

(19)



URZĄD  
PATENTOWY  
RZECZYPOSPOLITEJ  
POLSKIEJ

(10) **PL 245357 B1**

(12)

## Opis patentowy

(21) Numer zgłoszenia: **439403**

(22) Data zgłoszenia: **2021.11.02**

(43) Data publikacji o zgłoszeniu: **2023.05.08 BUP 19/2023**

(45) Data publikacji o udzieleniu patentu: **2024.07.08 WUP 28/2024**

(51) MKP:

**C07F 15/00** (2006.01)

**C07D 231/38** (2006.01)

**A61K 33/243** (2019.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

(73) Uprawniony z patentu:

**UNIWERSYTET JAGIELLOŃSKI, Kraków, PL**

(72) Twórca(-y) wynalazku:

**KRZYSZTOF SZCZUBIAŁKA, Krzywaczka, PL**

**MARTA STOLAREK, Kraków, PL**

**MARIA NOWAKOWSKA, Kraków, PL**

**KAMIL KAMIŃSKI, Kraków, PL**

(74) Pełnomocnik:

**rzecz. pat. Rafał Witek, Wrocław, PL**

(54) Tytuł:

**Pochodna cisplatyny o cytotoksyczności kontrolowanej światłem UV/VIS, sposób jej wytwarzania oraz zastosowanie w terapii antynowotworowej**

**PL 245357 B1**

## Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest pochodna cisplatyny o cytotoksyczności kontrolowanej światłem UV/VIS (ultrafiolet/światło widzialne) oraz sposób otrzymywania tej pochodnej. Pochodna cisplatyny będąca przedmiotem wynalazku znajduje zastosowanie w terapii antynowotworowej.

Idea zastosowania światła w celach terapeutycznych jest znana w stanie techniki i wykorzystywana już od ponad stu lat. Do tej pory najbardziej znanym jej przykładem jest terapia fotodynamiczna (PDT), stosowana głównie w leczeniu nowotworów [1]. PDT polega na podawaniu substancji zwanej fotouczulaczem, która po absorpcji światła i wzbudzeniu elektronowym przekazuje pochłoniętą energię cząsteczkom tlenu, tworząc reaktywne formy tlenu (ROS), stanowiące rzeczywisty czynnik aktywny niszczący komórki rakowe. Fotofarmakologia opiera się na innym podejściu do terapeutycznego wykorzystania światła [2]. Polega ona na zastosowaniu fotoaktywnej cząsteczki, która sama jest lekiem, może być również przyłączona do cząsteczki leku lub do struktury komórkowej, takiej jak kanał jonowy. Aktywność farmakologiczną takiego układu można modyfikować poprzez absorpcję światła, po której następuje nieodwracalne zdarzenie fotochemiczne z udziałem cząsteczki, takie jak fotodysocjacja, przeniesienie grupy wewnątrzcząsteczkowej, wodoru lub elektronu lub odwracalna znacząca zmiana kształtu cząsteczki. Zmiana struktury cząsteczki, a co za tym idzie jej wielkości i właściwości fizykochemicznych (moment dipolowy, rozpuszczalność, sztywność), może spowodować zmianę jej właściwości biologicznych i aktywności farmakologicznej skutkującą zmianą (wzmocnieniem lub osłabieniem) efektu terapeutycznego. Cząsteczki zdolne do odwracalnej zmiany swojej struktury pod wpływem absorpcji światła o odpowiedniej długości fali nazywane są fotoprzełącznikami. Najwcześniejszym i najczęściej używanym typem fotoprzełączników są związki na bazie azobenzenu, które mogą ulegać fotoizomeryzacji *trans-cis* (E/Z) [3]. Jedną ze strategii fotofarmakologicznych jest wprowadzenie cząsteczki fotoprzełącznika w miejsce strukturalnie podobnej części cząsteczki leku. W ten sposób uzyskuje się izoster leku zawierający fotoprzełącznik. Taka procedura nazywana jest „azologizacją”, ponieważ pierwotnie stosowano ją do pochodnych azobenzenu wykorzystywanych jako fotoprzełączniki. Azologizację można zastosować do wielu leków będących pochodnymi stilbenu, N-fenylobenzamidu i innych typów (hetero)arylo-(hetero)aryloamidów, anilin benzyloowych i (tio)eterów benzylofenyloowych [2]. Pierwszy system fotofarmakologiczny, który obejmował aktywację kanałów jonowych światłem w celu kontrolowania odpalania neuronów, został opisany w 2004 roku [4]. Do tej pory została zbadana fotokontrola nad antybiotykami [5], enzymami [6], peptydami i białkami [7], kwasami nukleinowymi [8], oligonukleotydami [9], kanałami jonowymi (Cl, Ca, K, Na) [10] i receptorami komórkowymi [11]. Podejście fotofarmakologiczne zostało zaproponowane w terapii nowotworów [12], cukrzycy [13], patologii słuchu [14] i wzroku [15], bólu [16] oraz chorób zakaźnych [17]. Koncepcja fotofarmakologiczna w terapii jest bardzo atrakcyjna, ponieważ światło pod wieloma względami jest idealnym bodźcem terapeutycznym: światło widzialne (Vis) lub podczerwone (IR) jest nieszkodliwe dla człowieka i może docierać do dotkniętego obszaru ciała w dużej ilości (intensywność), z bardzo dobrą jakością (długość fali), ilościową (czas naświetlania) i przestrzenną precyzją. Światło może być dostarczane bezpośrednio (skóra, oczy), endoskopowo (przewód pokarmowy, układ oddechowy, macica, drogi żółciowe, zatoki, pęcherz moczowy), przez skórę (jądra, tarczyca, niektóre węzły chłonne, mięśnie i kości) lub przez nacięcie skóry (otrzewna, trzustka, wątroba, żołądek, nerki, prostata). Najbardziej niedostępne dla światła części ciała to mózg i szpik kostny, do których można dotrzeć tylko chirurgicznie. Szczególnie przydatne jest światło o długości fali w zakresie ograniczonym do obszaru podczerwieni (tzw. okienko terapeutyczne), które może przenikać do tkanek pod skórą na głębokość do około 2 cm.

Znane w stanie techniki są również fotoprzełączniki. Związki nimi zmodyfikowane powinny charakteryzować się aktywnością terapeutyczną po napromieniowaniu jedną długością fali i tracić swoją aktywność po napromieniowaniu inną, przy czym optymalnie obie powinny znajdować się w oknie terapeutycznym. Co więcej, obie formy cząsteczki fotoprzełącznika powinny być stabilne (tj. nie powinny zmieniać się spontanicznie jedna w drugą poprzez izomeryzację termiczną, jak w przypadku większości izomerów *cis* pochodnych azobenzenu), a wszystkie lub przynajmniej zdecydowana większość cząsteczek powinna ulegać fotoizomeryzacji po absorpcji światła o danej długości fali. Innymi słowy, stany fotostacjonarne (PSS), ustalone po wystarczająco długim naświetlaniu dowolną długością fali, powinny zawierać praktycznie czysty jeden z obu izomerów. Kolejnym wymaganiem, szczególnie ważnym w przypadku, gdy fotoprzełącznik ma działać w środowisku wewnątrzkomórkowym, jest odporność na procesy biochemiczne, które mogą go dezaktywować, takie jak hydroliza czy redukcja formą zreduko-

waną glutationu (GSH). Ta ostatnia jest często spotykanym problemem, związanym z fotoprzełącznikami opartymi na azobenzeniu [18]. Ponadto synteza i dalsza funkcjonalizacja fotoprzełącznika powinna być łatwa. Niestety idealny fotoprzełącznik nie został jeszcze opracowany. Na przykład izomery *cis* fotoprzełączników opartych na azobenzeniu często termicznie izomeryzują do postaci *trans* zbyt szybko, aby można je było zastosować terapeutycznie. Jest to w szczególności problem z fotoprzełącznikami absorbującymi światło podczerwone i/lub działającymi w środowisku wodnym. Ponadto trudne jest jednoczesne osiągnięcie długiego termicznego okresu półtrwania izomeru i wysokiej zawartości tego fotoizomeru w PSS [19]. W związku z tym prowadzone są liczne badania i osiągnięto szybki postęp w pracach nad cząsteczką, która mogłaby spełnić wszystkie wymagania idealnego fotoprzełącznika. Aryloazopirazole (AAP) po raz pierwszy zsyntetyzowano prawie 30 lat temu [20], ale ich zdolności fotoprzełączania badane są dopiero od 2014 r. (grupa Fuchtera) [21]. Stwierdzono, że właściwości związków opartych na ugrupowaniu AAP czynią je niemal idealnymi fotoprzełącznikami [2, 22–24]. Konformacja izomeru *cis* AAP jest niedostępna dla azobenzenów i może być sterycznie zmodyfikowana przez podstawienie w pierścieniu pirazolowym [21]. Na podstawie obliczeń DFT oczekuje się dużej różnicy w momentach dipolowych między izomerami AAP, np. dla benzimidazolowej pochodnej arylazopirazolu różnica momentów dipolowych między izomerami *trans* i *cis* wynosi 3,30 D [25]. W szczególności fotoprzełączniki typu AAP, które są pochodnymi eteru pirazolioazofenyloвого, mają zalety istotne w zastosowaniach biomedycznych, tj. wykazują prawie ilościową fotoizomeryzację *trans-cis* i fotoizomeryzację odwrotną odpowiednio w bliskim UV (365 nm) i w świetle widzialnym (532 nm) [26]. Dla światła widzialnego przy 400 nm fotoizomeryzacja *trans-cis* nie jest ilościowa, ale nadal bardzo wydajna (80%), a zatem obie fotoizomeryzacje można osiągnąć przy użyciu wyłącznie światła widzialnego [26]. W przypadku pochodnych azobenzenowych tak wysoką konwersję osiągnięto tylko w azobenzenach zmostkowanych (diazocynach) [27]. Poza tym odpychanie steryczne w obrębie izomeru *cis* AAP jest zmniejszone w porównaniu z azobenzenem, w wyniku czego uzyskuje się długożyjący izomer *cis* ( $\tau_{1/2} \approx$  miesiące, więc można AAP uznać za fotochrom typu P). Ponadto etery pirazolioazofenyloвого są odporne na fotoreakcje uboczne i redukcję przez GSH [18, 26], co jest warunkiem wstępnym ich wewnątrzkomórkowej, długotrwałej aktywności *in vivo*. Istotny jest również fakt, że grupa pirazolowa jest obecna w wielu substancjach wykazujących aktywność biologiczną [28, 29], w tym przeciwnowotworową [30], przeciwwirusową [31], przeciwdrgawkową [32], oraz inhibitorach cyklooksygenazy (COX) [33] i nityfikacji [34].

W stanie techniki znana jest cisplatyna (cis-diaminodichloroplatyna (II), CDDP), która została po raz pierwszy zsyntetyzowana w 1845 r. przez Michele Peyrone i została nazwana solą Peyrone'a [1]. Jej silne działanie przeciwnowotworowe zostało przypadkowo odkryte w 1967 r. przez Rosenberga [2]. W 1978 roku związek ten został zatwierdzony jako lek przeciwnowotworowy przez FDA, a rok później w Wielkiej Brytanii i innych krajach europejskich. Od tego czasu stał się jednym z najszerzej stosowanych leków przeciwnowotworowych, przede wszystkim w leczeniu raka jąder, jajników, szyjki macicy, głowy i szyi, raka pęcherza moczowego i płuc, w leczeniu czerniaków i chłoniaków. Szacuje się, że światowy rynek cisplatyny jest wart około 2 miliardy dolarów, a co drugi pacjent onkologiczny jest leczony cisplatyną lub jej analogiem [3]. Cisplatyna jest podawana dożylnie i wiąże się z białkami osocza w 65–98% w ciągu 24 godzin po szybkiej infuzji i w 100% po powolnej infuzji [4]. Wnika do komórek poprzez dyfuzję bierną przez błonę komórkową [5] lub jest aktywnie przenoszona przez białko transportujące miedź (CTR1) [6]. Dlatego komórki z wyższą ekspresją CTR1 są bardziej wrażliwe na cisplatynę [7]. Stężenie anionów chlorkowych Cl<sup>-</sup> w komórce jest znacznie mniejsze niż poza komórką, dlatego ligand w postaci anionu chlorkowego Cl<sup>-</sup> w cisplatynie jest zastępowany cząsteczkami wody i powstaje jednowodny, dodatnio naładowany kompleks, który preferencyjnie reaguje z atomem N7 w guaninie w obrębie genomowych lub mitochondrialnych nici DNA. Kompleks reaguje następnie z atomem azotu zasady azotowej innego nukleotydu (guaniny lub adeniny [8]), głównie w tej samej nici tworząc cykliczny addukt [9]. Powstawanie adduktu blokuje produkcję DNA, mRNA i białek, co ostatecznie prowadzi do nekrozy lub apoptozy komórek. Co ciekawe, związki *trans*-platyny nie wykazują aktywności przeciwnowotworowej ze względu na niezdolność do sieciowania DNA i szybką dezaktywację przez tiole [10]. Ponadto cisplatyna indukuje stres oksydacyjny poprzez tworzenie reaktywnych form tlenu, takich jak rodnik hydroksylowy lub anionorodnik ponadtlenkowy. Niestety cisplatyna reaguje nie tylko z DNA. Drugim celem jest grupa tiolowa glutationu (GSH). Reaguje także z cytoszkieletem, RNA i białkami zawierającymi grupy tiolowe, takimi jak metalotioneiny [11]. Te interakcje są odpowiedzialne za ciężkie działania niepożądane cisplatyny, które obejmują nudności, wymioty, nefrotoksyczność, ototoksyczność, hepatotok-

syczność i neurotoksyczność. Kolejnym wyzwaniem związanym ze stosowaniem cisplatyny jest obserwowana niekiedy oporność na ten lek. Niektóre nowotwory są z natury odporne na cisplatynę (np. rak okrężnicy i niedrobnokomórkowy rak płuc), podczas gdy inne rozwijają oporność z czasem (np. rak jajnika lub drobnokomórkowy rak płuc). Rozwój oporności wynika ze zmniejszonej akumulacji leku wewnątrz komórek, inaktywacji GSH i metalotionein oraz szybszej naprawy DNA [12]. Ze względu na kliniczne ograniczenia cisplatyny zsyntetyzowano i przetestowano ogromną liczbę jej pochodnych. Karboplatyna i oksaliplatyna stanowią dwa przykłady, które zostały z powodzeniem wprowadzone do leczenia klinicznego. Aby mógł zostać dopuszczony do zastosowań klinicznych, analog platyny musi wykazywać co najmniej jedną przewagę kliniczną nad cisplatyną, np. aktywność wobec nowotworów wewnętrznie opornych na cisplatynę, zmniejszenie działań niepożądanych lub możliwość podawania doustnego [13]. Badania zależności między strukturą a aktywnością (SAR) wykazały, że aby wykazywać aktywność przeciwnowotworową, nowy kompleks platyny powinien spełniać następujące kryteria [14]: związek powinien być neutralny, związek musi mieć dwie grupy odchodzące, które są w pozycji *cis* względem siebie, a w konsekwencji obie grupy aminowe również powinny znajdować się we wzajemnej pozycji *cis*, grupy odchodzące powinny mieć umiarkowaną tendencję do dysocjacji. Związki z ligandami, które zbyt łatwo dysocjują, są niedopuszczalnie toksyczne, podczas gdy związki z ligandami zbyt silnie związanymi są nieaktywne. Kation platyny tworzy trwałe wiązania koordynacyjne z atomami azotu związków aromatycznych zawierających azot [15]. W związku z tym zsyntetyzowano i zbadano szereg analogów cisplatyny z grupami aminowymi zastąpionymi przez związki N-heterocykliczne. Tego typu pochodną cisplatyny jest m.in. pikoplatyna, w której zastąpienie jednej grupy aminowej ortopikoliną (tj. 2-metylopirydyną) skutkowało niższą aktywnością wobec guzów wrażliwych na cisplatynę, ale wyższą wobec raka jajnika i drobnokomórkowego raka płuc [16]. Przykładami innych pierścieni N-heterocyklicznych stosowanych jako ligandy są ugrupowania takie jak: pirydyna, 7-azaindol, rutaekarpina, imidazol, oksadiazol, oksoizoaporfina, benzotiazol, fenantrydyna, 1,8-naftyrydyna oraz 1,10-fenantrolina. Szczególnie interesujące są kompleksy ligandów opartych na pirazolu i  $Pt^{2+}$ . Analog cisplatyny zawierający pirazol ( $cis-PtCl_2(pzH)_2$ ) został po raz pierwszy zsyntetyzowany przez van Kralingena i współpracowników [17]. Później Sakai wraz z zespołem zaproponowali zmodyfikowaną metodę syntetyczną [18]. Stwierdzono, że  $cis-PtCl_2(pzH)_2$  ma aktywność przeciwnowotworową znacznie niższą niż cisplatyna [18,19], a jej analog kwasu 3,5-pirazolidokarboksyłowego był całkowicie nieskuteczny wobec linii komórkowej ludzkiego gruczolakoraka żołądka (AGS) [18]. Z drugiej strony, kationowe wielocentrowe kompleksy platyny połączone z 4,4'-dipirazolilometanem tworzyły wiązania z różnymi nićmi DNA i wykazywały aktywność w linii komórkowej mysiej białaczki L1210 oraz w ludzkim raku jajnika [20].

W świetle obecnego stanu techniki pozostaje nierozwiązanych wiele problemów takich jak: wysoka toksyczność cisplatyny i jej pochodnych w terapii przeciwnowotworowej w stosunku do komórek zdrowych, brak możliwości manipulowania poziomem cytotoksyczności cisplatyny lub jej pochodnej światłem UV lub VIS, brak możliwości wielokrotnego przeprowadzania cisplatyny lub jej pochodnych w formę o wysokiej bądź niskiej toksyczności, duża liczba skutków ubocznych towarzyszących dotychczasowej terapii cisplatyną i jej pochodnymi prowadzące do poważnych konsekwencji m.in. infekcji, krwawienia, wyczerpania, wymiotów, utraty apetytu, biegunek, utraty słuchu, niewydolności nerek, trudności z oddychaniem i wtórnych nowotworów, niska skuteczność leczenia cisplatyną znaną w stanie techniki, pojawiająca się z czasem z powodu pojawienia się oporności, w tym oporności krzyżowej. W związku z tym istnieje konieczność opracowywania i syntetyzowania nowych pochodnych cisplatyny, jako potencjalnych leków przeciwnowotworowych, które mogłyby stanowić zrewolucjonizowane podejście w leczeniu tych schorzeń.

Nieoczekiwanie większość wskazanych powyżej problemów technicznych może być rozwiązana w prezentowanym wynalazku.

Przedmiotem wynalazku jest nowa pochodna cisplatyny oraz jej zastosowania, które zostały zdefiniowane w załączonych zastrzeżeniach.

Podczas prac nad niniejszym wynalazkiem otrzymano pochodną cisplatyny podstawioną ugrupowaniem arylazopirazolu zdolnym do odwracalnej fotoizomeryzacji pod wpływem światła 360–400 nm (*trans-cis*) i 530 nm (*cis-trans*). AAP został przyłączony do atomu platyny poprzez pirazolowy atom azotu. Wykazano, że otrzymana pochodna cisplatyny w formie nienaświetlanej (tj. otrzymanej bezpośrednio po syntezie) charakteryzuje się względnie wysoką toksycznością w stosunku do komórek rakowych (komórki mysiego czerniaka B16-F10 i komórek mysiego raka sutka 4T1). W wyniku naświetlania światłem o długości fali 360–400 nm, związek ten przekształca się w postać o znacznie mniejszej tok-

syczności. W kolei postać mniej toksyczna ulega powolnemu przekształceniu w postać bardziej toksyczną bez udziału światła. Transformację z postaci mniej toksycznej (otrzymanej poprzez naświetlanie promieniowaniem o długości fali 360–400 nm) z powrotem w postać bardziej toksyczną można przyspieszyć poprzez naświetlanie promieniowaniem widzialnym o długości fali około 530 nm. Przekształcenie związku z postaci mniej toksycznej w postać bardziej toksyczną lub na odwrót poprzez naświetlanie światłem o odpowiednich długościach fali można przeprowadzić wielokrotnie.

Fotoczułość tego związku umożliwia czasową i przestrzenną kontrolę siły jego działania przeciwnowotworowego, np. wzmocnienia jego działania (zwiększenie cytotoxyczności) selektywnie w tkance nowotworowej poprzez naświetlanie guza nowotworowego światłem o długości fali około 530 nm po podaniu związku w postaci mniej toksycznej. Poprzez odpowiednie zmodyfikowanie struktury chemicznej światłoczułych ligandów możliwa będzie modyfikacja właściwości fotochemicznych (w tym długości fali światła zastosowanego do naświetlań, stabilności termicznej mniej toksycznej formy) i farmakologicznych (cytotoxyczność, wiązanie z białkami, etc.) światłoczułych pochodnych cisplatyny według wynalazku.

Pochodna cisplatyny będąca przedmiotem wynalazku charakteryzuje się wieloma zaletami. Szczególną jej zaletą jest możliwość manipulowania poziomem cytotoxyczności tej pochodnej cisplatyny poprzez jej naświetlanie bądź jego brak, jej właściwości fotochemiczne i możliwość wielokrotnego przeprowadzania cisplatyny w formę o wysokiej, bądź niskiej toksyczności. Dzięki tej właściwości możliwe jest celowe ograniczanie cytotoxyczności ogólnoustrojowej poprzez dokonywanie przemiany leku w formę aktywną dopiero po jego dotarciu do tkanki nowotworowej lub jedynie w obrębie tej tkanki. Kolejną korzyścią wynikającą z przedmiotowego wynalazku jest zwiększone, selektywne działanie przeciwnowotworowe, dzięki czemu jej stosowanie powinno wiązać się z mniejszą liczbą i intensywnością skutków ubocznych towarzyszących terapii.

Przedmiot wynalazku w przykładach wykonania jest uwidoczony na rysunkach, na których fig. 1 przedstawia strukturę nowej pochodnej cisplatyny ( $\text{cis-PtCl}_2\text{PS}_2$ ), fig. 2 przedstawia struktury znanych w stanie techniki analogów cisplatyny z pirazolem i 3,5-dikarboksypirazolem jako ligandami [18], fig. 3 przedstawia schemat syntezy fotoprzełącznika, fig. 4 przedstawia widmo NMR fotoprzełącznika, fig. 5 przedstawia fotoizomeryzację *cis-trans* fotoprzełącznika, fig. 6 przedstawia widma UV-Vis fotoprzełącznika w postaci *trans* ( $c=0,0125$  mg/ml w DMSO) naświetlanego światłem 365 nm (lampa ksenonowa), fig. 7 przedstawia schemat syntezy nowej pochodnej cisplatyny, fig. 8 przedstawia widmo NMR nowej pochodnej cisplatyny, fig. 9 przedstawia fotoizomeryzację *cis-trans* nowej pochodnej cisplatyny, fig. 10 przedstawia widma UV/Vis nowej pochodnej cisplatyny z fotoprzełącznikiem w postaci *trans* ( $c=0,0125$  mg/ml w DMSO) naświetlanej światłem 365 nm (lampa ksenonowa), fig. 11 przedstawia widma UV/Vis nowej pochodnej cisplatyny z fotoprzełącznikiem w postaci *cis* ( $c=0,015$  mg/ml w DMSO) naświetlanej światłem 530 nm (LED 530 nm, ThorLabs), fig. 12 przedstawia przeżywalność mysich komórek raka sutka 4T1 po dodaniu różnych stężeń *cis-PtCl}\_2\text{PS}\_2 w DMSO z ligandem fotoprzełącznika w postaci *trans* (czerwone słupki) i *cis* (niebieskie słupki), fig. 13 przedstawia proliferację mysich komórek czerniaka B16-F10 po dodaniu *cis-PtCl}\_2\text{PS}\_2 w DMSO (stężenie końcowe  $1,06 \cdot 10^{-5}$  M, 8,04  $\mu\text{g/ml}$ ) z ligandem fotoprzełącznika w postaci *trans* (czerwone słupki) i *cis* (niebieskie słupki) 46 h po podaniu związku w DMSO.**

#### Przykład 1

Fotoprzełącznik (PS) otrzymano poprzez dwuetapową ścieżkę syntezy.

##### Etap 1

Etap 1 przebiegał zgodnie z procedurą opisaną w literaturze [5]. Wszystkie reagenty wykorzystane w syntezie fotoprzełącznika są komercyjnie dostępne, 4-amino-1-metylopirazol (2,91 g, 30 mmol, 1 ekwiwalent) rozpuszczono w 60 ml wody, a następnie dodano 14 ml HCl (12,2 mol/l, 170 mmol, 5,67 ekwiwalentu). Po ochłodzeniu roztworu do temperatury 0–5°C, powoli dodano wstępnie schłodzony do temperatury 0–5°C roztwór  $\text{NaNO}_2$  (2,7 g, 39 mmol, 1,3 ekwiwalentu) rozpuszczonego w 60 ml wody. Po schłodzeniu mieszaniny przez 30 min w łaźni o temperaturze 0°C, powoli dodano wstępnie schłodzony do temperatury 0–5°C roztwór fenolu (3,38 g, 36 mmol, 1,2 ekwiwalentu) i NaOH (3,2 g, 80 mmol) rozpuszczonego w 80 ml wody. Następnie powoli dodano wstępnie schłodzony do temperatury 0–5°C roztwór  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (10,6 g, 100 mmol) rozpuszczony w 100 ml wody. Podczas tego etapu utworzyły się żółtobrazowe cząstki i mieszaninę reakcyjną mieszano przez 1 godzinę utrzymując temperaturę w zakresie 0–5°C. Następnie mieszaninę doprowadzono do pH~7, a powstałą zawiesinę przesączono i przemyto na lejku Büchnera 50 ml wody destylowanej. Placpek filtracyjny wysuszono w próżni w temperaturze 25°C przez 24 h, otrzymując produkt w postaci żółtego ciała stałego – pAzofenol  $\{((\text{E})-4-((1\text{-metylo-1H-pirazo-4-ilo)diazenylo)fenol)\}$  (5,71 g, wydajność: 94,2%).

## Etap 2

Otrzymany w Etapie 1 pAzofenol ((E)-4-((1-methyl-1H-pyrazol-4-yl)diazenyl)phenol) (1,00 g, 4,9 mmol, 1 ekwiwalent) i  $K_2CO_3$  (2,73 g, 19,8 mmol, 4 ekwiwalenty) rozpuszczono w 9 ml DMF, a następnie dodano KI (41 mg, 0,20 mmol, 0,05 ekwiwalentu). Do otrzymanej mieszaniny wkraplano 1-bromo-2-etanol (0,95 mL, 13,4 mmol, 2,7 ekwiwalentu), a następnie mieszano w temperaturze 110°C pod chłodnicą zwrotną przez 3 godziny: Mieszaninę reakcyjną wygaszono przez dodanie wody i mieszano do momentu wykrystalizowania się ciała stałego. Uzyskany produkt w postaci ciała stałego został przefiltrowany i przemyty wodą. Placek filtracyjny rozpuszczono w 80 mL octanu etylu, po czym roztwór osuszono nad  $Na_2SO_4$  i zateżono pod zmniejszonym ciśnieniem. Przeprowadzono oczyszczanie metodą chromatografii kolumnowej w układzie n-heksan : octan etylu 1:1. Otrzymano 920 mg PS (((E)-2-(4-((1-metylo-1H-pirazo-4-ilo)diazenylo)fenoksy)etan-1-ol)) (wydajność: 75%).

$^1H$  NMR (600 MHz, DMSO)  $\delta$  8.38 (s, J = 8.7 Hz, 1H), 7.91 (d, J = 0.6 Hz, 1H), 7.72 (d, 2H), 7.08 (d, 2H), 5.01 (t, J = 5.5 Hz, 1H), 4.07 (t, J = 6.1, 3.6 Hz, 2H), 3.90 (s, 3H), 3.76 – 3.72 (m, 2H).

Widmo NMR potwierdza strukturę fotoprzełącznika.

Przeprowadzono fotoizomeryzację wyżej uzyskanego fotoprzełącznika i stwierdzono, że zsyntetyzowany fotoprzełącznik ulega odwracalnej fotoizomeryzacji pod wpływem naświetlania światłem o długości fali 365–400 nm (fotoizomeryzacja *trans-cis*) i 530 nm (fotoizomeryzacja *cis-trans*).

## Przykład 2

Syntezę kompleksu *cis*-PtCl<sub>2</sub>PS<sub>2</sub> przeprowadzono w oparciu o zmodyfikowaną procedurę literaturową. 100 mg (0,241 mmol, 1 ekwiwalent) K<sub>2</sub>PtCl<sub>4</sub> rozpuszczono w 10 ml wody destylowanej, a następnie 118 mg (0,48 mmol) fotoprzełącznika zsyntetyzowanego w przykładzie 1 zawieszono w 33 ml etanolu, dodano go do wodnego roztworu K<sub>2</sub>PtCl<sub>4</sub> i mieszano w temperaturze pokojowej przez 2 godziny. Następnie dodano 5 ml etanolu w celu całkowitego rozpuszczenia fotoprzełącznika, po czym roztwór mieszano przez kolejne 46 godzin w temperaturze pokojowej. Etanol usunięto pod zmniejszonym ciśnieniem. Wytrącony produkt odwirowano z nad pozostałej wody (2 min, 10000 rpm) i zdekantowano supernatant. Dodano 5 ml eteru dietylowego, po czym zawiesinę wymieszano i usunięto supernatant. Procedurę przemywania eterem dietylowym przeprowadzono trzykrotnie. Produkt suszono w temperaturze 22°C przez 20 h w piecu próżniowym. Otrzymano kompleks *cis*-PtCl<sub>2</sub>PS<sub>2</sub> z wydajnością 77 mg (42%).

Analiza elementarna kompleksu *cis*-PtCl<sub>2</sub>PS<sub>2</sub>:

Eksperymentalna: C – 38,25%; H – 3,98%; N – 14,34%

Teoretyczna: (C<sub>24</sub>H<sub>28</sub>N<sub>8</sub>O<sub>4</sub>Cl<sub>2</sub>Pt, MW 758,52): C – 38,00%; H – 3,72%; N – 14,77%.

$^1H$  NMR (600 MHz, DMSO)  $\delta$  8,39 (s, 2H), 7,91 (s, J = 8,4 Hz, 2H), 7,75 – 7,71 (m, 4H), 7,11 – 7,05 (m, 4H), 5,02 (s, 2H), 4,07 (t, 4H), 3,90 (s, J = 10,6 Hz, 6H), 3,75 (dd, J = 9,7,4,9 Hz, 4H).

Analiza elementarna i widmo  $^1H$  NMR potwierdzają strukturę kompleksu *cis*-PtCl<sub>2</sub>PS<sub>2</sub>.

Fotoizomeryzację kompleksu *cis*-PtCl<sub>2</sub>PS<sub>2</sub> można śledzić wykonując widma UV-Vis.

## Przykład 3

Przeprowadzono badania cytotoksyczności otrzymanego fotokompleksu na linii komórkowej 4T1 (mysi rak piersi). Komórki rakowe 4T1 były hodowane na szalkach Petriego w medium hodowlanym (DMEM high glucose) uzupełnionym 10% (obj./obj.) płodową surowicą bydlęcą FBS, w 37°C w wilgotnej atmosferze zawierającej 5% (obj./obj.) CO<sub>2</sub>. Następnie komórki wysiano na 24-studzienkowych płytkach i hodowano przez 5 godzin. Po tym czasie komórki potraktowano 10  $\mu$ l kompleksu *cis*-PtCl<sub>2</sub>PS<sub>2</sub> w formach *cis* i *trans* w DMSO w 6 różnych stężeniach: 1,06·10<sup>-5</sup>; 7,04·10<sup>-6</sup>; 4,69·10<sup>-6</sup>; 3,13·10<sup>-6</sup>; 2,09·10<sup>-6</sup>; 1,39·10<sup>-6</sup> M i inkubowano przez 24 h, 48 h i 72 h. Do kontroli dodano 10  $\mu$ l DMSO. Do oceny żywotności komórek zastosowano test fioleto krystalicznego (CrV). Po inkubacji pożywkę usunięto, a komórki przemyto dwukrotnie 1 ml PBS, następnie dodano 1 ml 4% v/v mieszaniny formaldehyd/PBS i pozostawiono na 10 minut, ponownie przemyto 1 ml PBS i traktowano przez 2 minuty roztworem CrV. Następnie niezwiązany CrV usunięto przez odplukanie wodą. Po wysuszeniu dodano roztwór odbarwiający do każdego dołka i pozostawiono na 20 minut. Na koniec zmierzono absorbancję otrzymanego roztworu przy długości fali 540 nm, która była proporcjonalna do liczby żywych komórek. Dla kompleksu *cis*-PtCl<sub>2</sub>PS<sub>2</sub> badania komórkowe wykazały znacznie wyższą cytotoksyczność formy *cis*-PtCl<sub>2</sub>(*trans*-PS)<sub>2</sub> niż formy *cis*-PtCl<sub>2</sub>(*cis*-PS)<sub>2</sub> po 46 h w stężeniu 7,0  $\mu$ M lub wyższym dla mysich komórek raka piersi (4T1) (Fig. 12). Różnica w żywotności komórek dla obu fotoizomerów kompleksu wzrastała z czasem, pomimo faktu, że mniej toksyczny fotoizomer *cis*-PtCl<sub>2</sub>(*cis*-PS)<sub>2</sub> ulegał stopniowo termicznej przemianie w bardziej toksyczny *cis*-PtCl<sub>2</sub>(*trans*-PS)<sub>2</sub>.

#### Przykład 4

Toksyczność fotokompleksu platyny(II) zbadano przy użyciu linii komórkowej mysiego czerniaka B16-F10. Komórki rakowe B16-F10 były hodowane na szalkach Petriego w medium hodowlanym (DMEM high glucose) uzupełnionym 10% (obj./obj.) płodową surowicą bydlęcą FBS, w 37°C w wilgotnej atmosferze zawierającej 5% (obj./obj.) CO<sub>2</sub>. Następnie komórki wysiano na 24-studzienkowych płytkach i hodowano przez 5 godzin. Po tym czasie komórki potraktowano 10 µl kompleksu cis-PtCl<sub>2</sub>PS<sub>2</sub> w postaci *cis* i *trans* w DMSO w 6 różnych stężeniach: 1,06·10<sup>-5</sup>; 7,04·10<sup>-6</sup>; 4,69·10<sup>-6</sup>; 3,13·10<sup>-6</sup>; 2,09·10<sup>-6</sup>; 1,39·10<sup>-6</sup> M i inkubowano przez 24 h, 48 h i 72 h. Do kontroli dodano 10 µl DMSO. Do oceny żywotności komórek zastosowano test fioletu krystalicznego (CrV). Po inkubacji pożywkę usunięto, a komórki przemyto dwukrotnie 1 ml PBS, następnie dodano 1 ml 4% v/v mieszaniny formaldehyd/PBS i pozostawiono na 10 minut, ponownie przemyto 1 ml PBS i traktowano przez 2 minuty roztworem CrV. Następnie niezwiązany CrV usunięto przez odpłukanie wodą. Po wysuszeniu, dodano roztwór odbarwiający do każdego dołka i pozostawiono na 20 minut. Na koniec zmierzono absorbancję otrzymanego roztworu przy długości fali 540 nm, która była proporcjonalna do liczby żywych komórek. Dla kompleksu cis-PtCl<sub>2</sub>PS<sub>2</sub> badania komórkowe wykazały znacznie wyższą cytotoksyczność formy cis-PtCl<sub>2</sub>(*trans*-PS)<sub>2</sub> niż formy cis-PtCl<sub>2</sub>(*cis*-PS)<sub>2</sub> po 46 h w stężeniu 1,06·10<sup>-5</sup> M do mysich komórek czerniaka (B16-F10) (Fig. 13). Co ważne, różnica w żywotności komórek dla obu fotoizomerów kompleksu wzrastała z czasem, pomimo faktu, że mniej toksyczny fotoizomer cis-PtCl<sub>2</sub>(*cis*-PS)<sub>2</sub> ulegał stopniowo termicznej przemianie w bardziej toksyczny cis-PtCl<sub>2</sub>(*trans*-PS)<sub>2</sub>.

Badania *in vitro* wskazują, że niespodziewanie forma cis-PtCl<sub>2</sub>(*trans*-PS)<sub>2</sub> kompleksu jest znacznie bardziej toksyczna niż forma kompleksu cis-PtCl<sub>2</sub>(*cis*-PS)<sub>2</sub>. Oznacza to, że możliwym stanie się miejscowe zwiększanie toksyczności kompleksu podawanego w formie cis-PtCl<sub>2</sub>(*cis*-PS)<sub>2</sub> poprzez naświetlanie światłem o długości fali 530 nm, w wyniku czego następuje konwersja do bardziej toksycznej formy cis-PtCl<sub>2</sub>(*trans*-PS)<sub>2</sub> lub miejscowe zmniejszenie toksyczności kompleksu podawanego w postaci cis-PtCl<sub>2</sub>(*trans*-PS)<sub>2</sub> poprzez naświetlanie światłem o długości fali 400 nm, co skutkuje przekształceniem w mniej toksyczną formę cis-PtCl<sub>2</sub>(*cis*-PS)<sub>2</sub>.

#### Literatura

1. X. Shi, C. Y. Zhang, J. Gao, Z. Wang, Recent advances in photodynamic therapy for cancer and infectious diseases. Wiley Interdiscip. Rev. Nanomedicine Nanobiotechnology. 11, 1–23 (2019).
2. J. Broichhagen, J. A. Frank, D. Trauner, A Roadmap to Success in Photopharmacology. Acc. Chem. Res. 48,1947–1960 (2015).
3. H. Bouas-Laurent, H. Dürr, Organic photochromism. Pure Appl. Chem. 73, 639–665 (2001).
4. M. Banghart, K. Borges, E. Isacoff, D. Trauner, R. H. Kramer, Light-activated ion channels for remote control of neuronal firing. Nat. Neurosci. 7, 1381–1386 (2004).
5. Z.-Y. Zhang, Y. He, Y. Zhou, C. Yu, L. Han, and T. Li, Pyrazolylazophenyl Ether-Based Photoswitches: Facile Synthesis, (Near-)Quantitative Photoconversion, Long Thermal Half-Life, Easy Functionalization, and Versatile Applications in Light-Responsive Systems, Chem. – A Eur. J. 25, 13402–13410 (2019).
6. Y. Kim, J. A. Phillips, H. Liu, H. Kang, W. Tan, Using photons to manipulate enzyme inhibition by an azobenzene-modified nucleic acid probe. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 106, 6489–94 (2009).
7. R. J. Mart, R. K. Allemann, Azobenzene photocontrol of peptides and proteins. Chem. Commun. 52, 12262–12277 (2016).
8. W. Szymański, J. M. Beierle, H. A. V Kistemaker, W. A. Velema, B. L. Feringa, Reversible photocontrol of biological systems by the incorporation of molecular photoswitches. Chem. Rev. 113, 6114–6178 (2013).
9. A. S. Lubbe, W. Szymański, B. L. Feringa, Recent developments in reversible photoregulation of oligonucleotide structure and function. Chem. Soc. Rev. 46, 1052–1079 (2017).
10. W. Szymański, D. Yilmaz, A. Koçer, B. L. Feringa, Bright ion channels and lipid bilayers. Acc. Chem. Res. 46, 2910–2923 (2013).
11. J. Levitz, J. Broichhagen, P. Leippe, D. Konrad, D. Trauner, E. Y. Isacoff, Dual optical control and mechanistic insights into photoswitchable group II and III metabotropic glutamate receptors. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 114, E3546-E3554 (2017).
12. A. Hossion, M. Bio, G. Nkepan, S. G. Awuah, Y. You, Visible light controlled release of anticancer drug through double activation of prodrug. ACS Med. Chem. Lett. 4, 124–127 (2013).

13. J. Broichhagen, T. Podewin, H. Meyer-Berg, Y. Von Ohlen, N. R. Johnston, B. J. Jones, S. R. Bloom, G. A. Rutter, A. Hoffmann-Röder, D. J. Hodson, D. Trauner, Optical Control of Insulin Secretion Using an Incretin Switch. *Angew. Chemie – Int. Ed.* **54**, 15565–15569 (2015).
14. W. Guo, A. E. Hight, J. X. Chen, N. C. Klapoetke, K. E. Hancock, B. G. Shinn-Cunningham, E. S. Boyden, D. J. Lee, D. B. Polley, Hearing the light: Neural and perceptual encoding of optogenetic stimulation in the central auditory pathway. *Sci. Rep.* **5** (2015).
15. I. Tochitsky, M. A. Kienzler, E. Isacoff, R. H. Kramer, Restoring Vision to the Blind with Chemical Photoswitches. *Chem. Rev.* **118**, 10748–10773 (2018).
16. J. Font, M. López-Cano, S. Notartomaso, P. Scarselli, P. Di Pietro, R. Bresoli-Obach, G. Battaglia, F. Malhaire, X. Rovira, J. Catena, J. Giraldo, J.-P. Pin, V. Fernández-Dueñas, C. Goudet, S. Nonell, F. Nicoletti, A. Llebaria, F. Ciruela, Optical control of pain in vivo with a photoactive mGlu5 receptor negative allosteric modulator. *Elife.* **6** (2017).
17. C. E. E. Weston, A. Krämer, F. Colin, Ö. Yildiz, M. G. J. G. J. Baud, F.-J. Meyer-Almes, M. J. J. Fuchter, Toward Photopharmacological Antimicrobial Chemotherapy Using Photoswitchable Amidohydrolase Inhibitors. *ACS Infect. Dis.* **3**, 152–161 (2017).
18. L. Strieker, M. Böckmann, T. M. Kirse, N. L. Doltsinis, B. J. Ravoo, Arylazopyrazole Photoswitches in Aqueous Solution: Substituent Effects, Photophysical Properties, and Host–Guest Chemistry. *Chem. – A Eur. J.* **24**, 8639–8647 (2018).
19. J. D. Harris, M. J. Moran, I. Aprahamian, New molecular switch architectures. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **115**, 9414–9422 (2018).
20. H. V Patel, K. A. Vyas, S. P. Pandey, P. S. Fernandes, Reaction of 2,3,4-pentantrione-3-arylhydrazones with N,N-dimethylhydrazine: Formation of substituted 1H-pyrazoles via demethylation. *Synth. Commun.* **22**, 3081–3087 (1992).
21. C. E. Weston, R. D. Richardson, P. R. Haycock, A. J. P. White, M. J. Fuchter, Arylazopyrazoles: Azoheteroarene photoswitches offering quantitative isomerization and long thermal half-lives. *J. Am. Chem. Soc.* **136**, 11878–11881 (2014).
22. N. Möller, T. Hellwig, L. Strieker, S. Engel, C. Fallnich, B. J. Ravoo, Near-infrared photo-switching of cyclodextrin-guest complexes using lanthanide-doped LiYF<sub>4</sub> upconversion nanoparticles. *Chem. Commun.* **53**, 240–243 (2017).
23. J. Calbo, C. E. Weston, A. J. P. White, H. S. Rzepa, J. Contreras-Garcia, M. J. Fuchter, Tuning azoheteroarene photoswitch performance through heteroaryl design. *J. Am. Chem. Soc.* **139**, 1261–1274 (2017).
24. S. Ludwanowski, M. Ari, K. Parison, S. Kalthoum, P. Straub, N. Pompe, S. Weber, M. Walter, A. Walther, pH Tuning of Water-Soluble Arylazopyrazole Photoswitches. *Chem. – A Eur. J.* (2020).
25. D. T. Nguyen, M. Freitag, C. Gutheil, K. Sotthewes, B. J. Tyler, M. Böckmann, M. Das, F. Schlüter, N. L. Doltsinis, H. F. Arlinghaus, B. J. Ravoo, F. Glorius, An Arylazopyrazole-Based N-Heterocyclic Carbene as a Photoswitch on Gold Surfaces: Light-Switchable Wettability, Work Function, and Conductance. *Angew. Chemie – Int. Ed.* **59**, 13651–13656 (2020).
26. Z.-Y. Zhang, Y. He, Y. Zhou, C. Yu, L. Han, T. Li, Pyrazolylazophenyl Ether-Based Photoswitches: Facile Synthesis, (Near-)Quantitative Photoconversion, Long Thermal Half-Life, Easy Functionalization, and Versatile Applications in Light-Responsive Systems. *Chem. – A Eur. J.* **25**, 13402–13410 (2019).
27. R. Siewertsen, H. Neumann, B. Buchheim-Stehn, R. Herges, C. Näther, F. Renth, F. Temps, Highly efficient reversible Z-E photoisomerization of a bridged azobenzene with visible light through resolved S<sub>1</sub>(nπ\*) absorption bands. *J. Am. Chem. Soc.* **131**, 15594–15595 (2009).
28. A. Ansari, A. Ali, M. Asif, Shamsuzzaman, Review: biologically active pyrazole derivatives. *New J. Chem.* **41**, 16–41 (2016).
29. F. K. Keter, J. Darkwa, Perspective: The potential of pyrazole-based compounds in medicine. *BioMetals.* **25**, 9–21 (2012).
30. S. Kumari, S. Paliwal, R. Chauhan, Synthesis of pyrazole derivatives possessing anticancer activity: Current status. *Synth. Commun.* **44**, 1521–1578 (2014).
31. L. Ding, L. Grehn, E. De Clercq, G. Andrei, R. Snoeck, J. Balzarini, B. Fransson, U. Ragnarsson, Synthesis and antiviral activity of three pyrazole analogues of distamycin A. *Acta Chem. Stand.* **48**, 498–505 (1994).

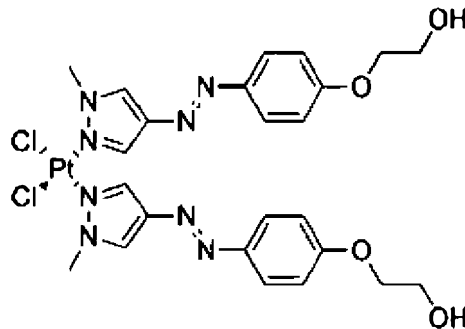
32. A. Kalusalingam, I. Arumugam, R. Velayutham, U. Natarajan, A. J. S. Johnsamuel, P. Promwicit, Synthesis, characterization and anticonvulsant activity of some pyrazole derivatives. J. Glob. Pharma Technol. 3, 25–30 (2011).

33. M. Murahari, V. Mahajan, S. Neeladh, M. S. Kumar, Y. C. Mayur, Ligand based design and synthesis of pyrazole based derivatives as selective COX-2 inhibitors. Bioorg, Chem. 86, 583–597 (2019).

34. R. K. Malik, K. C. Reddy, in Proceedings of the 1999 Beltwide Cotton Conference, January 1999, Orlando, Florida, USA (1999), pp. 1293–1295.

## Zastrzeżenia patentowe

1. Związek o wzorze:



2. Sposób wytwarzania związku określonego w zastrz. 1, **znamienny tym**, że obejmuje następujące etapy:

- a) prowadzi się syntezę fotoprzełącznika, w której do wodnego roztworu 4-amino-1-metylopirazolu dodaje się kwas solny, a następnie schładza się mieszaninę do temperatury 0–5°C, po czym dodaje się roztwór wodny azotynu sodu utrzymując chłodzenie, a następnie dodaje się wodny roztwór fenolu i wodorotlenku zasadowego o temperaturze 0–5°C, po czym do mieszaniny dodaje się wodny roztwór węglanu sodu o temperaturze 0–5°C i kontynuuje się mieszanie przez co najmniej 1 godzinę, utrzymując temperaturę w zakresie 0–5°C, a następnie doprowadza się pH mieszaniny do ~7, a otrzymany osad filtruje się i przemywa wodą,
  - b) otrzymany osad w etapie a) i węglan potasu rozpuszcza się w dimetyloformamidzie, po czym do mieszaniny dodaje się jodek potasu, a następnie wkrapla się 1-bromo-2-etanol i prowadzi się reakcję w temperaturze co najmniej 110°C przez co najmniej 3 godziny, po czym wygasza się reakcję poprzez dodanie wody i miesza się do momentu wykrystalizowania osadu, po czym osad filtruje się i przemywa wodą, a następnie osad rozpuszcza w etanolu i suszy się z nad środka suszącego, po czym otrzymany osad poddaje się chromatografii kolumnowej,
  - c) do wodnego roztworu tetrachloroplatinianu potasu dodaje się oczyszczony osad z etapu b), który uprzednio zawiesza się w etanolu i prowadzi się reakcję przez co najmniej 2 godziny, a następnie do mieszaniny dodaje się kolejną porcję etanolu, po czym prowadzi się mieszanie przez co najmniej 46 godzin, a następnie odparowuje się etanol, zaś otrzymany osad przemywa się eterem dietylowym, po czym osad poddaje się suszeniu przez co najmniej 20 godzin.
3. Związek określony w zastrz. 1 lub wytworzony sposobem określonym w zastrz. 2 do stosowania w medycynie, zwłaszcza w terapii antynowotworowej.

## Rysunki

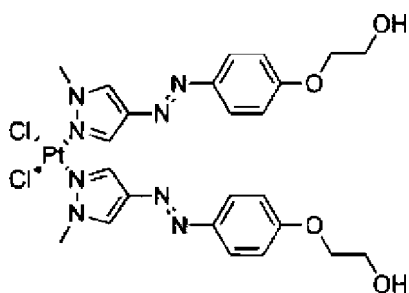


Fig. 1

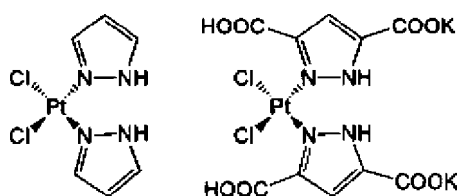


Fig. 2

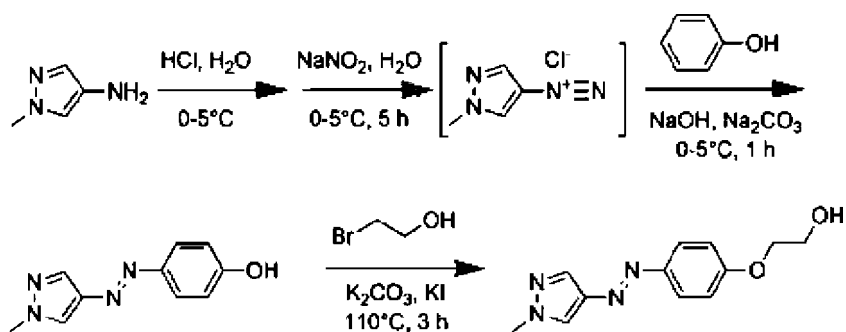


Fig. 3

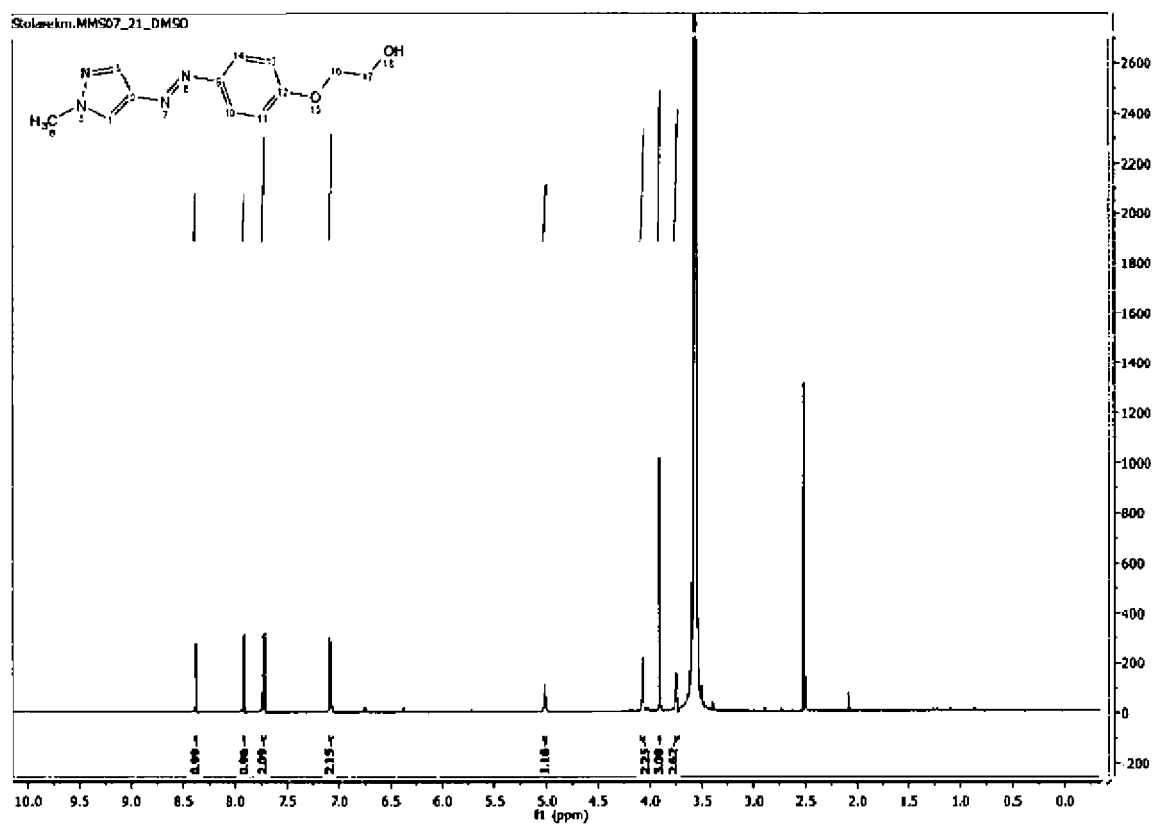


Fig. 4

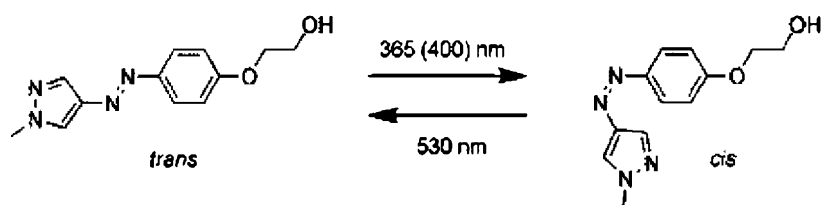


Fig. 5

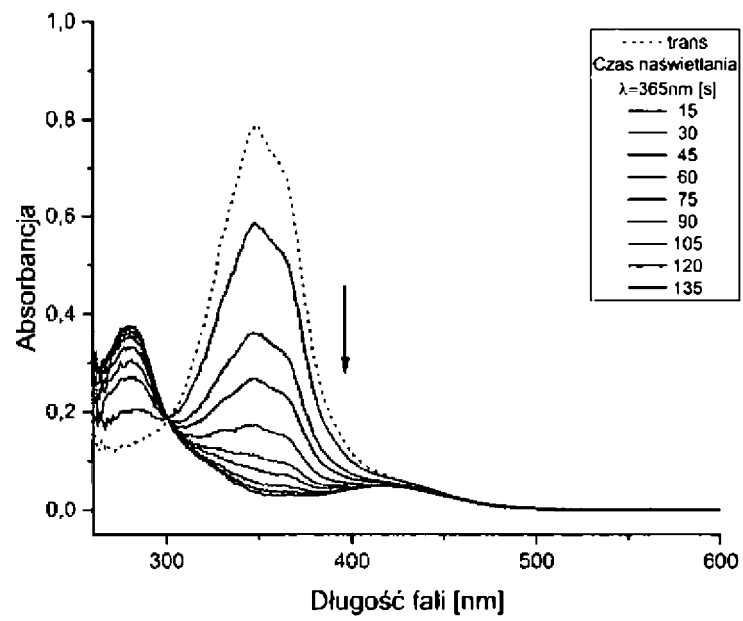


Fig. 6

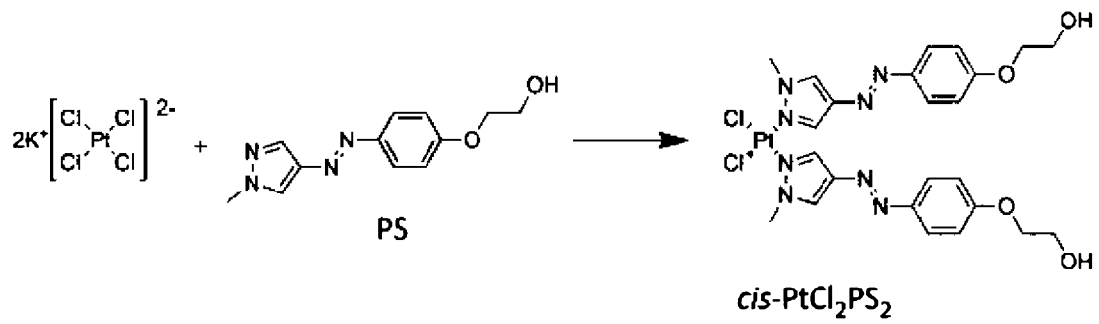


Fig. 7

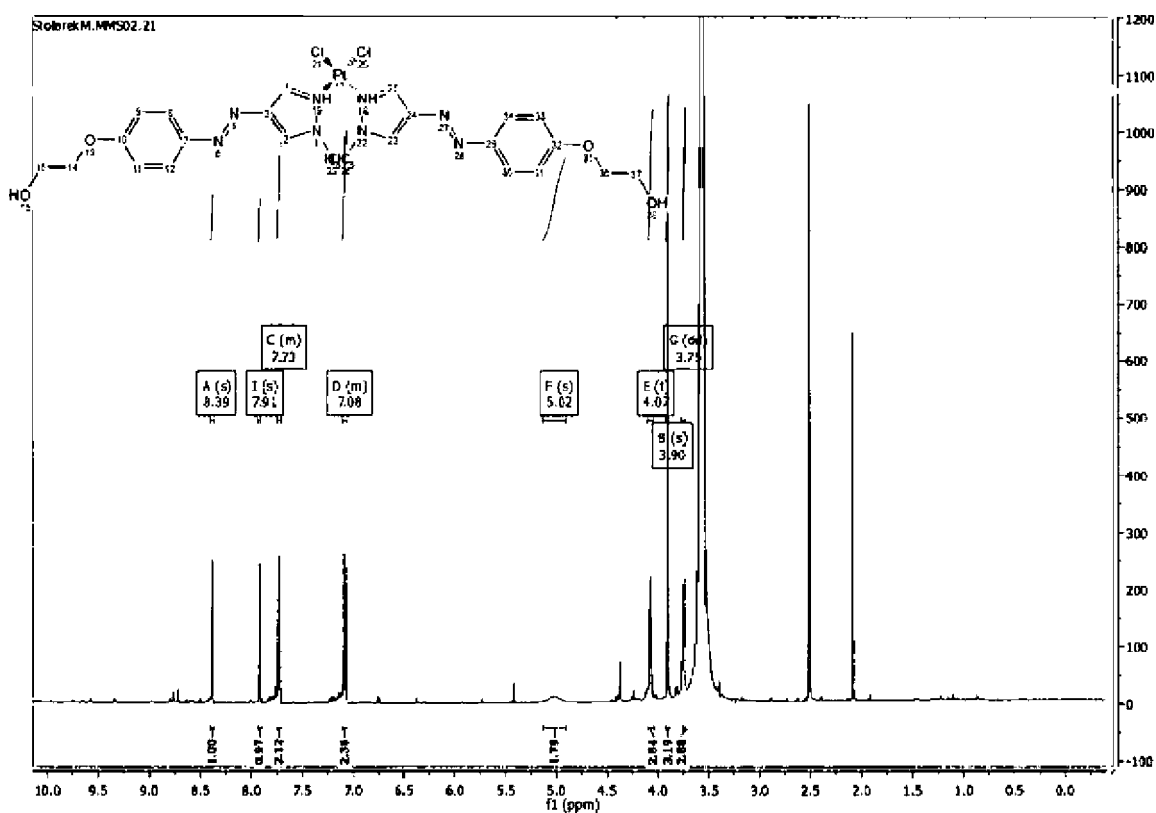


Fig. 8

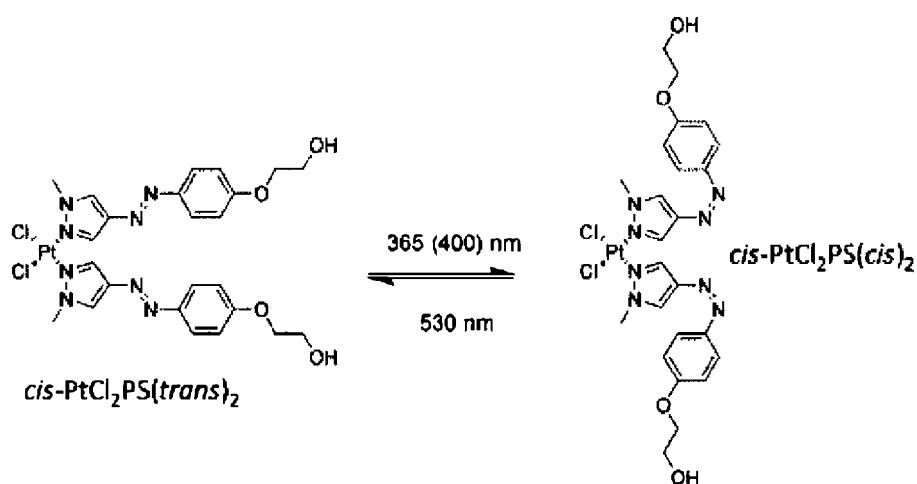


Fig. 9

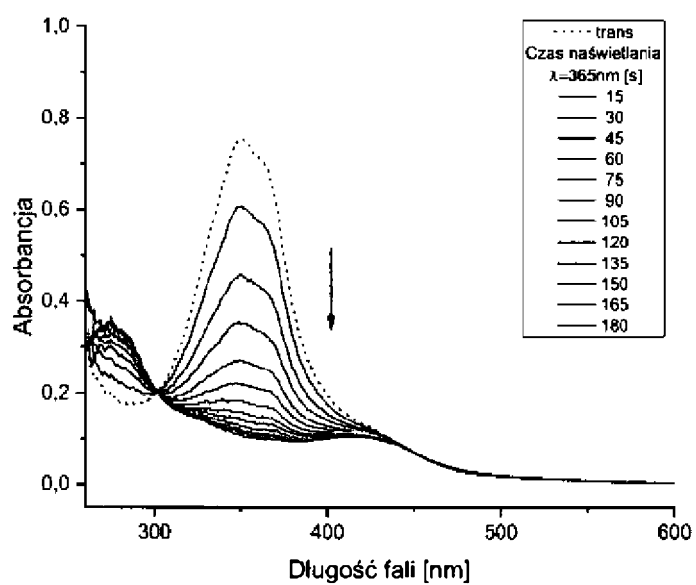


Fig. 10

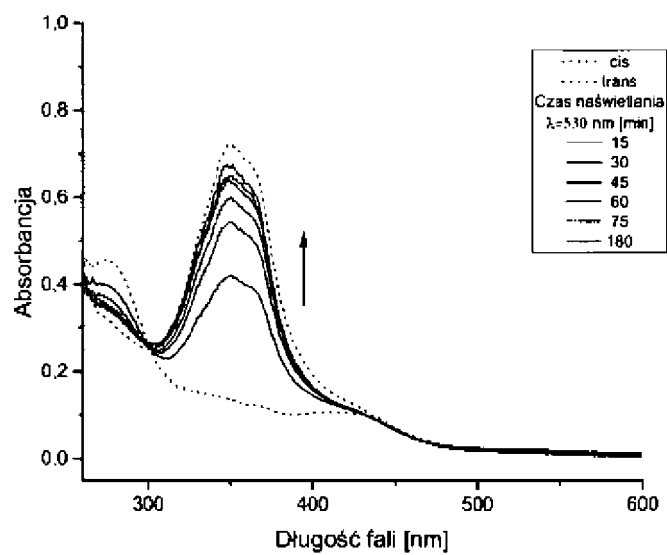


Fig. 11

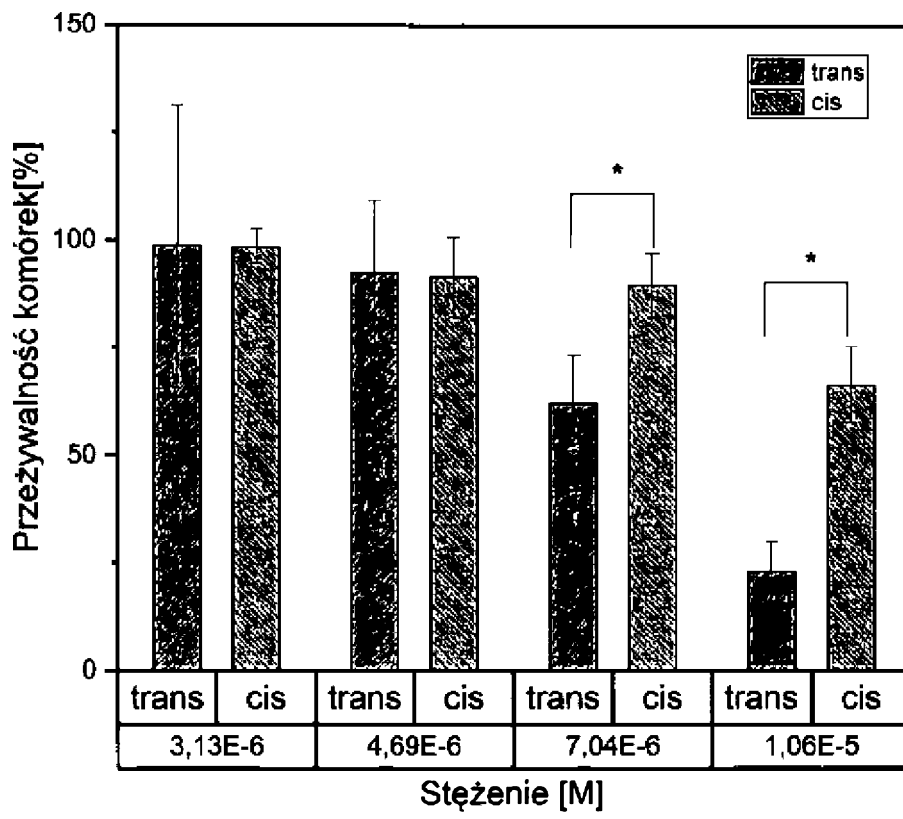


Fig. 12

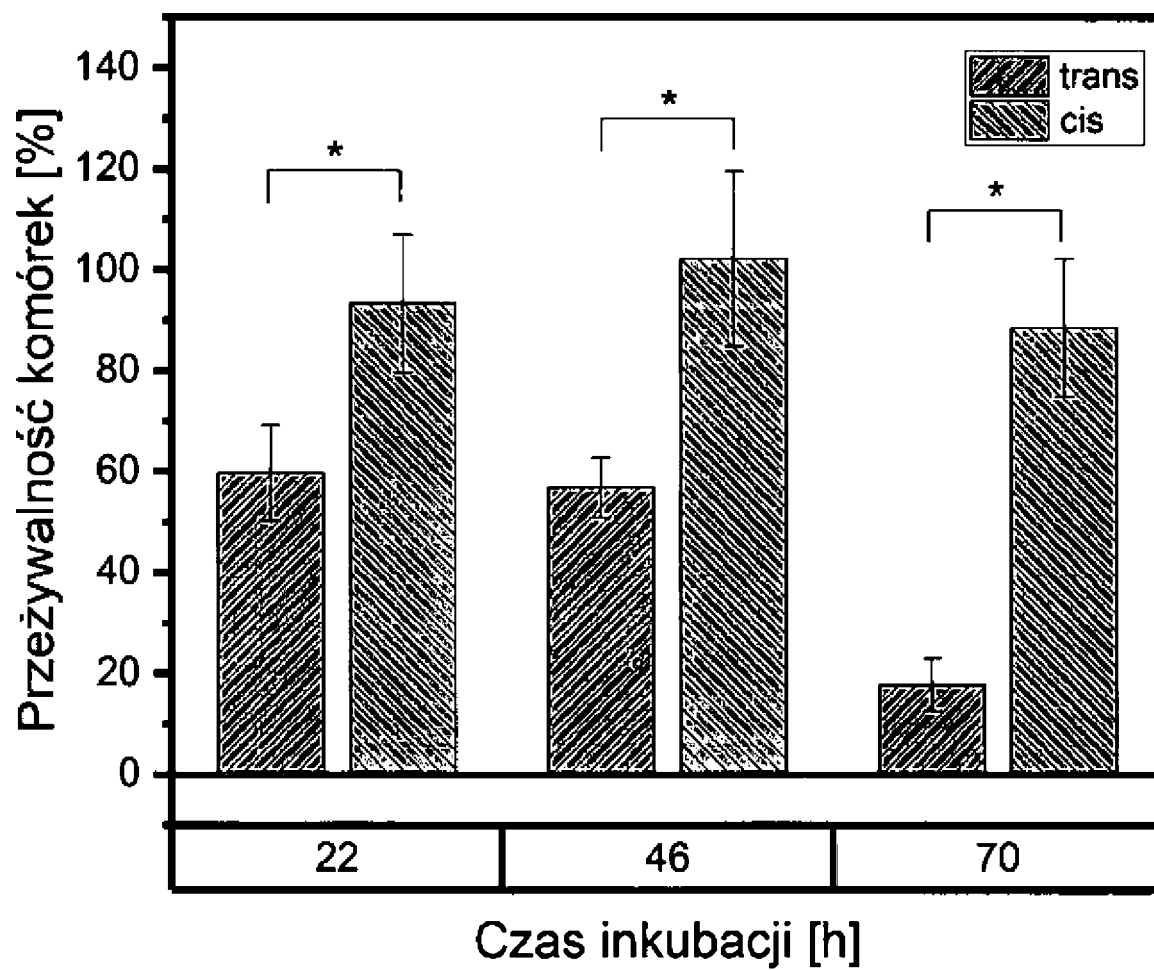


Fig. 13