfosfinu (10492 mg, 40 mmol) v suchém dichlormethanu (25 ml). Reakční směs byla míchána při -10 °C po dobu 45 až 60 minut, dokud nebyl získán oranžový roztok. Potom aldehyd 1 (přípraven způsobem popsáným v Kazlauskas *et al.* J. Phys. Chem. C. 118 (2014) 25261–25271) byl rozpuštěn v suchém dichlormethanu (25 ml) a přidán po kapkách ke směsi. Po zahřátí na teplotu místnosti reakce probíhala 2 hodiny a průběh byl monitorován pomocí TLC. Po dokončení byla reakce naředěna vodou (50 ml) a organická vrstva byla oddělena, sušena nad bezvodým Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, zfiltrována a poté odpařena za sníženého tlaku. Odpařená směs se přečistila pomocí sloupcové chromatografie na silikagelu (*n*-hexan/ethylacetát 15:1 v/v). Produkt 2 byl získán ve formě bezbarvé kapaliny (3264 mg, 76 %).  $R_f = 0,54$  (*n*-hexan/ethylacetát 15:1 v/v). <sup>1</sup>H NMR (700 MHz, CDCl<sub>3</sub>, ppm): δ 8,44 (s, 1H), 7,62 (d,  $J = 7,8$  Hz, 2H), 7,42 (t,  $J = 7,9$  Hz, 2H), 7,29 (s, 1H), 7,24 (t,  $J = 7,4$  Hz, 1H), 4,31 (t,  $J = 6,7$  Hz, 2H), 1,81 (p,  $J = 6,8$  Hz, 2H), 1,46 (p,  $J = 7,2$  Hz, 2H), 1,39 – 1,32 (m, 4H), 0,92 (t,  $J = 6,9$  Hz, 3H). <sup>13</sup>C NMR (176 MHz, CDCl<sub>3</sub>, ppm): δ 162,1, 139,8, 129,4, 125,94, 125,82, 125,50, 118,1, 105,7, 85,4, 69,4, 31,6, 29,1, 25,6, 22,6, 14,1. <sup>15</sup>N NMR (71 MHz, CDCl<sub>3</sub>, ppm): δ -123,1 (N-2), -185,7 (N-1). IČ ( $\nu_{\max}$ , cm<sup>-1</sup>): 3070, 3050, 3026, 2952, 2928, 2869, 2857, 1599, 1562, 1500, 1465, 1415, 1374, 1286, 1222, 1177, 1057, 1000, 942, 882, 804, 751, 685, 670. HRMS (ESI-TOF): pro C<sub>17</sub>H<sub>20</sub>Br<sub>2</sub>N<sub>2</sub>NaO ([M+Na]<sup>+</sup>): vypočtena hodnota 448,9835; nalezena 448,9838.

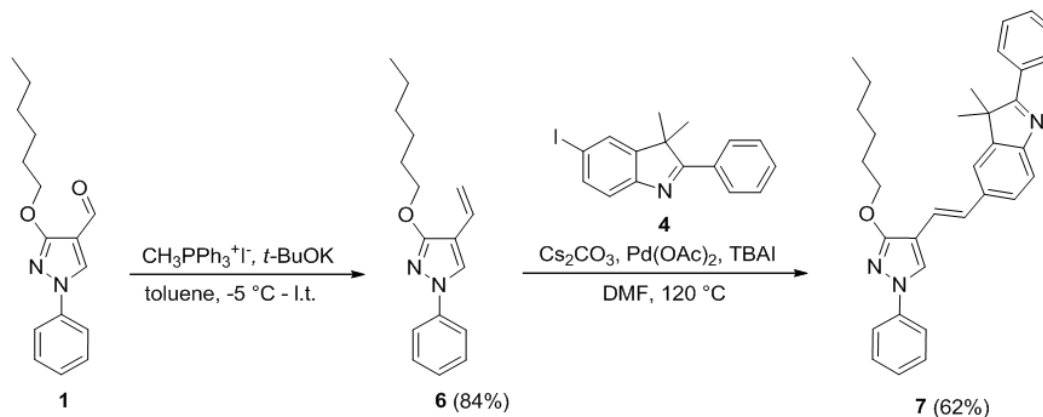
## Příklad 2 4-Ethynyl-3-(hexyloxy)-1-fenyl-1H-pyrazol (meziprodukt 3)

4-(2,2-Dibromethenyl)-3-(hexyloxy)-1-fenyl-1H-pyrazol 2 (2141 mg, 5 mmol) byl rozpuštěn v dimethylsulfoxidu (10 ml) a uhličitan cesný (4887 mg, 15 mmol) byl přidán do roztoku. Reakční směs byla míchána při 130 °C po dobu 12 hodin. Po dokončení byla reakční směs nalita do nasyceného roztoku chloridu sodného (50 ml) a extrahována pomocí EtOAc (4× 25 ml). Spojené organické vrstvy byly sušeny nad bezvodým Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, zfiltrovány a odpařeny za sníženého tlaku. Odparek se přečistil pomocí sloupcové chromatografie na silikagelu (*n*-hexan/ethylacetát 15:1 v/v). Produkt 3 byl získán v podobě oranžové kapaliny (1057 mg, 79 %).  $R_f = 0,40$  (*n*-hexan/ethylacetát 15:1 v/v). <sup>1</sup>H NMR (700 MHz, CDCl<sub>3</sub>, ppm): δ 7,89 (s, 1H), 7,57 (d,  $J = 7,9$  Hz, 2H), 7,41 (t,  $J = 8,0$  Hz, 2H), 7,23 (t,  $J = 7,4$  Hz, 1H), 4,35 (t,  $J = 6,8$  Hz, 2H), 3,19 (s, 1H), 1,85 (p,  $J = 6,9$  Hz, 2H), 1,48 (p,  $J = 7,2$  Hz, 2H), 1,39 – 1,32 (m, 4H), 0,92 (t,  $J = 7,0$  Hz, 3H). <sup>13</sup>C NMR (176 MHz, CDCl<sub>3</sub>, ppm): δ 164,6, 139,6, 130,6, 129,5, 126,0, 118,2, 91,2, 80,7, 73,7, 69,9, 31,7, 29,1, 25,7, 22,7, 14,2. <sup>15</sup>N NMR (71 MHz, CDCl<sub>3</sub>, ppm): δ -120,6 (N-2), -187,8 (N-1). IČ ( $\nu_{\max}$ , cm<sup>-1</sup>): 3289, 3110, 3071, 3051, 2953, 2930, 2870, 2858, 2117, 1599, 1565, 1503, 1466, 1409, 1363, 1216, 1198, 1054, 998, 941, 901, 810, 753, 688, 677. HRMS (ESI-TOF): pro C<sub>17</sub>H<sub>20</sub>N<sub>2</sub>NaO ([M+Na]<sup>+</sup>): vypočtena hodnota 291,1468; nalezena 291,1469.

## Příklad 3 5-{{3-(Hexyloxy)-1-fenyl-1H-pyrazol-4-yl}ethynyl}-3,3-dimethyl-2-fenyl-3H-indol (cílová sloučenina 5)

Pod argonovou atmosférou byly k roztoku 4-ethynyl-3-(hexyloxy)-1-fenyl-1H-pyrazolu 3 (313 mg, 1,16 mmol) a 5-jod-3,3-dimethyl-2-fenyl-3H-indol 4 (přípraven způsobem popsáným v M. Tomasulo *et al.* J. Org. Chem. 73 (2008) 118-126) (405 mg, 1,16 mmol), v suchém dimethylformamidu (5 ml) přidány jodid měďný (I) (442 mg, 2,32 mmol), triethylamin (0,3 ml, 2,32 mmol) a tetrakis (trifenyfosfín) palladium (0) (81,4 mg, 0,116 mmol). Reakční směs byla míchána při 60 °C po dobu 24 hodin. Po dokončení byla reakční směs ochlazena na teplotu místnosti, zředěna destilovanou vodou (50 ml) a extrahována pomocí EtOAc (4× 25 ml). Spojené organické extrakty byly sušeny nad bezvodým Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, zfiltrovány a odpařeny za sníženého tlaku. Odparek byl vyčištěn pomocí sloupcové chromatografie na silikagelu (*n*-hexan / ethylacetát 9:1 v/v), čímž byl získán produkt 5 ve formě hnědo-oranžové lepkavé pevné látky. (339 mg, 60 %).  $R_f = 0,38$  (*n*-hexan/ethylacetát 6:1 v/v). <sup>1</sup>H NMR (700 MHz, CDCl<sub>3</sub>, ppm): δ 8,16 (dd,  $J = 2,8, 6,6$  Hz, 2H), 7,95 (s, 1H), 7,66 (d,  $J = 7,9$  Hz, 1H), 7,62 (d,  $J = 8,3$  Hz, 2H), 7,54 (d,  $J = 8,0$  Hz, 1H), 7,51 (d,  $J = 6,3$  Hz, 2H), 7,49 (d,  $J = 2,5$  Hz, 2H), 7,43 (t,  $J = 7,8$  Hz, 2H), 7,23 (t,  $J = 7,4$  Hz, 1H),

- 4,40 (t,  $J = 6,8$  Hz, 2H), 1,90 (p,  $J = 6,9$  Hz, 2H), 1,61 (s, 6H), 1,53 (p,  $J = 7,3$  Hz, 2H), 1,43 – 1,34 (m, 4H), 0,93 (t,  $J = 6,9$  Hz, 3H).  $^{13}\text{C}$  NMR (176 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , ppm):  $\delta$  184,1, 164,2, 153,0, 147,8, 139,7, 133,2, 131,6, 130,9, 129,67, 129,52, 128,75, 128,46, 125,9, 124,2, 120,97, 120,86, 118,0, 93,1, 92,6, 79,4, 69,9, 53,7, 31,7, 29,2, 25,7, 24,8, 22,7, 14,2.  $^{15}\text{N}$  NMR (71 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , ppm):  $\delta$  -70.7 (indol N-1), -120.5 (pyrazol N-2), -187.8 (pyrazol N-1). IČ ( $\nu_{\text{max}}$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3110, 3053, 2954, 2928, 2869, 2857, 2215, 1599, 1570, 1511, 1460, 1410, 1363, 1296, 1214, 1141, 1054, 990, 940, 888, 830, 753, 690, 676. HRMS (ESI-TOF): pro  $\text{C}_{33}\text{H}_{34}\text{N}_3\text{O}$  ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ ): vypočtena hodnota 488,2696; nalezena 488,2700.
- 10 Syntetické schéma cílové sloučeniny 5- $\{(E)\text{-}2\text{-}[3\text{-}(\text{hexyloxy})\text{-}1\text{-feny}\text{-}1H\text{-pyrazol-}4\text{-yl]ethenyl\}$ -3,3-dimethyl-2-fenyl-3H-indol 7 (Příklady 4 a 5):



- 15 Příklad 4 4-Ethenyl-3-(hexyloxy)-1-fenyl-1H-pyrazol (meziprodukt 6)

K suspenzi methyltrifenylfosfoniumjodidu (1,83 g, 4,5 mmol) v suchém toluenu (60 ml) byl v inertní atmosféře přidán *tert*-butoxid draselný (1,01 g, 9 mmol) v jedné dávce. Reakční směs byla míchána při teplotě místnosti po dobu 30 minut a následně refluxována po dobu dalších 30 minut.

20 Tvorba ylidu může být vizuálně pozorována jeho přetrvávající žlutou barvou. Po zahřátí směsi na teplotu varu pod zpětným chladičem se reakční směs nechala zchladit na teplotu místnosti a umístila se do ledové lázně, načež se přidal po kapkách aldehyd 1 (připravený podle popisu Kazlauskas *et al.* (J. Phys. Chem. C. 118 (2014) 25261–25271) (817 mg, 3 mmol) rozpuštěný v suchém toluenu (30 ml). Reakce byla prováděna při teplotě místnosti po dobu 3 hodin a průběh byl

25 monitorován pomocí TLC. Reakce byla ukončena přidáním nasyceného roztoku chloridu amonného (90 ml) a organická vrstva byla oddělena, sušena nad bezvodým  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , zfiltrována a odpařena za sníženého tlaku. Odpařená směs byla vyčištěna pomocí sloupcové chromatografie na silikagelu (*n*-hexan/ethylacetát 10:1 v/v), čímž byl získán produkt 6 ve formě žluté kapaliny (681 mg, 84%).  $R_f = 0,74$  (*n*-hexan/ethylacetát 6:1 v/v).  $^1\text{H}$  NMR (700 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , ppm):  $\delta$  7,73 (s, 1H), 7,58 (d,  $J = 8,0$  Hz, 2H), 7,40 (t,  $J = 7,9$  Hz, 2H), 7,19 (t,  $J = 7,3$  Hz, 1H), 6,54 (dd,  $J = 11,3, 17,7$  Hz, 1H), 5,73 (dd,  $J = 1,6, 17,7$  Hz, 1H), 5,16 (dd,  $J = 1,6, 11,3$  Hz, 1H), 4,35 (t,  $J = 6,6$  Hz, 2H), 1,84 (p,  $J = 6,7$  Hz, 2H), 1,51 (p,  $J = 7,3$  Hz, 2H), 1,41 – 1,35 (m, 4H), 0,93 (t,  $J = 7,0$  Hz, 3H).  $^{13}\text{C}$  NMR (176 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , ppm):  $\delta$  162,3, 140,1, 129,5, 125,29, 125,22, 125,17, 117,7, 113,2, 108,7, 69,2, 31,7, 29,3, 25,9, 22,7, 14,2.  $^{15}\text{N}$  NMR (71 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , ppm):  $\delta$  -119.9 (N-2),

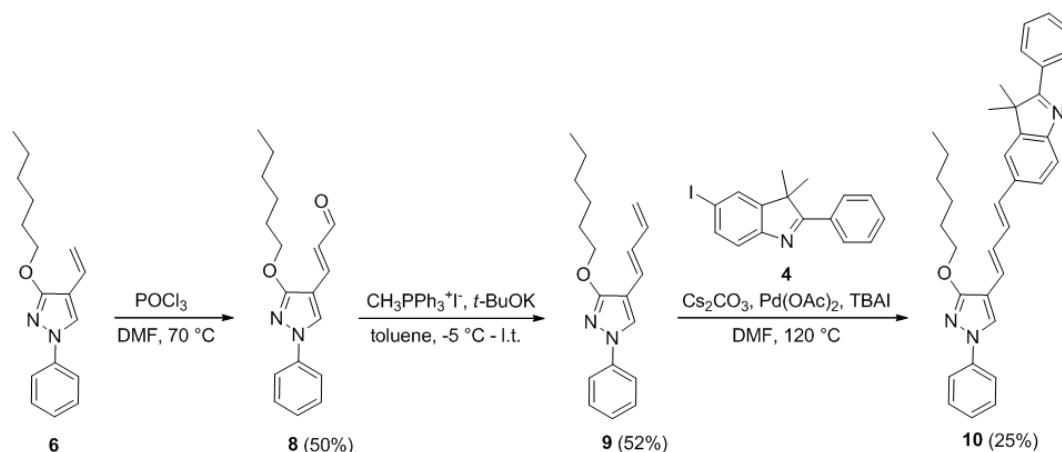
35 -189.7 (N-1). IČ ( $\nu_{\text{max}}$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3100, 3071, 3051, 3015, 2954, 2930, 2870, 2858, 1638, 1600, 1565, 1501, 1466, 1427, 1373, 1245, 1205, 1181, 1057, 1032, 990, 940, 897, 807, 751, 688, 659. HRMS (ESI-TOF): pro  $\text{C}_{17}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{NaO}$  ( $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ): vypočtena hodnota 293,1624; nalezena 293,1625.

- 40 Příklad 5 5- $\{(E)\text{-}2\text{-}[3\text{-}(\text{Hexyloxy})\text{-}1\text{-feny}\text{-}1H\text{-pyrazol-}4\text{-yl]ethenyl\}$ -3,3-dimethyl-2-fenyl-3H-indol (cílová sloučenina 7)

4-Ethenyl-3-(hexyloxy)-1-fenyl-1H-pyrazol 6 (270 mg, 1 mmol), 5-jod-3,3-dimethyl-2-fenyl-3H-indol 4 (připravený podle popisu M. Tomasulo *et al.* J. Org. Chem. 73 (2008) 118-126) (413 mg, 1.19 mmol), uhličitan cesný (489 mg, 1,5 mmol) a tetrabutylamoniumjodid (554 mg, 1,5 mmol)

byly rozpuštěny v suchém dimethylformamidu (6 ml) pod argonovou atmosférou. Následně byl do roztoku přidán octan palladnatý (II) (45 mg, 0,2 mmol) v jedné dávce. Reakční směs byla míchána při 120 °C po dobu 48 hodin. Po dokončení byla reakční směs ochlazena na teplotu místnosti, zředěna destilovanou vodou (50 ml) a extrahována EtOAc (4× 25 ml). Spojené organické fáze byly sušeny nad bezvodým Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, zfiltrovány a odpařeny za sníženého tlaku. Odparek byl přečištěn pomocí sloupcové chromatografie na silikagelu (*n*-hexan/ethylacetát 12:1 v/v). Produkt 7 byl získán v podobě jasně žluté sklovité pevné látky (302 mg, 62% výtěžek). *R<sub>f</sub>* = 0,33 (*n*-hexan/ethylacetát 6:1 v/v). <sup>1</sup>H NMR (700 MHz, CDCl<sub>3</sub>, ppm): δ 8,20 (dd, *J* = 1,5, 8,0 Hz, 2H), 7,85 (s, 1H), 7,71 (d, *J* = 8,4 Hz, 1H), 7,64 (d, *J* = 7,7 Hz, 2H), 7,53 – 7,47 (m, 5H), 7,42 (t, *J* = 7,9 Hz, 2H), 7,28 (d, *J* = 16,3 Hz, 1H), 7,20 (t, *J* = 7,4 Hz, 1H), 7,01 (d, *J* = 16,3 Hz, 1H), 4,46 (t, *J* = 6,7 Hz, 2H), 1,95 (p, *J* = 6,7 Hz, 2H), 1,65 (s, 6H), 1,60 (p, *J* = 7,4 Hz, 2H), 1,49 – 1,40 (m, 4H), 0,99 (t, *J* = 7,1 Hz, 3H). <sup>13</sup>C NMR (176 MHz, CDCl<sub>3</sub>, ppm): δ 182,8, 162,2, 152,5, 148,3, 139,9, 136,3, 133,4, 130,5, 129,3, 128,61, 128,26, 127,85, 126,0, 125,11, 124,87, 121,0, 118,2, 117,5, 116,9, 108,6, 69,2, 53,4, 31,6, 29,2, 25,8, 24,9, 22,7, 14,1. <sup>15</sup>N NMR (71 MHz, CDCl<sub>3</sub>, ppm): δ -70,0 (indol N-1), -119,3 (pyrazol N-2), -188,9 (pyrazol N-1). IČ (*v*<sub>max</sub>, cm<sup>-1</sup>): 3105, 3050, 3005, 2955, 2928, 2858, 1677, 1638, 1598, 1565, 1501, 1463, 1406, 1376, 1262, 1199, 1055, 989, 963, 940, 890, 821, 752, 690, 676. HRMS (ESI-TOF): pro C<sub>33</sub>H<sub>36</sub>N<sub>3</sub>O ([M+H]<sup>+</sup>): vypočtena hodnota 490,2853; nalezena 490,2854.

Syntetické schéma cílové sloučeniny 5-*[(1E,3E)-4-[3-(hexyloxy)-1-fenyl-1H-pyrazol-4-yl]buta-1,3-dien-1-yl]-3,3-dimethyl-2-fenyl-3H-indol* 10 (příklady 6 až 8):



Příklad 6 (2*E*)-3-[3-(Hexyloxy)-1-fenyl-1*H*-pyrazol-4-yl]prop-2-enal (meziprodukt 8)

Oxychlorid fosforečný (1,86 ml, 20 mmol) byl přidán po kapkách do suchého DMF (1,55 ml, 20 mmol) při -10 °C a výsledná směs byla míchána při stejné teplotě po dobu 10 až 20 minut, dokud se nevytvořil komplex Vilsmeier-Haack. Následně byl do komplexu Vilsmeier-Haack přidán roztok 4-ethenyl-3-(hexyloxy)-1-fenyl-1*H*-pyrazolu 6 (1351 mg, 5 mmol) v suchém DMF (15 ml) a teplota byla pomalu zvýšena na 70 °C a udržována po dobu 12 hodin. Reakční směs byla ochlazena v ledové lázni a opatrně byla přidána ledová voda (100 ml). Následně byla směs alkalizována 10% roztokem NaHCO<sub>3</sub>. Sraženina byla odfiltrována. Filtrát byl extrahován pomocí ethylacetátu (4× 50 ml). Ethylacetátové vrstvy byly promyty nasyceným roztokem NaCl, sušeny nad bezvodým Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, zfiltrovány a odpařeny za sníženého tlaku. Odpařená směs byla vyčištěna pomocí sloupcové chromatografie na silikagelu (*n*-hexan/ethylacetát 4:1 v/v), čímž byl získán produkt 8 ve formě oranžové krystalické pevné látky (746 mg, 50 %). T.t. 69,2 – 70,2 °C. *R<sub>f</sub>* = 0,21 (*n*-hexan/ethylacetát 6:1 v/v), <sup>1</sup>H NMR (700 MHz, CDCl<sub>3</sub>, ppm): δ 9,57 (d, *J* = 8,0 Hz, 1H), 7,95 (s, 1H), 7,63 – 7,60 (m, 2H), 7,46 – 7,42 (m, 2H), 7,33 (d, *J* = 15,7 Hz, 1H), 7,28 – 7,25 (m, 1H), 6,72 (dd, *J* = 8,0, 15,7 Hz, 1H), 4,37 (t, *J* = 6,7 Hz, 2H), 1,84 (p, *J* = 6,7 Hz, 2H), 1,48 (p, *J* = 7,4 Hz, 2H), 1,39 – 1,32 (m, 4H), 0,91 (t, *J* = 7,1 Hz, 3H). <sup>13</sup>C NMR (176 MHz, CDCl<sub>3</sub>, ppm): δ 194,0, 162,8, 141,9, 139,3, 129,5, 128,1, 127,2, 126,4, 118,2, 106,5, 69,7, 31,5, 29,0, 25,7, 22,6, 14,0. <sup>15</sup>N NMR (71 MHz, CDCl<sub>3</sub>, ppm): δ -118,0 (N-2), -182,5 (N-1). IČ (*v*<sub>max</sub>, cm<sup>-1</sup>): 3129, 3103, 3067,

3035, 2989, 2954, 2929, 2861, 2815, 2735, 1668, 1616, 1598, 1558, 1502, 1473, 1425, 1375, 1296, 1237, 1173, 1125, 1057, 1011, 979, 962, 937, 911, 836, 753, 713, 687, 675. HRMS (ESI-TOF): pro  $C_{18}H_{22}N_2NaO_2$  ( $[M+Na]^+$ ): vypočtena hodnota 321,1573; nalezena 321,1573.

5 Příklad 7 4-[(1*E*)-Buta-1,3-dien-1-yl]-3-(hexyloxy)-1-fenyl-1*H*-pyrazol (meziprodukt 9)

K suspenzi methyltrifenylfosfoniumjodidu (1,83 g, 4,5 mmol) v suchém toluenu (60 ml) byl v inertní atmosféře přidán *tert*-butoxid draselný (1,01 g, 9 mmol) v jedné dávce. Reakční směs byla míchána při teplotě místnosti po dobu 30 minut a následně refluxována po dobu dalších 30 minut.  
 10 Tvorba ylidu může být vizuálně ověřena pomocí přetrvávající žluté barvy. Po zahřátí směsi na teplotu varu pod zpětným chladičem se reakční směs nechala zchladit na teplotu místnosti a umístila se do ledové lázně, načež byl přidán po kapkách aldehyd 8 (895 mg, 3 mmol) rozpuštěný v suchém toluenu (30 ml). Reakce byla prováděna při teplotě místnosti po dobu 2 hodin a průběh byl monitorován pomocí TLC. Reakce byla ukončena přidáním nasyceného roztoku chloridu amonného (90 ml) a organická vrstva byla oddělena, sušena nad bezvodým  $Na_2SO_4$ , zfiltrována a odpařena za sníženého tlaku. Odparek byl přečištěn pomocí sloupcové chromatografie na silikagelu (*n*-hexan / ethylacetát 9:1 v/v), čímž byl získán produkt 9 ve formě nažloutlé kapaliny (462 mg, 52 %).  $R_f = 0,65$  (*n*-hexan/ethylacetát 9:1 v/v).  $^1H$  NMR (700 MHz,  $CDCl_3$ , ppm):  $\delta$  7,70 (s, 1H), 7,57 – 7,54 (m, 2H), 7,39 – 7,36 (m, 2H), 7,18 – 7,14 (m, 1H), 6,79 (dd,  $J = 15,7, 10,6$  Hz, 1H), 6,47 – 6,40 (m, 1H), 6,37 (d,  $J = 15,7$  Hz, 1H), 5,27 – 5,19 (m, 1H), 5,08 – 5,03 (m, 1H), 4,34 (t,  $J = 6,6$  Hz, 2H), 1,84 (p,  $J = 6,7$  Hz, 2H), 1,50 (p,  $J = 7,4$  Hz, 2H), 1,40 – 1,32 (m, 4H), 0,92 (t,  $J = 7,1$  Hz, 3H).  $^{13}C$  NMR (176 MHz,  $CDCl_3$ , ppm):  $\delta$  162,1, 139,9, 137,9, 129,3, 129,0, 125,1, 124,9, 121,3, 117,5, 115,5, 108,2, 69,1, 31,6, 29,2, 25,8, 22,6, 14,1.  $^{15}N$  NMR (71 MHz,  $CDCl_3$ , ppm):  $\delta$  -119,7 (N-2), -189,0 (N-1).  $IC$  ( $\nu_{max}$ ,  $cm^{-1}$ ): 3121, 3080, 3046, 2999, 2947, 2933, 2870, 2859, 1632, 1597, 1553, 1501, 1464, 1400, 1362, 1266, 1246, 1199, 1154, 1054, 1006, 954, 905, 890, 807, 756, 692, 676. HRMS (ESI-TOF): pro  $C_{19}H_{24}N_2NaO$  ( $[M+Na]^+$ ): vypočtena hodnota 319,1781; nalezena 319,1781.

30 Příklad 8 5-[(1*E*,3*E*)-4-[3-(Hexyloxy)-1-fenyl-1*H*-pyrazol-4-yl]buta-1,3-dien-1-yl]-3,3-dimethyl-2-fenyl-3*H*-indol (cílová sloučenina 10)

4-[(1*E*)-buta-1,3-dien-1-yl]-3-(hexyloxy)-1-fenyl-1*H*-pyrazol 9 (362 mg, 1,22 mmol), 5-jod-3,3-dimethyl-2-fenyl-3*H*-indol 4 (453 mg, 1,3 mmol), uhlíčitán cesný (596 mg, 1,83 mmol) a tetrabutylamoniumjodid (676 mg, 1,83 mmol) byly rozpuštěny v suchém dimethylformamidu (5 ml) pod argonovou atmosférou. Následně byl přidán octan palladnatý (II) (55 mg, 0,24 mmol). Reakce byla míchána při 120 °C po dobu 48 hodin. Po dokončení byla reakce ochlazena na teplotu místnosti, poté byla nalita do nasyceného roztoku NaCl (50 ml) a extrahována pomocí EtOAc (4 x 25 ml). Spojené organické extrakty byly sušeny nad bezvodým  $Na_2SO_4$ , zfiltrovány a odpařeny za sníženého tlaku. Odpařená směs byla přečištěna pomocí sloupcové chromatografie na silikagelu (*n*-hexan/ethylacetát 6:1 v/v). Produkt 10 byl získán ve formě žluté amorfni pevné látky (156 mg, 25 %).  $R_f = 0,33$  (*n*-hexan/ethylacetát 6:1 v/v).  $^1H$  NMR (700 MHz,  $CDCl_3$ , ppm):  $\delta$  8,14 (dd,  $J = 1,7, 7,8$  Hz, 2H), 7,71 (s, 1H), 7,63 (d,  $J = 7,9$  Hz, 1H), 7,56 (d,  $J = 7,6$  Hz, 2H), 7,47 – 7,42 (m, 3H), 7,41 – 7,38 (m, 2H), 7,36 (t,  $J = 7,9$  Hz, 2H), 7,14 (t,  $J = 7,4$  Hz, 1H), 6,98 (dd,  $J = 10,8, 15,1$  Hz, 1H), 6,92 (dd,  $J = 10,8, 15,1$  Hz, 1H), 6,64 (d,  $J = 15,1$  Hz, 1H), 6,49 (d,  $J = 15,1$  Hz, 1H), 4,37 (t,  $J = 6,6$  Hz, 2H), 1,87 (p,  $J = 6,7$  Hz, 2H), 1,59 (s, 6H), 1,53 (p,  $J = 7,4$  Hz, 2H), 1,43 – 1,35 (m, 4H), 0,94 (t,  $J = 7,1$  Hz, 3H).  $^{13}C$  NMR (176 MHz,  $CDCl_3$ , ppm):  $\delta$  182,9, 162,1, 152,6, 148,2, 139,8, 135,8, 133,3, 130,88, 130,45, 129,82, 129,28, 128,64, 128,57, 128,22, 126,4, 125,06, 124,70, 121,3, 121,0, 118,3, 117,4, 108,7, 69,1, 53,3, 31,6, 29,2, 25,7, 24,8, 22,6, 14,1.  $^{15}N$  NMR (71 MHz,  $CDCl_3$ , ppm):  $\delta_N$  -70,4 (indol N-1), -119,8 (pyrazol N-2), -188,7 (pyrazol N-1).  $IC$  ( $\nu_{max}$ ,  $cm^{-1}$ ): 3068, 3047, 3002, 2957, 2927, 2870, 2856, 1624, 1596, 1583, 1553, 1499, 1462, 1405, 1377, 1245, 1211, 1189, 1054, 993, 938, 883, 844, 796, 750, 688, 677. HRMS (ESI-TOF): pro  $C_{35}H_{38}N_3O$  ( $[M+H]^+$ ): vypočtena hodnota 516,3009; nalezena 516,3008.

Tabulka 1: Sloučeniny připravené způsobem podle příkladů 1 až 8

Číslo	Substituent				HRMS analýza	
	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	L	Vypočtená hodnota	Nalezena hodnota
5	fenyl	hexyl	fenyl	–C≡C–	488,2696	488,2700
7	fenyl	hexyl	fenyl	–CH=CH–	490,2853	490,2854
10	fenyl	hexyl	fenyl	–CH=CH– CH=CH–	516,3009	516,3008
11	fenyl	pentyl	fenyl	–CH=CH–	476,2696	476,2695
12	fenyl	butyl	fenyl	–CH=CH–	462,2540	462,2541
13	fenyl	propyl	fenyl	–CH=CH–	448,2383	448,2383
14	fenyl	ethyl	fenyl	–CH=CH–	434,2227	434,2228
15	fenyl	methyl	fenyl	–CH=CH–	420,2070	420,2070
16	fenyl	2-methoxyethyl	fenyl	–CH=CH–	464,2333	464,2334
17	4-methoxyfenyl	hexyl	fenyl	–CH=CH–	520,2959	520,2959
18	4-methoxyfenyl	methyl	fenyl	–CH=CH–	450,2176	450,2176
19	4-methoxyfenyl	2-methoxyethyl	fenyl	–CH=CH–	494,2438	494,2437
20	4-fluorfenyl	hexyl	fenyl	–CH=CH–	508,2759	508,2759
21	4-fluorfenyl	methyl	fenyl	–CH=CH–	438,1976	438,1977
22	4-fluorfenyl	2-methoxyethyl	fenyl	–CH=CH–	482,2238	482,2240
23	4-methylfenyl	hexyl	fenyl	–CH=CH–	504,3009	504,3009
24	4-methylfenyl	methyl	fenyl	–CH=CH–	434,2227	434,2229
25	4-methylfenyl	2-methoxyethyl	fenyl	–CH=CH–	478,2489	478,2489
26	fenyl	hexyl	4-fluorfenyl	–CH=CH–	508,2759	508,2757
27	fenyl	methyl	4-fluorfenyl	–CH=CH–	438,1976	438,1977
28	fenyl	2-methoxyethyl	4-fluorfenyl	–CH=CH–	482,2238	482,2236
29	fenyl	hexyl	4-chlorfenyl	–CH=CH–	524,2463	524,2463
30	fenyl	methyl	4-chlorfenyl	–CH=CH–	454,1681	454,1681
31	fenyl	2-methoxyethyl	4-chlorfenyl	–CH=CH–	498,1943	498,1943
32	fenyl	hexyl	3,4-dimethoxyfenyl	–CH=CH–	550,3064	550,3064
33	fenyl	methyl	3,4-dimethoxyfenyl	–CH=CH–	480,2282	480,2282
34	fenyl	2-methoxyethyl	3,4-dimethoxyfenyl	–CH=CH–	524,2544	524,2542
35	fenyl	hexyl	4,6-dimethoxyfenyl	–CH=CH–	550,3064	550,3064
36	fenyl	methyl	4,6-dimethoxyfenyl	–CH=CH–	480,2282	480,2282
37	fenyl	2-methoxyethyl	4,6-dimethoxyfenyl	–CH=CH–	524,2544	524,2544

## Příklad 9 Fluorescenční vlastnosti

Fluorescenční vlastnosti finálních sloučenin 5, 7 a 10 byly testovány ve vodě. Excitační vlnová délka  $\lambda_{ex}$  byla nastavena na 360 nm pro látku 5 a na 385 nm pro sloučeniny 7 a 10. Emisní maxima  $\lambda_{em}$  všech tří látek jsou umístěny v rozsahu 475 až 525 nm, což odpovídá modré části spektra viditelného světla. Nahrazení ethynylového můstku v derivátu 5 za ethenyl ve sloučenině 7 mělo za následek bathochromní posun emisních maxim. Na druhou stranu, jak se očekávalo, další dvojná vazba ve sloučenině 10, ve srovnání se sloučeninou 7, způsobila u obou bathochromní posun emisních maxim. Stokesovy posuny všech sloučenin 5, 7 a 10 jsou alespoň 115 nm, pro látku 10 dosahující až 145 nm (tabulka 2).

Tabulka 2: Absorpční a fluorescenční charakteristiky sloučenin 5, 7 a 10 ve vodě.

Sloučenina	$\lambda_{abs}$ , nm	$\lambda_{em}$ , nm	Stokesův posun, nm
<b>5</b>	355	475	120
<b>7</b>	380	495	115
<b>10</b>	380	525	145

15

## Příklad 10 Test buněčné kultury a životaschopnosti buněk

Buněčná linie G361 (lidský kožní melanom) byla kultivována v médiu DMEM doplněném 10% fetálním hovězím sérem, 1% penicilinem/streptomycinem, 1% glutaminem, při 37 °C v 5% CO<sub>2</sub> atmosféře. Životaschopnost buněk byla stanovena pomocí testu MTT (Sigma-Aldrich) v 96-jamkových mikroděstičkách (10<sup>4</sup> na jamku ve 100  $\mu$ l DMEM). Testované látky byly přidány 24 hodin po vysazení a buňky byly poté inkubovány dalších 24 hodin. Buňky byly poté vystaveny ozařování ve 100  $\mu$ l PBS s 5 mM glukózou a inkubovány dalších 24 hodin. Poté bylo přidáno 50  $\mu$ l MTT (rozpuštěného v PBS) a buňky byly inkubovány další 3 h při 37 °C a v 5% CO<sub>2</sub>. Médium pak bylo nahrazeno 100  $\mu$ l DMSO, aby se rozpustily krystaly fialového formazanu. Měření absorbance bylo prováděno na destičkovém readeru Synergy HT při 570 nm a 690 nm. Životaschopnost buněk ve vzorcích byla stanovena jako procento životaschopnosti kontrolních buněk (100  $\times$  průměr testované skupiny/průměr kontrolní skupiny). Data pro stanovení EC50 byla vypočtena pomocí softwaru Phototox v. 2.0 (ZEBET). Životaschopnost ve tmě byla měřena paralelně za stejných podmínek bez ozáření. Životaschopnost buněk ošetřených látkami 5, 7 a 10 po dobu 24 hodin bez ozáření byla podobná jako u neošetřených buněk, takže závěrem bylo, že látky nevykazují žádnou cytotoxicitu až do 10  $\mu$ M koncentrace (obrázek 4).

25

30

## Příklad 11 Fotodynamické účinky

35

Pro ozařování 96jamkových mikroděstiček a Petriho misek byl použit speciálně navržený LED světelný zdroj (Tomecka et al., CZ 302829 B6, 2006) s maximální emisní vlnovou délkou 414 nm a intenzitou světla 20 mW/cm<sup>2</sup>. Pro fotodynamické ošetření bylo odstraněno kultivační médium a nahrazeno PBS obsahujícím 5 mM glukózu. Ihned po ozáření byl PBS odstraněn, k buňkám bylo přidáno kompletní kultivační médium DMEM a kultivace trvala dalších 24 hodin. Všechny testy byly provedeny v triplicátech a nezávisle třikrát zopakovány. V počátečním experimentu byly buňky G361 ošetřeny všemi třemi sloučeninami na dobu 24 hodin a poté vystaveny světlu (zdroj LED, 414 nm) s celkovou dávkou záření 10 J/cm<sup>2</sup>. Životaschopnost buněk byla kvantifikována 24 hodin po ozáření MTT testem (tabulka 3). Následně byly G361 buňky ošetřeny látkou 7 a vystaveny celkovým dávkám ozáření 1 a 50 J/cm<sup>2</sup>. Získané výsledky jsou uvedeny v tabulce 4.

40

45

Tabulka 3: EC50 látek 5, 7 a 10 u ozářených buněk G361 (10 J/cm<sup>2</sup>).

Sloučenina	EC50 ± SD (μM)
<b>5</b>	6,213 ± 0,038
<b>7</b>	0,262 ± 0,002
<b>10</b>	2,058 ± 0,082

5 Tabulka 4: EC50 látky 7 u G361 buněk ozářených různou světelnou energií.

	EC50 ± SD (μM)
<b>1 J/cm<sup>2</sup></b>	3,079 ± 0,155
<b>10 J/cm<sup>2</sup></b>	0,262 ± 0,002
<b>50 J/cm<sup>2</sup></b>	0,052 ± 0,004

## Příklad 12 Měření produkce reaktivních forem kyslíku (ROS)

- 10 Produkce ROS v buňkách G361 byla kvantifikována pomocí CM-H<sub>2</sub>DCFDA (Invitrogen). Stručně, po inkubaci buněk se sloučeninami (24 hodin) bylo médium nahrazeno roztokem DCF (10 μM) po dobu 25 minut. Poté byly buňky promyty PBS, ozářeny a produkce ROS byla stanovena měřením fluorescence pomocí destičkového readeru Synergy HT za použití excitační vlnové délky 485 nm a emisní vlnové délky 548 nm. Produkce ROS po ošetření látkou 7 při koncentraci odpovídající hodnotě EC50 (0,052 μM) a ozáření 50 J/cm<sup>2</sup> vzrostla ve srovnání s kontrolními buňkami o 30 % (obrázek 2).

## Příklad 13 Analýza mitochondriálního membránového potenciálu

- 20 Změna potenciálu mitochondriální membrány byla monitorována fluorescenčním barvivem JC-1. Po 24 hodinách inkubace se sloučeninami byly buňky promyty PBS, poté bylo přidáno 50 μl roztoku JC-1 (Sigma-Aldrich) (5 mg/ml v DMSO + 5 ml PBS) a buňky byly inkubovány při 37 °C a v 5% CO<sub>2</sub> po dobu 20 minut. Po inkubaci byly buňky dvakrát promyty PBS. Fluorescence JC-1 byla poté měřena pomocí destičkového readeru Synergy HT. Výsledky byly vyjádřeny jako poměr zelené fluorescence (excitační vlnová délka - 485 nm, emisní vlnová délka - 548 nm) a červené fluorescence (excitační vlnová délka - 520 nm, emisní vlnová délka - 590 nm) zadržené v buňkách. Buňky G361 ošetřené látkou 7 a poté ozářené vykazovaly pokles agregace polymeru JC-1 v mitochondriích (obrázek 4), což naznačuje membránovou depolarizaci, což je charakteristickým znakem oxidačního stresu a indukce apoptózy.

30

## Příklad 14 Kometový test

- Mikroskopická sklíčka byla předem potažena 1% HMP agarózou (Qbiogen) rozpuštěnou v destilované vodě. Po ztuhnutí byly vytvořeny dva 1% agarózové spoty (rozpuštěno v PBS) a překryty krycím sklíčkem. Ošetřené nebo kontrolní buňky G361 byly trypsinizovány, opláchnuty DMEM a poté byla na mikroskopická sklíčka s agarózovým gelem přidána směs 25 μl buněčné suspenze a 85 μl 1% LMP agarózy (rozpuštěné v PBS). Mikroskopická sklíčka byla ponořena do lyzačního pufru s 1% Tritonem X na 1 hodinu a poté umístěna do elektroforetické vany a na 40 minut ponořena do chladného elektroforetického roztoku. Po elektroforéze (20 V, 350 mA, 20 minut) byla mikroskopická sklíčka ponořena do neutralizačního pufru (dvakrát na 10 minut). Vzorky byly poté 15 minut barveny SYBR Green (Invitrogen) a vyhodnoceny pomocí SW Comet Score (TriTek Corp.).

- 45 Za účelem stanovení rozsahu fragmentace DNA v buňkách G361 způsobené kombinací sloučeniny 7 a ozáření byl proveden kometový test (obrázek 4). Buňky byly rozděleny do čtyř skupin podle

stupně fragmentace DNA: 0 až 10 %, 11 až 30 %, 31 až 50 % a 50 až 100 %. Dle očekávání sloučenina 7 způsobila významnou fragmentaci DNA ve srovnání s neošetřenými kontrolními buňkami (tabulka 5).

- 5 Tabulka 5: Stupeň fragmentace DNA v buněčné linii G361 po ošetření látkou 7 při 0,052  $\mu\text{M}$  a ozáření 50  $\text{J}/\text{cm}^2$ .

Stupeň fragmentace DNA [%]	relativní počet buněk [%]	
	neošetřené	ošetřené
0-10	100,00 $\pm$ 0,00	62,83 $\pm$ 2,72
11-30	0,00	30,73 $\pm$ 4,07
31-50	0,00	4,84 $\pm$ 0,65
51-100	0,00	1,6 $\pm$ 1,59

#### Příklad 15 Poškození DNA studované pomocí analýzy fosforylace histonu H2A.X

10

Po ošetření buněk byly připraveny buněčné lyzáty v RIPA pufru, následně byly proteiny separovány na SDS-polyakrylamidových gelech a elektroblotovány na nitrocelulóзовé membrány. Po blokování, inkubaci se specifickými primárními protilátkami přes noc a inkubaci se sekundárními protilátkami konjugovanými s peroxidázou byla detekována aktivita peroxidázy pomocí činidel SuperSignal West Pico (Thermo Scientific) pomocí CCD kamery LAS-4000 (Fujifilm). Všechny primární protilátky byly zředěny v PBS obsahujícím 5% sušené mléko a 0,1% Tween 20. Specifické protilátky byly zakoupeny od Cell Signaling (anti-PARP, klon 46D11; králičí protilátka proti myším imunoglobulinům značená HRP), Sigma Aldrich (anti- $\alpha$ -tubulin, klon DM1A), Millipore (anti-fosfohiston H2A.X, Ser139, klon JBW301).

20

Pro nezávislé potvrzení poškození DNA v buňkách G361 způsobené kombinací sloučeniny 7 a ozáření, byla vyhodnocena fosforylace histonu H2A.X na Ser-139 ( $\gamma\text{H2A.X}$ ) pomocí imunoblotingové analýzy (obrázek 5). Zvýšená hladina  $\gamma\text{H2A.X}$  je hojně využívaným markerem poškození DNA. Buňky byly ošetřeny různými dávkami sloučeniny 7 na dobu 24 hodin, pak byly buď udržovány ve tmě nebo vystaveny světlu s celkovou dávkou ozáření 1, 10 nebo 50  $\text{J}/\text{cm}^2$  a kultivovány po dobu dalších 24 hodin. Po uplynutí této doby byly buňky sklizeny a analyzovány pomocí imunoblotingu. V souladu s výše uvedenými zjištěními buňky udržované buď ve tmě, nebo bez látky 7 nevykazovaly žádnou fosforylaci H2A.X, ale její hladina se rostla jak s koncentrací testované sloučeniny, tak s energií ozáření (obrázek 5); slabý signál  $\gamma\text{H2A.X}$  byl pozorován již při dávce 1  $\text{J}/\text{cm}^2$ , zatímco vyšší dávky ozáření (10 a 50  $\text{J}/\text{cm}^2$ ) vyvolaly masivní nárůst  $\gamma\text{H2A.X}$ .

30

#### Příklad 16 Antimikrobiální aktivita

35

Antimikrobiální aktivita byla testována na *Escherichia coli* (DH5alfa). Buňky byly pěstovány aerobně při 37  $^{\circ}\text{C}$  v LB médiu. Po dosažení exponenciální růstové fáze byla suspenze zředěna čerstvým LB, doplněna testovanými sloučeninami nebo zředěným DMSO (kontrola) a naočkována na Petriho misky s agarovým médiem. Po 5 hodinách byly destičky vystaveny světlu ze zdroje emitujícího světlo, maximální emisní vlnové délka 414 nm, intenzita světla nastavena na 20  $\text{mW}/\text{cm}^2$  (M. Tomecka, et al., CZ 302829 B6, 2006). Kontrolní vzorky pro stanovení míry toxicity testované sloučeniny ve tmě nebyly vystaveny světlu. Po ozáření byly destičky v temném inkubátoru při 37  $^{\circ}\text{C}$  po dobu 16 hodin a poté byly spočítány kolonie. Výsledky experimentů jsou uvedeny na obrázku 6. Silný antibakteriální účinek byl pozorován, když byly buňky ošetřeny 1  $\mu\text{M}$  sloučeninou a ozářeny 1  $\text{J}/\text{cm}^2$ . Antibakteriální účinek byl závislý jak na koncentraci sloučeniny, tak na době ozáření.

45



## Příklad 17 Suché tobolky

5000 tobolek, každá obsahující jako aktivní složku 0,25 g jedné ze sloučenin zmíněných v předcházejících příkladech, se připraví následujícím postupem:

5

## Složení

	Aktivní složka	1250 g
	Talek	180 g
10	Pšeničný škrob	120 g
	Magnesium stearát	80 g
	Laktosa	20 g

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

## Příklad 18 Měkké tobolky

20 5000 měkkých želatinových tobolek, každá z nich obsahující jako aktivní složku 0,05 g jedné z látek zmíněných v předcházejících příkladech, se připraví následujícím postupem:

## Složení

	Aktivní složka	250 g
25	Lauroglykol	2 litry

30 Postup přípravy: Prášková aktivní látka je suspendována v Lauroglykolu® (propylenglykol laurát, Gattefoscé S. A., 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.

## Příklad 19 Měkké tobolky

35 5000 měkkých želatinových tobolek, každá z nich obsahující jako aktivní složku 0,05 g jedné ze sloučenin obecného vzorce I, tab. 1 a 2, zmíněných v předcházejících příkladech, se připraví následujícím postupem:

## Složení

40	Aktivní složka	250 g
	PEG 400	1 litr
	Tween 80	1 litr

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

## 50 Příklad 20 Gelový přípravek

Formulace masti/gelu 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 7	1,0 g
Butylhydroxytoluen	0,2 g
5 Butylparaben	0,2 g
Diethylenglykolmonoethylether	10,0 g
Silica colloidalis anhydrica	5,0 g
Propylenglykollaurát	83,6 g

10 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 7. Oxid křemičitý colloidalis anhydrica pravděpodobně zpomalí penetraci účinné látky.

## 15 Příklad 21 Postup přípravy kožní masti

Složky masti jsou uvedeny v gramech na 200 g:

Látka	Obsah
20 Látka 7	2,0 g
Butylhydroxytoluen	0,4 g
Butylparaben	0,4 g
Diethylenglykolmonoethylether	20,0 g
Glyceroldibehenát	44,0 g
25 Propylenglykollaurát	133,2 g

## Doporučený postup

30 Fáze A: 2 g látky 7 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.

35 Fáze B: 0,4 g Nipanox BHT a 0,4 g Nipabutyl se rozpustí za stálého míchání ve 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 taví 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.

## 40 Příklad 22 Formulace přípravku pro lokální aplikaci na kůži

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

45 Aktivní složka: Látka 7		0,1 %
Olejová fáze:	Cetylalkohol	5,0 %
	Glycerylmonostearát	15,0 %
	Sorbitanmonooleát	0,3 %
	Polysorbát 80 USP	0,3 %
50 Vodná fáze:	Methylcelulóza 100 cps	1,0 %
	Methylparaben	0,25 %
	Propylparaben	0,15 %
	Vyčištěná voda q.s. na	100 %

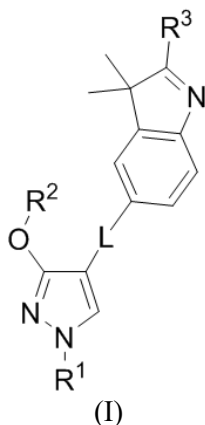
55

- 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. Sloučenina 7 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 účinku na kůži.

## PATENTOVÉ NÁROKY

1. Konjugované pyrazol-indolové deriváty obecného vzorce I

5



kde

10

L je vybrán ze skupiny zahrnující  $-\text{CH}=\text{CH}-$ ,  $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}-$ ,  $-\text{C}\equiv\text{C}-$ ;

$\text{R}^1$  je fenyl, který může být nesubstituovaný nebo případně substituovaný 1 až 2 substituenty vybranými ze skupiny obsahující fluor, methyl a methoxyskupinu;

15

$\text{R}^2$  je C1-C8 alkyl, s výhodou C1-C6 alkyl, který může být rozvětvený nebo lineární, přičemž v alkylu může případně být jeden nebo dva atomy uhlíku nahrazeny heteroatomem vybraným ze skupiny obsahující O, N nebo S;

20

$\text{R}^3$  je fenyl, který může být nesubstituovaný nebo případně substituovaný 1 až 2 substituenty vybranými ze skupiny zahrnující F, Cl a methoxy;

nebo jejich farmaceuticky přijatelné soli.

25

2. Konjugované pyrazol-indolové deriváty obecného vzorce I podle nároku 1, vybrané ze skupiny zahrnující 5-{{3-(hexyloxy)-1-fenyl-1H-pyrazol-4-yl}ethynyl}-3,3-dimethyl-2-fenyl-3H-indol, 5-{{(E)-2-[3-(hexyloxy)-1-fenyl-1H-pyrazol-4-yl]ethenyl}-3,3-dimethyl-2-fenyl-3H-indol, 5-{{(1E,3E)-4-[3-(hexyloxy)-1-fenyl-1H-pyrazol-4-yl]buta-1,3-dien-1-yl}-3,3-dimethyl-2-fenyl-3H-indol.

30

3. Konjugované pyrazol-indolové deriváty obecného vzorce I podle nároku 1 nebo 2 pro použití jako léčiva.

35

4. Konjugované pyrazol-indolové deriváty obecného vzorce I podle nároku 1 nebo 2 pro použití k léčbě onemocnění zahrnujících proliferaci buněk.

5. Konjugované pyrazol-indolové deriváty obecného vzorce I podle nároku 1 nebo 2 pro použití k vyvolání apoptózy v savčích buňkách *in vitro* nebo *in vivo*.

40

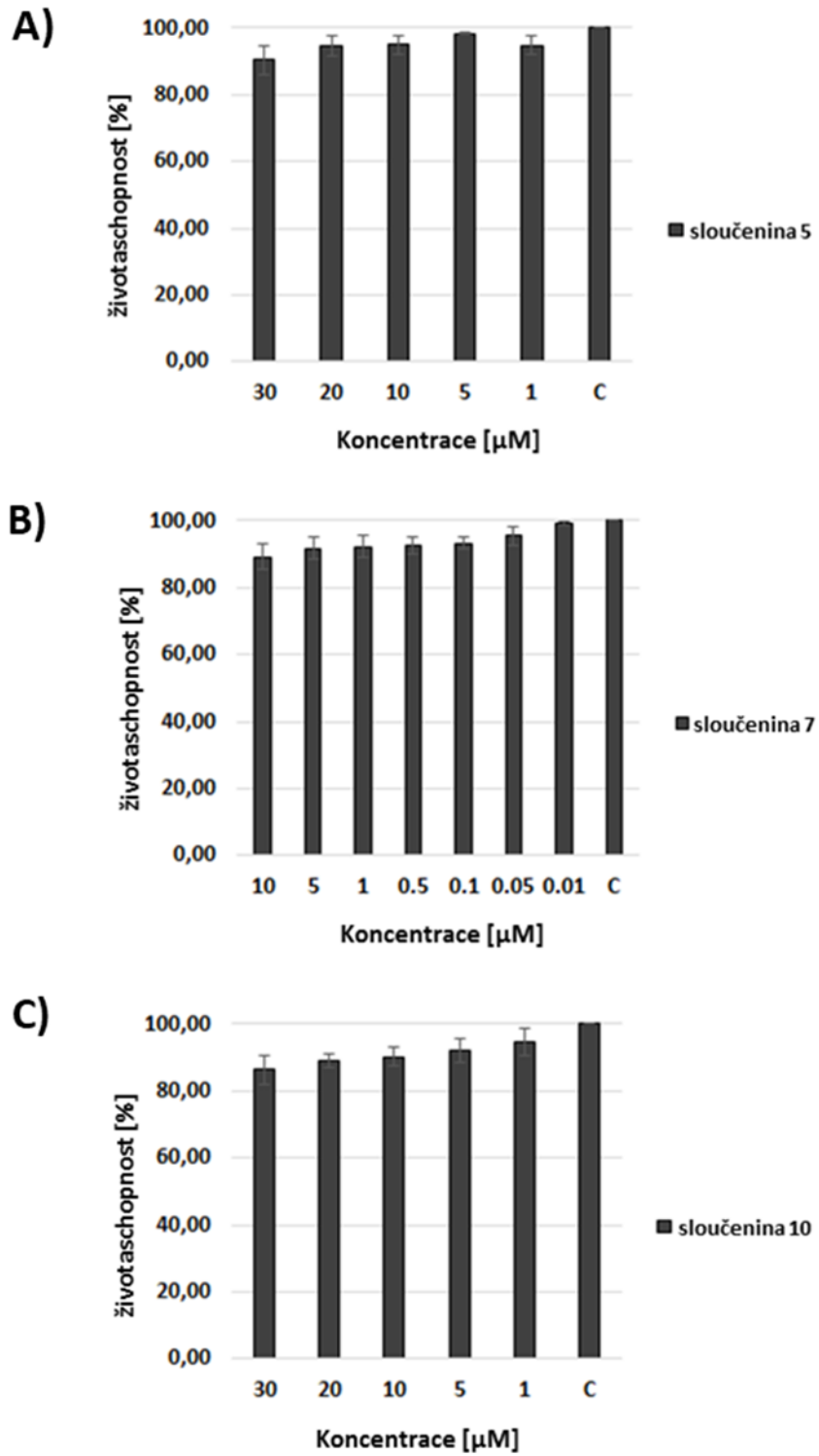
6. Konjugované pyrazol-indolové deriváty obecného vzorce I podle nároku 1 nebo 2 pro použití při fotodynamické terapii nádorů.

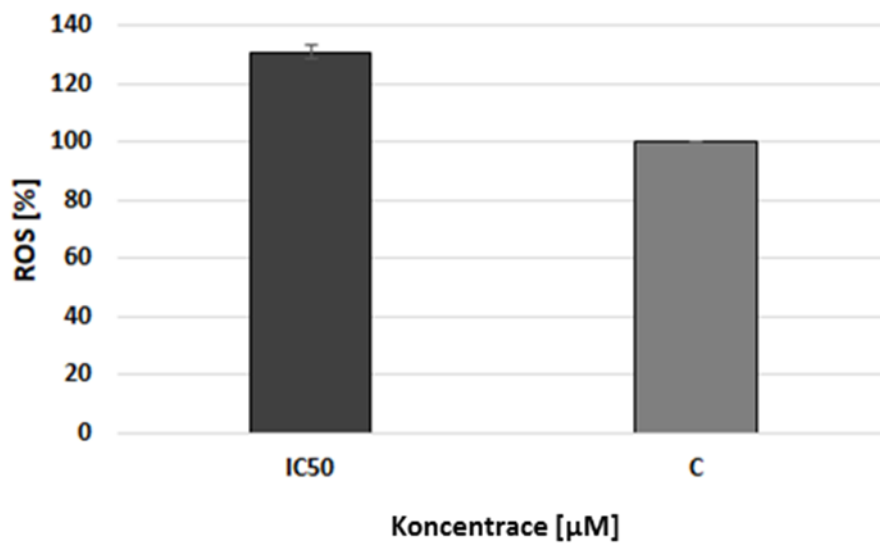
7. Konjugované pyrazol-indolové deriváty obecného vzorce I podle nároku 1 nebo 2 pro použití při fotodynamické terapii bakteriálních infekcí.

8. Farmaceutický přípravek, **vyznačující se tím**, že obsahuje alespoň jeden konjugovaný pyrazol-indolový derivát podle nároku 1 nebo 2 a farmaceuticky přijatelný nosič.

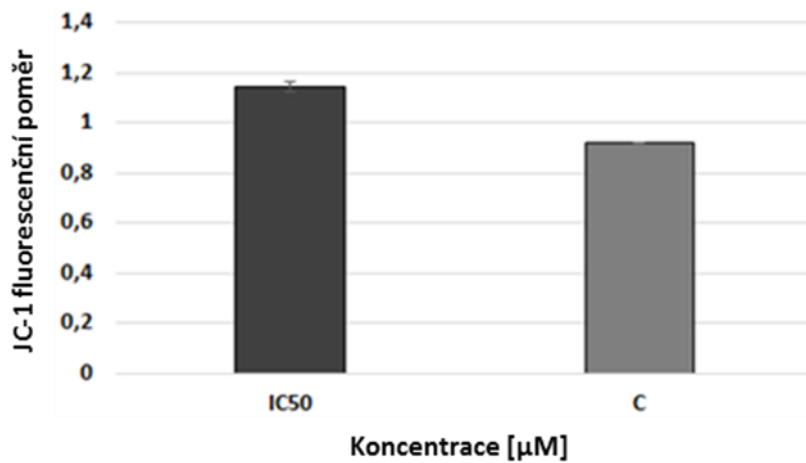
5

4 výkresy

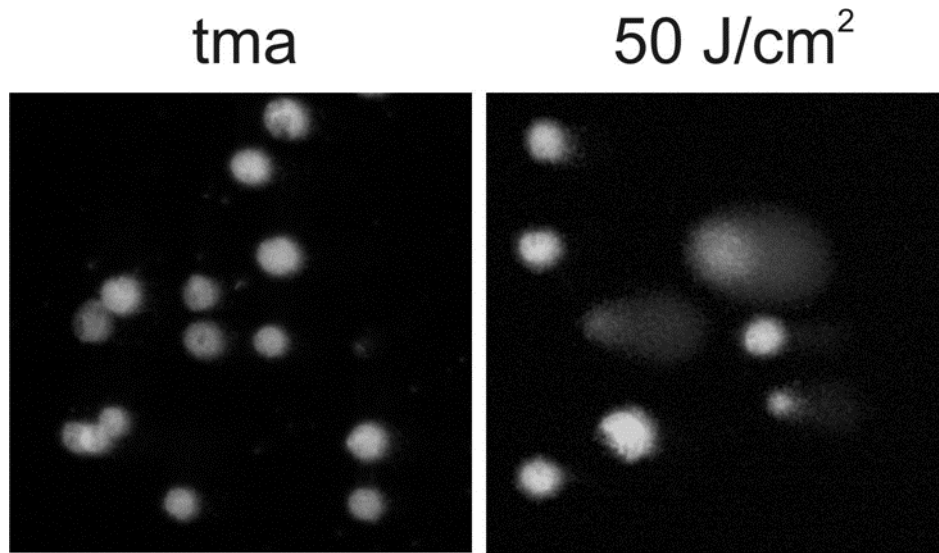




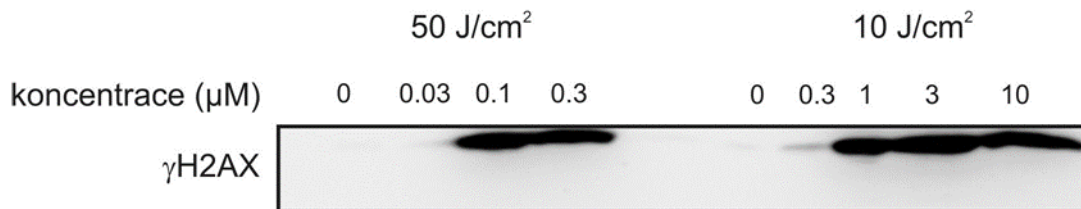
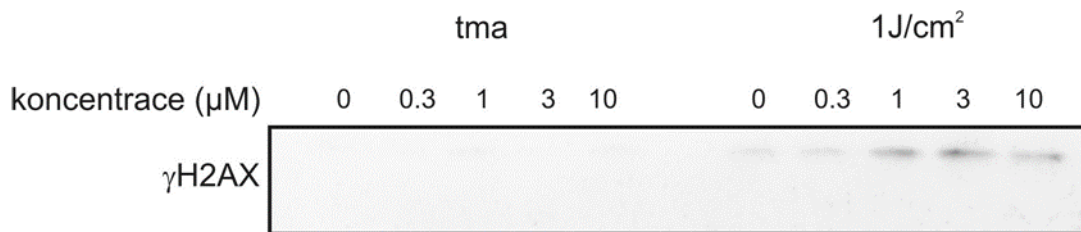
Obr. 2



Obr. 3

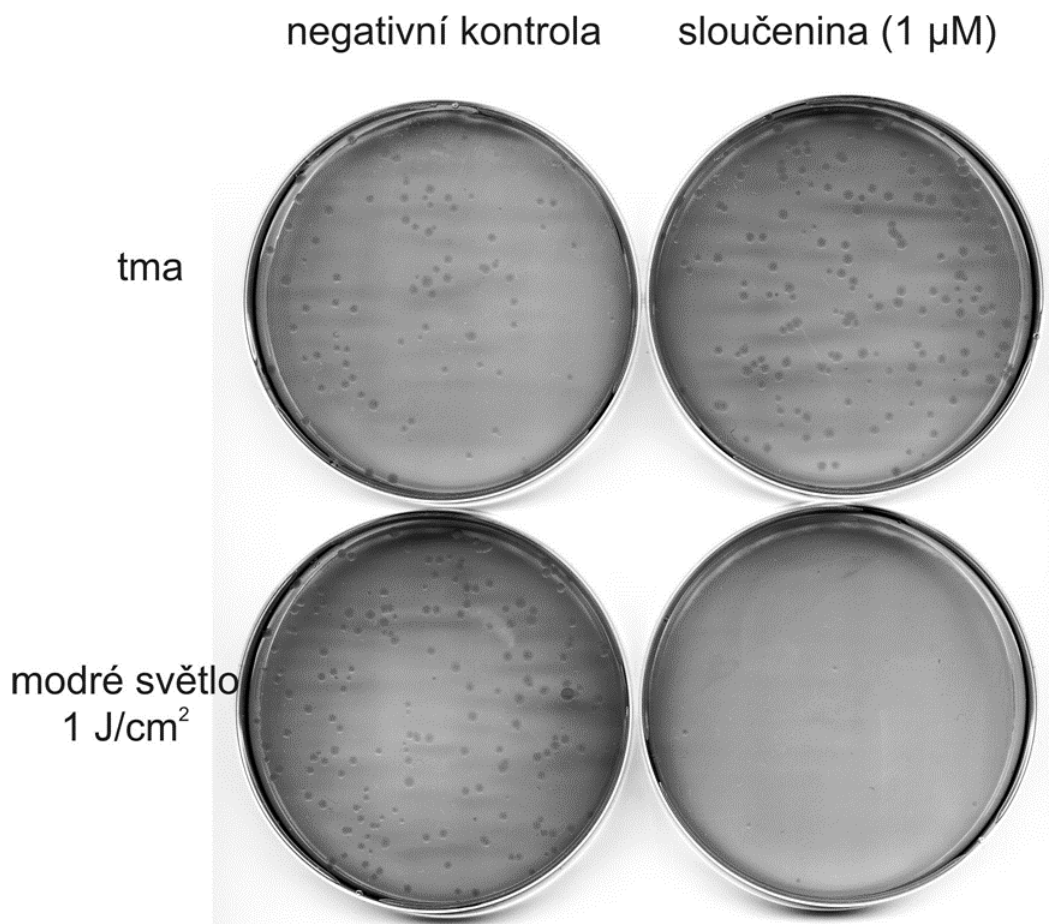


Obr. 4



Obr. 5





Obr. 6