

PATENTOVÝ SPIS

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLVÉHO
VLASTNICTVÍ

- (21) Číslo přihlášky: **2008-434**
(22) Přihlášeno: **10.07.2008**
(40) Zveřejněno: **09.12.2009**
(Věstník č. 49/2009)
(47) Uděleno: **02.11.2009**
(24) Oznámení o udělení ve Věstníku: **09.12.2009**
(Věstník č. 49/2009)

(11) Číslo dokumentu:

301 216

(13) Druh dokumentu: **B6**

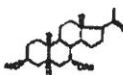
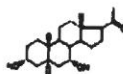
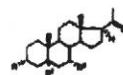
(51) Int. Cl.:

C07J 5/00 (2006.01)
C07J 7/00 (2006.01)
C07J 75/00 (2006.01)
A61K 31/57 (2006.01)
A61P 25/16 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)
A61P 25/08 (2006.01)
A61P 25/18 (2006.01)
A61P 25/30 (2006.01)

- (56) Relevantní dokumenty:
US 2003/0060425 A1; WO 02/00224 A; WO 01/49280 A.

- (73) Majitel patentu:
Ústav organické chemie a biochemie Akademie věd ČR,
v. v. i., Praha 6, CZ

- (72) Původce:
Šťastná Eva Mgr., Přerov, CZ
Chodounská Hana RNDr. CSc., Praha 6, CZ
Pouzar Vladimír RNDr. DrSc., Praha 4, CZ
Kaprás Vojtěch Bc., Praha 7, CZ
Cais Oldřich Ing., Praha 6, CZ
Vyklícký Ladislav MUDr. DrSc., Kamenice, CZ
Kohout Ladislav RNDr. DrSc., Praha 6, CZ



- (54) Název vynálezu:
Pregnanové anionické sloučeniny, způsob jejich výroby a jejich použití

- (57) Anotace:
Pregnanové anionické sloučeniny obecného vzorce I, kde R^1 znamená esterovou skupinu obecného vzorce R^4O- , která je schopna tvořit ion, kde R^4 znamená skupinu HSO_3- , pyridin- SO_3- , $HOOC-(CH_2)_2-CO-$, R^2 znamená atom vodíku v konfiguraci alfa nebo beta, R^3 znamená esterovou skupinu obecného vzorce R^5-COO- , kde R^5 znamená CH_3- , nebo C_2H_4N- , a jejich farmaceuticky použitelné soli. Sloučeniny obecného vzorce I se připraví ze sloučeniny vzorce II nebo sloučeniny vzorce VIII. Sloučeniny obecného vzorce I se používají pro výrobu farmaceutického prostředku pro léčení neurologických a psychiatrických onemocnění a stavů spojených s nadměrnou aktivací NMDA receptorů jakými jsou neuroprotektiva proti excitotoxickému poškození centrálního nervového systému (CNS), stavy spojené s nadměrnou aktivací NMDA podtypu glutamátových receptorů nebo tam, kde se tento typ receptoru podílí na vzniku nebo průběhu některých duševních a neurologických onemocnění, zvláště jde o traumatické a hypoxické poškození nervové tkáně při chorobách centrální nervové soustavy, jako jsou např. Alzheimerova, Huntingtonova a Parkinsonova choroba, dále při kognitivních poruchách vznikajících ve stáří, dalšími indikacemi jsou tardivní dyskineze, amyotrofická laterální skleróza, olivopontocerebelární degenerace, neurologické obtíže spojené s AIDS infekcí, alergická encefalomyelitida, a pro medikaci epilepsie, úzkosti, deprese, schizofrenie, chronické bolesti i lékové závislosti.

CZ 301216 B6

Pregnanové anionické sloučeniny, způsob jejich výroby a jejich použití

Oblast techniky

5

Vynález se týká pregnanových anionických sloučenin a způsobu jejich výroby. Dále se týká farmaceutických prostředků, které obsahují tyto anionické steroidní sloučeniny, a jejich použití jako neuroprotektiv proti excitotoxickému poškození centrálního nervového systému (CNS), stavů spojených s nadměrnou aktivací NMDA podtypu glutamátových receptorů nebo kde se tento typ receptoru podílí na vzniku nebo průběhu některých duševních a neurologických onemocnění. Jedná se především o traumatické a hypoxické poškození nervové tkáně při chorobách centrální nervové soustavy, jako jsou např. Alzheimerova, Huntingtonova a Parkinsonova choroba, dále také při kognitivních poruchách vznikajících ve stáří. Dalšími indikacemi by mohly být tardivní dyskineze, amyotrofická laterální skleróza, olivopontocerebelární degenerace, neurologické obtíže spojené s AIDS infekcí, alergická encefalomyelitida, a pro medikaci epilepsie, úzkosti, deprese, schizofrenie, chronické bolesti i lékové závislosti.

10

15

Dosavadní stav techniky

20

Neurony jsou součástí systému, který adekvátní reakcí na nejrůznější podněty chrání stabilitu organismu. Nepostradatelnou součástí aktivity neuronů je obvykle excitace, ale za určitých podmínek může být zejména nadměrná excitace pro neurony škodlivá. Takový stav, označovaný jako excitotoxicita, může vést k symptomům charakteristickým pro závažná onemocnění nervového systému, jako jsou Alzheimerova, Huntingtonova nebo Parkinsonova choroba. Uvedené choroby začínají být vážným a stále rostoucím problémem zejména pro stárnoucí populaci. Léky pro prevenci a péči o nemocné jsou naléhavě potřeba. Jedním z cílů, kde lze proti zmíněným chorobám zasahovat, je NMDA receptor. Jde o iontový kanál aktivovaný kyselinou glutamovou, přítomný ve všech oblastech mozku a míchy.

25

30

Medikace patologických stavů, jako je kraniocerebrální poranění, mozková mrtvice a další neurologické stavy spojené s excitotoxicitou, je v současné době předmětem intenzivního výzkumu. Dosud neexistují spolehlivé preparáty ani jednoznačně určené aktivní látky použitelné jako univerzální léčiva. V roce 2006 byla neúspěšně ukončena 3. fáze klinického výzkumu NXY-059 (disufenton disodný; Chacon M.R., Jensen M.B., Sattin J.A., Zivin J.A.: Neuroprotection in cerebral ischemia: emphasis of SAINT trial, *Curr. Cardiol. Rep.* 2008, 10, 37 až 42), slibné látky pro vylepšení šancí na přežití a zmenšení následků po mozkové příhodě. Pro léčbu raných stadií Alzheimerovy choroby se používá memantin s diskutabilní terapeutickou využitelností. Využití látek, které prokázaly velmi dobré neuroprotektivní působení na excitotoxicitu vyvolanou nadměrnou aktivací NMDA receptorů, a to jak v *in vitro* testech, tak v animálních studiích, jako léčiv brání to, že jejich aplikace způsobuje v některých případech závažné psychické obtíže (časté jsou psychózy). Tato skupina látek je představovaná např. ketaminem.

35

40

Neurosteroidy jsou látky, které vznikají v nervové tkáni z cholesterolu nebo ze steroidních prekurzorů z periferních zdrojů (Baulieu EE. Neurosteroids: a novel function of the brain. *Psychoneuroendocrinology* 1998; 23, 963 až 87). Působí na membránových receptorech pro neuropřenašeče (např. γ -aminomáselná kyselina (GABA) a *N*-metyl-D-aspartát (NMDA)). Schopnost neurosteroidů ovlivnit neuronální excitabilitu prostřednictvím modulace aktivity iontových kanálů (Paul SM, Purdy RH. Neuroactive steroids. *Faseb J* 1992; 6, 2311 až 22; Biggio G, Concas A, Costa E. Steroid modulation of amino acid neurotransmitter receptors. v: Farb DH, Gibbs TT, Wu FS, Gyenes M, Friedman L, Russek SJ. *GABAergic Synaptic Transmission: Molecular, Pharmacological, and Clinical Aspects*, New York: Raven Press; 1999, str. 119 až 131) hraje klíčovou roli v etiologii duševních procesů, jako jsou např. učení (Tsien JZ, Huerta PT, Tonegawa S. The essential role of hippocampal CA1 NMDA receptor-dependent synaptic plasticity in spatial memory. *Cell* 1996; 87, 1327 až 38), stárnutí (Vallee M, Mayo W,

50

55

Damaudery M, Corpechot C, Young J, Koehl M, a spol. Neurosteroids: deficient cognitive performance in aged rats depends on low pregnenolone sulfate levels in the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94, 14865 až 70), stres (Grobin AC, Roth HR, Deutch AY. Regulation of the prefrontal cortical dopamine system by the neuroactive steroid $3\alpha,21$ -dihydroxy- 5α -pregnane-20-one. *Brain Res* 1992; 578, 351 až 56,) atd., a také v řadě neurologických a psychiatrických poruch, např. u Alzheimerovy choroby (Nasman B, Olsson T, Backstrom T, Eriksson S, Grankvist K, Viitanen M, et al. Serum dehydroepiandrosterone sulfate in Alzheimer's disease and in multi-infarct dementia. *Biol Psychiatry* 1991; 30, 684 až 90) a epilepsie (Gasior M, Carter RB, Witkin JM. Neuroactive steroids: potential therapeutic use in neurological and psychiatric disorders. *Trends in Pharmacol Sci* 1999; 20, 107–112.) atd.

Nalezení vazebného místa pro neurosteroidy a rozklíčování molekulárního mechanismu účinku představují v současné době základní pilíře pro design a vývoj nových terapeutik. Mechanismus účinku neurosteroidů na ligandem aktivované iontové kanály nebyl doposud zcela objasněn. Je známo, že neurosteroidy mění pravděpodobnost otevření příslušného iontového kanálu (Twyman RE, Macdonald RL. Neurosteroid regulation of GABA(A) receptor single channel kinetic properties of mouse spinal-cord neurons in culture. *J Physiol* 1992; 456, 215–45; Callachan H, Cottrell GA, Hather NY, Lambert JJ, Nooney JM, Peters JA. Modulation of the GABA-A receptor by progesterone metabolites. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 1987; 231, 359–369).

Současný výzkum se také intenzivně věnuje rozpoznání vazebných míst neurosteroidů, která dosud nebyla jednoznačně identifikována ani pro GABA, ani pro NMDA receptor. Výsledky současných studií naznačují, že neurosteroidy mají své vlastní vazebné místo, které je nezávislé na vazebných místech pro příslušné agonisty nebo allosterické modulátory (Park-Chung M, Wu FS, Purdy RH, Malayev AA, Gibbs TT, Farb DH. Distinct sites for inverse modulation of N-methyl-D-aspartate receptors by sulfated steroids. *Mol Pharmacol* 1997; 52, 1113–23; Akk G, Bracamontes JR, Covey DF, Evers A, Dao T, Steinbach JH. Neuroactive steroids have multiple actions to potentiate GABAA receptors *J Physiol* 2004; 558, 59–74.).

Povědomí o vazebném místě neurosteroidu na NMDA receptoru není tak obsáhlé jako poznatky o vazebném místě na GABA receptoru, nicméně již bylo prokázáno, že steroidy působí extracelulárně (Park-Chung M, Wu FS, Farb DH. 3α -Hydroxy- 5β -pregnan-20-one sulfate: a negative modulator of the NMDA-induced current in cultured neurons. *Mol Pharmacol* 1994; 46, 1 46–50; Horak M, Vlcek K, Chodounska H, Vyklicky L. Subtype-dependence of N-methyl-D-aspartate receptor modulation by pregnenolone sulfate. *Neuroscience* 2006; 137, 93–102.). Pokusy s chimérickými receptory rovněž objasnily klíčový význam extracelulární smyčky mezi třetí a čtvrtou transmembránovou doménou NR2 podjednotky v mechanismech potenciačního a inhibičního účinku pregnenolonsulfátu a $3\alpha,5\beta$ -pregnanolonsulfátu (Horak M, Vlcek K, Chodounska H, Vyklicky L. Subtype-dependence of N-methyl-D-aspartate receptor modulation by pregnenolone sulfate. *Neuroscience* 2006; 137, 93–102; Petrovic M, Sedlacek M, Horak, Chodounska H, Vyklicky L. 20 -Oxo- 5β -pregnan- 3α -yl sulfate is a use-dependent NMDA receptor inhibitor. *J Neurosci* 2005; 25, 8439–50.).

Je zřejmé, že mnoho dalších aspektů může ovlivňovat vlastnosti receptoru a následnou vazbu neurosteroidu na NMDA receptor; stereochemie substrátu by měla být zmíněna na prvním místě. Strukturně-aktivitní studie shrnují základní strukturní rysy nezbytné pro účinnost neurosteroidů: přítomnost sulfátové skupiny v poloze C3 a ketoskupina v poloze C20 (Cais O, Vyklicky L. *Psychiatry Suppl* 2006; 10, 8–11). Sulfátová skupina v poloze C3 může příp. být nahrazena hemisukcinátovou, hemiglutarátovou či hemioxalátovou, aniž by došlo ke ztrátě funkce steroidu, což naznačuje, že klíčová je přítomnost skupiny nesoucí záporný náboj (Park-Chung M, Wu FS, Purdy RH, Malayev AA, Gibbs TT, Farb DH. Distinct sites for inverse modulation of N-methyl-D-aspartate receptors by sulfated steroids. *Mol Pharmacol* 1997; 52, 1113–23; Weaver CE, Land MB, Purdy RH, Richards KG, Gibbs TT, Farb DH. Geometry and charge determine pharmacological effects of steroids on N-methyl-D-aspartate receptor-induced Ca^{2+} accumulation and cell death. *J Pharmacol Exp Ther* 2000; 293, 747–54).

Řada preklinických studií dokládá výraznou schopnost NMDA antagonistů zabránit výlevu glutamátu a tím omezit narušení funkcí CNS. Nicméně jejich neuroprotektivní potenciál je z klinického pohledu malý. Vzhledem k faktu, že NMDA receptory jsou jedním z nejrozšířenějších typů receptorů v CNS, vede podání NMDA antagonistů k řadě závažných nežádoucích účinků, od narušení motoriky po indukci psychóz schizofrenního typu. Na druhou stranu rozdílné podjednotkové složení NMDA receptorů na presynaptickém a postsynaptickém elementu, na různých typech nervových buněk i v různých částech mozku nabízí možnost hledat látky selektivně ovlivňující pouze určitou podmnožinu NMDA receptorů, a tím omezit výskyt neočekávaných a nežádoucích účinků při zachování neuroprotektivního působení. Ve spisu US 2003/0069425 je popsána příprava a aktivita hemiskucinátu 16 α -brom-3 β -hydroxy-5 α -androstan-17-*on*u, kde se tvrdí, že zlepšuje imunitu, což může zmírnit příznaky četných nemocí a poruch.

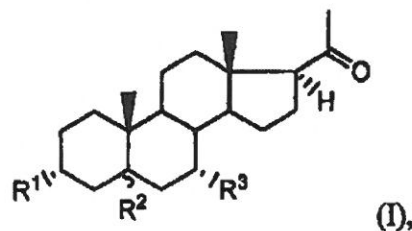
Steroidní deriváty, přestože je dlouho známa jejich neuroaktivita, v současné době po vyřazení alfaxolonu z lékařské praxe, pro medikaci zatím využívány nejsou. Cílem autorů předloženého vynálezu jsou neuroaktivní sloučeniny na bázi anionických sloučenin, které mají vysoký index selektivity a efektivity, tzn. jsou méně toxické, avšak účinnější než dříve známá analoga.

Autoři předloženého vynálezu zahájili proto vývoj a testování nových NMDA antagonistů odvozených od neurosteroidů. Během tohoto studia zjistili, že nově syntetizované látky vykazují afinitu k extrasynaptickým NMDA receptorům. Co je však ještě důležitější, elektrofyziologické studie ukázaly, že tento typ látek se váže pouze na dlouhodobě otevřené NMDA receptory. Předpokládáný neuroprotektivní mechanismus účinku je tedy blokování nadměrného vtoku vápníku do buňky prostřednictvím dlouho otevřených NMDA receptorů.

Během uvedených studií byly syntetizovány nové pregnanové deriváty, které inhibují NMDA receptor a mohou být tedy užitečné pro léčení onemocnění CNS, jako jsou kognitivní poruchy při stárnutí, Alzheimerova choroba, cévní mozková příhoda, Parkinsonova choroba, Huntingtonova choroba a další onemocnění a poruchy vzniklé v důsledku nadměrné aktivace NMDA receptorů.

Podstata vynálezu

Předmětem vynálezu jsou nové pregnanové anionické sloučeniny obecného vzorce I



v němž

R¹ znamená esterovou skupinu obecného vzorce R⁴O⁻, která je schopna tvořit ion, kde

R⁴ znamená skupinu HSO₃⁻, pyridin-SO₃, HOOC-(CH₂)₂-CO⁻ apod.,

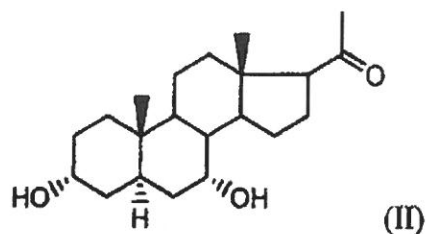
R² znamená atom vodíku s konfigurací alfa nebo beta a

R³ znamená esterovou skupinu obecného vzorce R⁵OO⁻, kde R⁵ znamená CH₃⁻ nebo

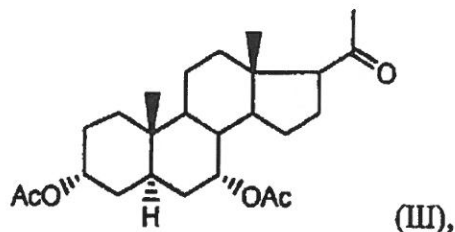
C₅H₄N⁻, jako je acetoxy skupina, nikotinyloxyskupina apod.,

a jejich farmaceuticky použitelné soli.

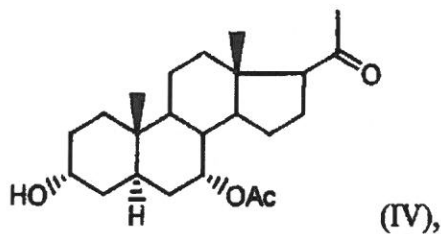
Tento vynález zahrnuje také způsob výroby sloučenin obecného vzorce I, v němž R² znamená atom vodíku s konfigurací alfa a R¹ a R³ znamenají jak shora uvedeno, podle kterého se sloučenina vzorce II



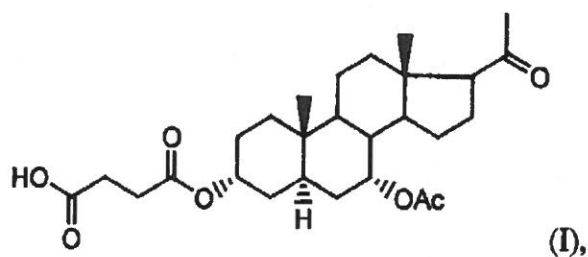
převeďte na 3,7-dichráněný derivát, s výhodou diacetát vzorce III



- 5 který se parciální hydrolyzou, s výhodou působením hydroxidu alkalického kovu, jako je hydroxid draselný, sodný nebo lithný, nebo kyseliny, jako je kyselina chlorovodíková, chloristá apod., ve vhodném rozpouštědle, jako je alkohol, vodný alkohol, nebo ve směsi rozpouštědel, s výhodou ve směsi methanolu s benzenem, převede na monoester vzorce IV

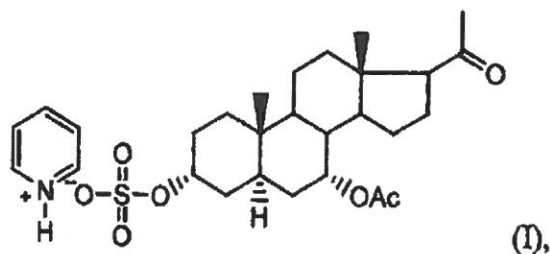


- 10 z něhož se působením anhydridu kyseliny jantarové v pyridinu za přítomnosti DMAP připraví příslušný ester, s výhodou hemisukcinát vzorce I

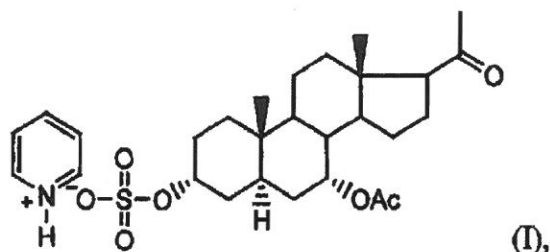


v němž R^1 znamená hemisukcinátovou skupinu, R^2 znamená atom vodíku v alfa poloze a R^3 znamená acetoxyskupinu,

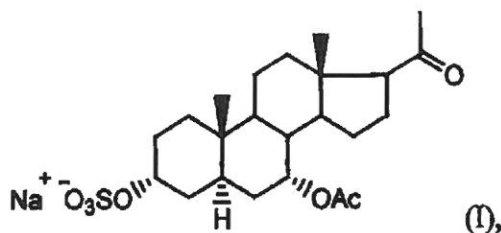
- 15 nebo reakcí komplexu pyridinu-oxid sírový v inertním rozpouštědle, s výhodou v chloroformu, pyridiniumsulfát vzorce I



v němž R^1 znamená pyridiniumsulfátovou skupinu, R^2 znamená atom vodíku v alfa poloze a R^3 znamená acetoxyskupinu. Popřípadě se posledně uvedená sloučenina vzorce I



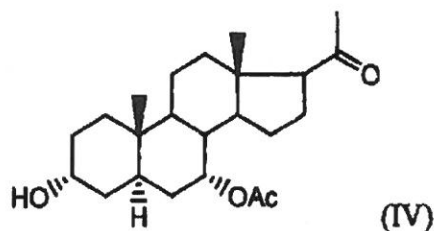
- 5 v němž R^1 znamená pyridiniumsulfátovou skupinu, R^2 znamená atom vodíku v alfa poloze a R^3 znamená acetoxyskupinu, může reakcí s hydroxidem alkalického kovu, s výhodou hydroxidem sodným, v alkoholu, s výhodou v methanolu, převést na sloučeninu obecného vzorce



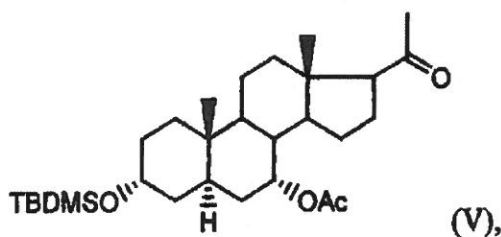
v němž R^1 znamená sodnou sůl sulfátu, R^2 znamená atom vodíku v alfa poloze a R^3 znamená acetoxyskupinu.

10

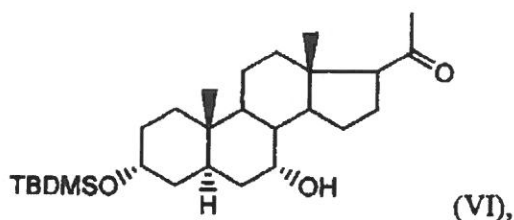
Sloučenina obecného vzorce I, v němž R^1 znamená pyridiniumsulfát, R^2 znamená atom vodíku v alfa poloze a R^3 znamená nikotinyloxyskupinu, se vyrobí tak, že se sloučenina obecného vzorce IV



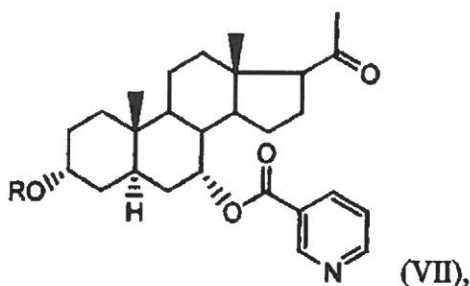
- 15 převede reakcí s *tert*-butyldimethylsilylchloridem a imidazolem ve vhodném rozpouštědle, s výhodou v DMF, na *tert*-butyldimethylsilylderivát vzorce V



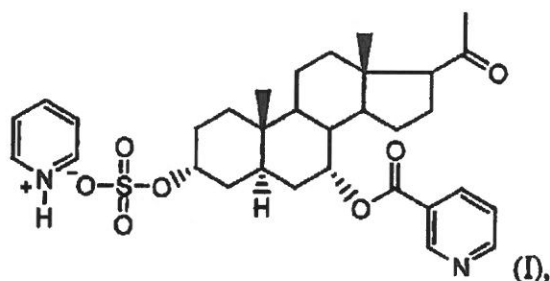
který obvyklým zmýdelněním acetátové skupiny v poloze 7, s výhodou hydroxidem draselným ve směsi ethanolu a benzenu za zvýšené teploty, poskytl sloučeninu vzorce VI



která se esterifikuje nikotinoylchloridem v pyridinu za přítomnosti DMAP za vzniku nikotinyloxyderivátu vzorce VII

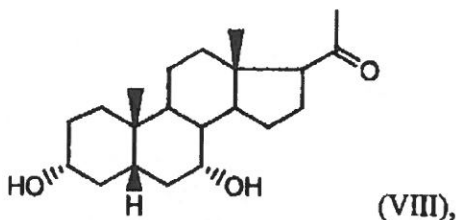


- 5 v němž R znamená TBDMS, a ta působením *p*-toluensulfonové kyseliny v methanolu poskytnete sloučeninu vzorce VII, v němž R znamená atom vodíku, která pak působením komplexu pyridinu s oxidem sírovým ve vhodném nereagujícím rozpouštědle, s výhodou v chloroformu, poskytnete sloučeninu obecného vzorce I



- 10 v němž R¹ znamená sodnou sůl pyridiniumsulfátu, R² znamená atom vodíku v alfa poloze a R³ znamená nikotinyloxyskupinu.

Podobným sledem reakcí se mohou vyrábět sloučeniny obecného vzorce I, v nichž R² znamená atom vodíku s konfigurací beta, ze sloučeniny vzorce VIII



15

která se od sloučeniny vzorce II liší pouze konfigurací atomu vodíku v poloze 5.

Podobným sledem reakcí, jako je shora uvedeno, se tak vyrobí následující sloučeniny obecného vzorce I:

20

- 20-Oxo-5 α -pregnan-3 α ,7 α -diyl 3-hemisukcinát 7-acetát,
- 20-Oxo-5 α -pregnan-3 α ,7 α -diyl 3-sulfát 7-acetát pyridiniová sůl,
- 20-Oxo-5 α -pregnan-3 α ,7 α -diyl 3-sulfát 7-acetát sodná sůl,
- 20-Oxo-5 α -pregnan-3 α ,7 α -diyl 3-sulfát 7-nikotínát pyridiniová sůl,

20-Oxo-5 β -pregnan-3 α ,7 α -diyl 3-hemisukcinát 7-acetát,
 20-Oxo-5 β -pregnan-3 α ,7 α -diyl 3-sulfát 7-acetát pyridiniová sůl,
 20-Oxo-5 β -pregnan-3 α ,7 α -diyl 3-sulfát 7-acetát sodná sůl a
 20-Oxo-5 β -pregnan-3 α ,7 α -diyl 3-sulfát 7-nikotinát pyridiniová sůl.

5

Předmětem tohoto vynálezu je rovněž použití sloučenin obecného vzorce I jako neuroprotektiv při traumatickém poranění mozku, míchy, cévní mozkové příhodě, při chorobách centrální nervové soustavy, jako jsou např. Alzheimerova, Huntingtonova a Parkinsonova choroba, dále také při prevenci onemocnění CNS a pro medikaci stavů spojených s excitotoxicitou. Indikací by mohla být prevence nebo zpomalení nástupu neurodegenerace u Alzheimerovy choroby, důsledky mozkové příhody, traumatické poškození mozku, Parkinsonova choroba, tardivní dyskineze, Huntingtonova choroba, amyotrofická laterální skleróza, olivopontocerebellární degeneraci, AIDS, alergickou encefalomyelitidu, a pro medikaci epilepsie, anxiety, deprese, schizofrenie, chronické bolesti i lékové závislosti.

10

15

Předmětem vynálezu jsou také farmaceutické přípravky, které jako účinnou složku zahrnují shora uvedené sloučeniny obecného vzorce I, v něm R¹, R² a R³ znamenají jak shora uvedeno nebo jejich substituované analogy buď samotné, nebo v kombinaci spolu s jakýmkoliv farmaceuticky přijatelným nosičem, ředidlem či adjuvans.

20

25

Pregnanolonsulfát a jeho homology vykazují příznivou roli v různých modelech onemocnění člověka, jako jsou NMDA-indukované epileptické záchvaty, bolest indukovaná formalinem a neuroprotektivní účinek, jak v *in vitro*, tak *in vivo* modelech. Na základě našich zjištění (podrobnosti viz v příkladu 20) se domníváme, že homology pregnanolonsulfátu mohou mít terapeutickou hodnotu při léčení onemocnění centrálního nervového systému člověka.

Následující příklady slouží pouze pro ilustraci uvedených předmětů vynálezu, aniž by se tím jakkoliv omezovaly tento vynález, který je dán rozsahem pouze přiloženými patentovými nároky.

30

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

Syntéza 20-oxo-5 α -pregnan-3 α ,7 α -diyl diacetátu

35

Anhydrid kyseliny octové (0,42 ml, 4,4 mmol) byl přidán k roztoku 20-oxo-5 α -pregnan-3 α ,7 α -diolu (100 mg, 0,3 mmol) v pyridinu (5 ml). Reakční směs byla zahřívána 6 hodin při 50 °C a poté stála ještě 2 dny za laboratorní teploty. Po nalití do směsi led-voda byla reakční směs extrahována ethyl-acetátem, promyta vodným roztokem hydrogenuhličitanu draselného, vodou a sušena. Rozpouštědla byla odpařena a olejovitý odparek čištěn deskovou chromatografií na tenké vrstvě ve směsi rozpouštědel petrolether/acetón (1:1). Byl izolován diacetát uvedený v nadpisu (67 mg, 54 %), t.t. 112 až 114 °C, $[\alpha]_D^{20} + 21,8$ (c 0,363, CHCl₃). IR spektrum (CHCl₃): 1726 (C=O, acetát); 1702 (C=O, keton); 1259, 1241, 1030 (C-O). ¹H NMR (200 MHz): 0,60 (s, 3 H, 3 x H-18); 0,80 (s, 3 H, 3 x H-19); 2,05 (s, 3 H, C(3)-OAc); 2,08 (s, 3 H, C(7)-OAc); 2,12 (s, 3 H, 3 x H-21); 2,54 (t, 1 H, J = 8,8, H-17); 4,92 (q, 1 H, J = 2,9, H-7); 5,03 (m, 1 H, H-3). FAB MS: 399 (12 %, M + Na), 359 (8 %, M + 1 - H₂O), 299 (80 %, M + 1 - H₂O, AcOH). Pro C₂₅H₃₈O₅ vypočteno: C, 71,74; H, 9,15, nalezeno: C, 72,44; H, 9,22.

40

45

Příklad 2

Syntéza 3 α -hydroxy-20-oxo-5 α -pregnan-7 α -yl acetátu

50

K roztoku diacetátu z příkladu 1 (90 mg, 0,22 mmol) v benzenu (10 ml) byl přidán methanolický roztok (1 ml) hydroxidu draselného (15,4 mg, 0,27 mmol). Reakční směs stála za laboratorní teploty přes noc, poté byla nalita do vody a extrahována ethyl-acetátem (50 ml). Organická fáze

byla promyta vodou, sušena a rozpouštědla byla odpařena. Odparek byl čištěn preparativní chromatografií na tenké vrstvě ve směsi rozpouštědel aceton/petrolether (1:1). Byla izolována titulní sloučenina (69 mg, 85 %): t.t. 148 až 150 °C (ether-petrolether), $[\alpha]_D +64,5$ (c 0,346, CHCl₃). IR spektrum (CHCl₃): 3616 (O-H); 1717 (C=O, acetát); 1701 (C=O, keton); 1256 (C-O). ¹H NMR (200 MHz): 0,59 (s, 3 H, 3 x H-18); 0,78 (s, 3 H, 3 x H-19); 2,07 (s, 3 H, OAc); 2,11 (s, 3 H, 3 x H-21); 2,55 (t, 1 H, J = 8,8, H-17); 4,06 (kvintet, 1 H, J = 2,4, H-3); 4,91 (q, 1 H, J = 2,9, H-7). FAB MS: 399 (17 %, M + Na), 317 (8 %, M + 1 - AcOH), 299 (9 %, M + AcOH, H₂O). Pro C₂₃H₃₆O₄ vypočteno: C, 73,37; H, 9,64, nalezeno: C, 74,12; H, 9,87.

10 Příklad 3

20-Oxo-5 α -pregnan-3 α ,7 α -diyl 3-hemisukcinát 7-acetát

Ke směsi látky vyrobené podle příkladu 2 (100 mg, 0,27 mmol) a anhydridu kyseliny jantarové (100 mg, 2 mmol), která byla sušena na vakuu (25 °C, 100 Pa) po dobu 30 minut, byl přidán suchý pyridin (10 ml) a 4-dimethylaminopyridin (20 mg, 0,17 mmol). Reakční směs byla zahřívána 6 hodin při 140 °C. Další anhydrid kyseliny jantarové (200 mg, 4 mmol) a 4-dimethylaminopyridin (20 mg, 0,17 mmol) byly přidány a reakční směs byla míchána 10 hodin při 140 °C. Po nalití do vody byla organická část extrahována ethyl-acetátem (50 ml), vodná fáze znovu extrahována ethyl-acetátem a spojené organické fáze promyty vodou a sušeny. Rozpouštědla byla odpařena a odparek krystalován z horkého ethyl-acetátu za vzniku titulního hemisukcinátu (71 mg, 35 %): t.t. 193 až 195 °C, $[\alpha]_D +43,3$ (c 0,246, CHCl₃). IR spektrum (CHCl₃): 3516 (COOH); 3100 (COOH); 1717 (C=O, acetát); 1701 (C=O, keton); 1379 (CH₃); 1257, 1248 (C-O, acetát). ¹H NMR (200 MHz): 0,60 (s, 3 H, 3 x H-18); 0,80 (s, 3 H, 3 x H-19); 2,08 (s, 3 H, OAc); 2,12 (s, 3 H, 3 x H-21); 2,54 (t, 3 H, J = 8,8, H-17); 2,60-2,71 (m, 4 H, OCH₂CH₂OO); 4,92 (m, 1 H, H-3); 5,06 (q, 1 H, J = 2,4, H-7). FAB MS: 499 (100 %, M + Na), 417 (13 %, M + 1 - AcOH), 299 (55 %, M - AcOH, C₄H₅O₄). Pro C₂₇H₄₀O₇ vypočteno: C, 68,04; H, 8,46, nalezeno: C, 67,83; H, 8,46.

Příklad 4

30 20-Oxo-5 α -pregnan-3 α ,7 α -diyl 3-sulfát 7-acetát pyridiniová sůl

Směs látky vyrobené v příkladu 2 (200 mg, 0,53 mmol) a komplexu pyridin-oxid sírový (400 mg, 2,5 mmol), která byla sušena na vakuu (25 °C, 100 Pa) po dobu 1 hodiny, byla rozpuštěna v suchém chloroformu (10 ml) a pod argonem míchána 4 hodiny za laboratorní teploty. Poté stála reakční směs při teplotě -20 °C přes noc, nerozpuštěný komplex pyridin-oxid sírový zfiltrován a filtrát odpařen. Odparek byl rozpuštěn v absolutním methanolu (1 ml), ke kterému byl přidán absolutní ether (15 ml). Směs byla zahuštěna téměř na polovinu a nechána stát přes noc při -20 °C. Vzniklé krystaly titulního sulfátu, (230 mg, 82 %) byly odsáty a sušeny v exikatoru (nad hydroxidem draselným): t.t. 156 až 160 °C, $[\alpha]_D +29,3$ (c 0,288, CHCl₃). IR spektrum (CHCl₃): 3072 (pyridin); 1716 (C=O, acetát); 1702 (C=O, keton); 1258, 1220 (C-O, acetát); 1258 (S-O). ¹H NMR (400 MHz): 0,59 (s, 3 H, 3 x H-18); 0,80 (s, 3 H, 3 x H-19); 2,06 (s, 3 H, OAc); 2,12 (s, 3 H, 3 x H-21); 2,56 (t, 1 H, J = 9,2, H-17); 4,78 (kvintet, 1 H, J = 2,6, H-3); 4,89 (q, 1 H, J = 2,9, H-7); 7,98 (m, 2 H, H-3 a H-5, pyridinium); 8,48 (tt, 1 H, J₁ = 7,8, J₂ = 1,5, H-4, pyridinium); 8,94 (m, 2 H, H-2 a H-6, pyridinium). ESI MS: 574 (17 %, M + K), 494 (14 %, M + K - pyridinium), 478 (21 %, M + Na - pyridinium), 412 (15 %, M - CH₃CO, pyridinium), 341 (47 %, M + Na - OSO₃C₅H₆N, CH₃CO). C₂₈H₄₁O₇S: vypočteno: C, 62,78; H, 7,71; N, 2,61; S, 5,99, nalezeno: C, 60,92; H, 7,62; N, 2,70; S, 6,73.

Příklad 5

50 20-Oxo-5 α -pregnan-3 α ,7 α -diyl 3-sulfát 7-acetát sodná sůl

K methanolickému roztoku (2 ml) sloučeniny vyrobené podle příkladu 4 (140 mg, 16,1 mmol) byl v průběhu 1 hodiny postupně přikapáván roztok hydroxidu sodného v methanolu (0,9 ml,

0,373 M) do hodnoty pH 8. Po zahuštění roztoku na polovinu byl přidán absolutní ether (10 ml) a směs stála přes noc při -20°C . Vzniklé krystaly titulní sodné soli (86 mg, 68 %) byly odsáty a sušeny v exikátoru (nad hydroxidem draselným): t.t. 162 až 163°C , $[\alpha]_{\text{D}} +29,6$ (c 0,215, CHCl_3). IR spektrum (CHCl_3): 1733, 1717 (C=O, acetát); 1703 (C=O, keton); 1257, 1245, 1198 (C–O, acetát). $^1\text{H NMR}$ (200 MHz): 0,61 (s, 3 H, 3 x H–18); 0,79 (s, 3 H, 3 x H–19); 2,10 (s, 3 H, OAc); 2,11 (s, 3 H, 3 x H–21); 2,54 (t, 1 H, $J = 8,8$, H–17); 4,69 (m, 1 H, H–3); 4,85 (m, 1 H, H–7). ESI MS: 501 (12 %, M + Na), 381 (100 %, M + Na – OSO_3Na). $\text{C}_{23}\text{H}_{33}\text{NO}_7\text{S} + 2\text{H}_2\text{O}$: vypočteno: C, 53,68; H, 7,63; S, 6,23, nalezeno: C, 53,52; H, 7,64; S, 6,11.

Příklad 6

3 α -(*tert*-Butyldimethylsilyloxy)-20-oxo-5 α -pregnan-7 α -yl acetát

Směs titulního alkoholu vyrobeného podle příkladu 2 (528 mg, 1,4 mmol) a imidazolu (570 mg, 8,37 mmol) rozpuštěná v N,N-dimethylformamidu (11 ml) byla ochlazena na 0°C . Poté k ní byl přidán *tert*-butyldimethylsilyl chlorid (528 mg, 3,5 mmol) a reakční směs byla míchána za laboratorní teploty. Po 2 hodinách byla reakční směs extrahována ethyl-acetátem (150 ml), organická fáze promyta roztokem kyseliny citronové, hydrogenuhlíčitanu draselného, vodou a sušena. Po odpaření a krystalizaci z ethyl-acetátu bylo získáno 687 mg (99 %) titulní sloučeniny: t.t. 120 až 121°C , $[\alpha]_{\text{D}} +29,0$ (c 0,369, CHCl_3). IR spektrum (CHCl_3): 2897 ($(\text{CH}_3)_2\text{Si}$); 1715 (C=O, acetát); 1701 (C=O, keton); 1472, 1463 ($(\text{CH}_3)_3\text{C}$); 1258 (C–O, acetát); 1053 (C–Osi). $^1\text{H NMR}$ (200 MHz): 0,02 (s, 6 H, 6 x $(\text{CH}_3)_2\text{Si}$); 0,59 (s, 3 H, 3 x H–18); 0,76 (s, 3 H, 3 x H–19); 0,89 (s, 9 H, $(\text{CH}_3)_3\text{C}$); 2,03 (s, 3 H, OAc); 2,12 (s, 3 H, 3 x H–21); 2,54 (t, 1 H, $J = 8,7$, H–17); 3,97 (kvintet, 1 H, $J = 2,9$, H–3); 4,89 (q, 1 H, $J = 2,4$, H–7). ESI MS: 513 (83 %, M + Na), 457 (20 %, M + Na – $(\text{CH}_3)_3\text{C}$), 353 (42 %, M + Na – $(\text{CH}_3)_3\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{SiO}$, CH_3CO , AcOH). $\text{C}_{29}\text{H}_{50}\text{O}_4\text{Si}$: vypočteno: C, 70,97; H, 10,27, nalezeno: C, 70,49; H, 10,39.

Příklad 7

3 α -(*tert*-Butyldimethylsilyloxy)-7 α -hydroxy-5 α -pregnan-20-on

Roztok titulního acetátu vyrobeného v předchozím příkladu 6 (650 mg, 1,32 mmol) v benzenu (50 ml), ke kterému byl přidán hydroxid draselný v ethanolu (0,89 M, 60 ml) byl zahříván po dobu 16 hodin při teplotě 60°C . Po zreagování veškeré výchozí látky byla reakční směs nalita na vodu a extrahována ethyl-acetátem (80 ml). Organická fáze byla promyta vodou, sušena a rozpouštědla odpařena. Odparek byl krystalován z horkého ethyl-acetátu za vzniku titulní sloučeniny (527 mg, 88 %): t.t. 135 až 140°C , $[\alpha]_{\text{D}} +63,3$ (c 0,232, CHCl_3). IR spektrum (CHCl_3): 3615 (O–H); 1699 (C=O, keton); 1472, 1463 ($(\text{CH}_3)_3\text{C}$); 1253 ($(\text{CH}_3)_2\text{Si}$); 1052 (C–Osi). $^1\text{H NMR}$ (200 MHz): 0,02 (s, 6 H, $(\text{CH}_3)_2\text{Si}$); 0,59 (s, 3 H, 3 x H–18); 0,88 (s, 12 H, 3 x H–19 a $(\text{CH}_3)_3\text{C}$); 2,11 (s, 3 H, 3 x H–21); 2,56 (t, 1 H, $J = 8,8$, H–17); 3,83 (m, 1 H, H–7); 3,98 (m, 1 H, H–3). ESI MS: 919 (100 %, 2M + Na), 471 (50 %, M + Na). $\text{C}_{27}\text{H}_{48}\text{O}_3\text{Si}$: vypočteno: C, 72,26; H, 10,70, nalezeno: C, 72,25; H, 11,11.

Příklad 8

3 α -(*tert*-Butyldimethylsilyloxy)-20-oxo-5 α -pregnan-7 α -yl nikotinát

K roztoku sloučeniny vyrobené v předchozím příkladu (10 mg, 0,09 mmol) v pyridinu (15 ml), který byl předem vychlazen na 0°C , byl přidáván hydrochlorid nikotinoylchloridu (900 mg, 5,0 mmol) po malých dávkách. Reakční směs byla míchána za laboratorní teploty 3 hodiny, nalita do vody (50 ml) a stála 15 hodin při teplotě 5°C . Vysrážený titulní produkt byl odsát a následně sušen v exikátoru (nad hydroxidem draselným) (498 mg, 89 %): t.t. 147 až 151°C , $[\alpha]_{\text{D}} +14,5$ (c 0,391, CHCl_3). IR spektrum (CHCl_3): 2897 ($(\text{CH}_3)_2\text{Si}$); 1714 (C=O, nikotinát); 1703 (C=O, keton); 1286 (C–O, nikotinát); 1053 (C–Osi). $^1\text{H NMR}$ (400 MHz): 0,05 (s, 6 H, $(\text{CH}_3)_2\text{Si}$); 0,64 (s, 3 H, 3 x H–18); 0,72 (s, 9 H, $(\text{CH}_3)_3\text{C}$); 0,83 (s, 3 H, 3 x H–19); 2,11 (s, 3 H, 3 x H–21); 2,51

(t, 1 H, $J = 8,8$, H-17); 3,96 (kvintet, $J = 2,4$, 1 H, H-3); 5,22 (q, 1 H, $J = 2,6$, H-7); 7,40 (ddd, 1 H, $J_1 = 7,8$, $J_2 = 4,8$, $J_3 = 0,7$, H-5, nikotinát); 8,29 (dt, 1 H, $J_1 = 8$, $J_2 = 2$, H-4, nikotinát); 8,79 (dd, 1 H, $J_1 = 4,8$, $J_2 = 1,8$, H-6, nikotinát); 9,25 (m, 1 H, H-2, nikotinát). FAB MS: 554 (36 %, $M + 1$), 496 (8 %, $M - (CH_3)_3C$), 299 (4 %, $M - (CH_3)_3C(CH_3)_2SiO$), $OCOC_6H_4N$), 255 (79 %, $M - (CH_3)_3(CH_3)_2SiO$, $OCOC_6H_4N$, CH_3CO). $C_{33}H_{51}O_4Si$: vypočteno: C, 71,56; H, 9,28; N, 2,53, nalezeno: C, 71,40; H, 9,41; N, 2,25.

Příklad 9

10 3 α -Hydroxy-20-oxo-5 α -pregnan-7 α -yl nikotinát

Sloučenina vyrobená v předchozím příkladu 8 (120 mg, 0,21 mmol) byla rozpuštěna v methanolickeém roztoku kyseliny *p*-toluensulfonové (0,005 M, 72 ml). Po 10 dnech stání za laboratorní teploty byla reakční směs zneutralizována 10% roztokem uhličitanu draselného, extrahována ethyl-acetátem (100 ml), organická fáze promyta vodou, sušena a rozpouštědla odpařena. Preparativní chromatografií na tenké vrstvě ve směsi rozpouštědel petrolether/aceton (8:2) byla získána titulní sloučenina (83 mg, 87 %): t.t. 183 až 187 °C (aceton-heptan), $[\alpha]_D^{20} +15,0$ (c 0,169, $CHCl_3$). IR spektrum ($CHCl_3$): 3615 (O-H); 1715 (C=O, nikotinát); 1703 (C=O, keton); 1287 (C-O, nikotinát); 1002 (C-OH). 1H NMR (200 MHz): 0,72 (s, 3 H, 3 x H-18); 0,86 (s, 3 H, 3 x H-19); 2,25 (s, 3 H, 3 x H-21); 2,53 (t, 1 H, $J = 8,8$, H-17); 4,05 (kvintet, 1 H, $J = 2,4$, H-3); 5,25 (q, 1 H, $J = 2,8$, H-7); 7,44 (m, 1 H, H-5, nikotinát); 8,30 (dt, 1 H, $J_1 = 7,8$, $J_2 = 1,9$, H-4, nikotinát); 8,78 (dd, 1 H, $J_1 = 4,8$, $J_2 = 1,4$, H-6, nikotinát); 9,26 (m, 1 H, H-2, nikotinát). ESI MS: 901 (100 %, $2M + Na$), 462 (93 %, $M + Na$), 440 (24 %). $C_{27}H_{37}NO_4$: vypočteno: C, 73,77; H, 8,48; N, 3,19, nalezeno: C, 73,75; H, 9,24; N, 2,53.

Příklad 10

20-Oxo-5 α -pregnan-3 α ,7 α -diyl 3-sulfát 7-nikotinát pyridiniová sůl

Směs sloučeniny vyrobené v příkladu 9 (60 mg, 0,13 mmol) a komplexu pyridin-oxid sírový (120 mg, 0,75 mmol), která byla sušena na vakuu (25 °C, 100 Pa) po dobu 1 hodiny, byla rozpuštěna v suchém chloroformu (5 ml) a pod argonem míchána 4 hodiny za laboratorní teploty. Poté stála tato reakční směs při teplotě -20 °C přes noc, nerozpuštěný komplex pyridin-oxid sírový byl zfiltrován a filtrát odpařen. Odparek byl rozpuštěn v absolutním methanolu (1 ml), ke kterému byl přidán absolutní ether (5 ml). Směs byla zahuštěna téměř na polovinu a nechána stát přes noc při -20 °C. Odpařením rozpouštědel byl získán titulní produkt (71 mg, 87 %) jako pěna: $[\alpha]_D^{20} +6,0$ (c 0,204, $CHCl_3$). IR spektrum ($CHCl_3$): 3457, 3139 (pyridin); 1715 (C=O, nikotinát); 1702 (C=O, keton); 1289 (C-O, nikotinát); 1243, 1046 (SO=3). 1H NMR (400 MHz): 0,63 (s, 3 H, 3 x H-18); 0,87 (s, 3 H, 3 x H-19); 2,11 (s, 3 H, 3 x H-21); 2,54 (t, 1 H, $J = 8,7$, H-17); 4,79 (kvintet, $J = 2,7$, 1 H, H-3); 5,25 (q, 1 H, $J = 2,5$, H-7); 7,74 (dd, 1 H, $J_1 = 7,8$, $J_2 = 5,5$, H-5, nikotinát); 7,83 (m, 2 H, H-3 a H-5, pyridinium); 8,30 (tt, 1 H, $J_1 = 7,8$, $J_2 = 1,5$, H-4, pyridinium); 8,62 (dt, 1 H, $J_1 = 7,8$, $J_2 = 1,5$, H-4, nikotinát); 8,84 (m, 2 H, H-2 a H-6, pyridinium); 8,93 (m, 1 H, H-6, nikotinát); 9,29 (m, 1 H, H-2, nikotinát). FAB MS: 554 (3 %, $M - CH_3CO$), 440 (0,5 %, $M - 2 \times C_5H_6N$), 422 (10 %, $M + 1 - OSO_3C_5H_6N$). $C_{32}H_{42}N_2O_7S$: vypočteno: C, 64,19; H, 7,07; N, 4,68; S, 5,36, nalezeno: C, 60,87; H, 7,33; N, 3,55; S, 5,37.

Příklad 11

3 α -Hydroxy-20-oxo-5 β -pregnan-7 α -yl acetát

K roztoku 20-oxo-5 β -pregnan-3 α ,7 α -diyl diacetátu (100 mg, 0,24 mmol), který je znám z předchozí oblasti techniky, v methanolu (8 ml) byl přidán vodný roztok hydrogenuhličitanu draselného (0,7 ml, 0,2 M). Reakční směs byla zahřívána na 70 °C. Po 5 hodinách byla nalita do vody a extrahována ethyl-acetátem (70 ml). Organická fáze byla promyta vodou, sušena a rozpouštědla byla odpařena. Krystalizací odparku byla získána titulní sloučenina (40 mg, 45 %): t.t. 143 až

145 °C, $[\alpha]_D +40,3$ (c 0,303, CHCl₃) IR spektrum (CHCl₃): 3610, 3527, 1047 (C–O, COOH); 1726 (C=O, acetát); 1703 (C=O, keton); 1252 (C–O). ¹H NMR (200 MHz): 0,61 (s, 3 H, 3 x H–18); 0,93 (s, 3 H, 3 x H–19); 2,06 (s, 3 H, OAc); 2,12 (s, 3 H, 3 x H–21); 2,55 (t, 1 H, J = 8,8, H–17); 3,52 (m, 1 H, W = 32,7, H–3); 4,89 (q, 1 H, J = 2,4, H–7). FAB MS: 377 (5 %, M + 1), 317 (12 %, M + 1 – AcOH), 299 (40 %, M + 1 – AcOH, H₂O), 283 (32 %, M – AcOH, H₂O, CH₃), 255 (17 %, M – AcOH, H₂O, CH₃CO), 159 (30 %), 145 (34 %), 131 (33 %), 119 (37 %). C₂₃H₃₆O₄: vypočteno: C, 73,37; H, 9,64, nalezeno: C, 73,49; H, 9,93.

Příklad 12

20-oxo-5β-pregnan-3α,7α-diyl 3-hemisukcinát 7-acetát

Ke směsi titulní sloučeniny vyrobené podle příkladu 11 (100 mg, 0,27 mmol) a anhydridu kyseliny jantarové (200 mg, 4 mmol), která byla sušena na vakuu (25 °C, 100 Pa) po dobu 30 minut, byl přidán suchý pyridin (20 ml) a 4-dimethylaminopyridin (20 mg, 0,17 mmol). Reakční směs byla zahřívána 4 hodiny při 140 °C. Po nalití do vody byla organická část extrahována ethyl-acetátem (50 ml), vodná fáze byla znovu extrahována ethyl-acetátem (50 ml), spojené organické fáze promyty vodou a sušeny. Preparativní chromatografií na tenké vrstvě ve směsi petrol-ether/acetón (9:1) byl získán titulní hemisukcinát (44 mg, 35 %): t.t. 131 až 134 °C, $[\alpha]_D +50,3$ (c 0,218, CHCl₃). IR spektrum (CHCl₃): 3517, 2676 (COOH); 1756 (CO, COOH); 1726 (C=O, acetát); 1720 (C=O, hemisukcinát); 1703 (C=O, keton); 1252 (C–O, acetát); 1173 (C–O, hemisukcinát). ¹H NMR (200 MHz): 0,61 (s, 3 H, 3 x H–18); 0,94 (s, 3 H, 3 x H–19); 2,06 (s, 3 H, OAc); 2,12 (s, 3 H, 3 x H–21); 2,54–2,69 (m, 5 H, H–17 a OOCH₂CH₂OO); 4,62 (m, 1 H, W 31,8, H–3); 4,89 (q, 1 H, J = 2,7, H–7). FAB MS: 499 (69 %, M + Na), 417 (18 %, M + 1 – AcOH), 299 (28 %, M – AcOH, C₄H₅O₄). C₂₇H₄₀O₇: vypočteno: C, 68,04; H, 8,46, nalezeno: C, 69,20; H, 8,59.

Příklad 13

20-Oxo-5β-pregnan-3α,7α-diyl 3-sulfát 7-acetát pyridiniová sůl

Směs sloučeniny vyrobené podle příkladu 11 (110 mg, 0,3 mmol) a komplexu pyridin-oxid sírový (220 mg, 1,4 mmol), která byla sušena na vakuu (25 °C, 100 Pa) po dobu 1 hodiny, byla rozpuštěna v suchém chloroformu (4 ml) a pod argonem míchána 4 hodiny za laboratorní teploty. Poté stála reakční směs při teplotě –20 °C přes noc, nerozpuštěný komplex pyridin-oxid sírový zfiltrován a filtrát odpařen. Odparek byl rozpuštěn v absolutním methanolu (1 ml), ke kterému byl přidán absolutní ether (7 ml). Směs byla zahuštěna téměř na polovinu a nechána stát přes noc při –20 °C. Vzniklé krystaly titulního sulfátu (155 mg, 99 %) byly odsáty a sušeny v exikátoru (nad hydroxidem draselným): t.t. 155 až 158 °C, $[\alpha]_D + 45,7$ (c 0,285, CHCl₃). IR spektrum (CHCl₃): 3140 (pyridin); 1725 (C=O, acetát); 1702 (C=O, keton); 1253 (C–O); 1363, 1171, 960 (O–SO₃). ¹H NMR (200 MHz): 0,60 (s, 3 H, 3 x H–18); 0,92 (s, 3 H, 3 x H–19); 2,04 (s, 3 H, OAc); 2,56 (t, 1 H, J = 8,7, H–17); 4,34 (m, 1 H, W = 31, H–3); 4,88 (q, 1 H, J = 2,9, H–7); 7,97 (m, 2 H, H–3 a H–5, pyridinium); 8,48 (tt, 1 H, J₁ = 7,8, J₂ = 1,5, H–4, pyridinium); 8,95 (m, 2 H, H–2 a H–6, pyridinium). EI MS: 558 (0,5 %, M + Na), 455 (0,5 %, M – pyridinium), 256 (0,5 %, M – pyridinium, OSO₃, CH₃CO, AcOH), 230 (3 %), 80 (100 %). Pro C₂₈H₄₁NO₇S vypočteno: C, 62,78; H, 7,71; N, 2,61; S, 5,99, nalezeno: C, 59,99; H, 7,71; N, 2,61; S, 6,25.

Příklad 14

20-Oxo-5β-pregnan-3α,7α-diyl 3-sulfát 7-acetát sodná sůl

K methanolickeému roztoku (2 ml) titulní pyridiniové soli vyrobené podle příkladu 13 (90 mg, 0,17 mmol) byl v průběhu 1 hodiny postupně přikapáván roztok hydroxidu sodného v methanolu (0,45 ml, 0,373 M) do hodnoty pH 8. Po zahuštění roztoku na polovinu byl přidán absolutní ether (6 ml) a směs stála přes noc při –20 °C. Vzniklé krystaly titulní sodné soli (54 mg, 67 %) byly odsáty a sušeny v exikátoru (nad hydroxidem draselným): t.t. 187 až 191 °C, $[\alpha]_D + 35,0$

(c 0,248, CHCl₃). IR spektrum (CHCl₃): 1726 (C=O, acetát); 1703 (C=O, keton); 1251, 1236 (C–O); 1262, 1236, 1198 (O–SO₃). ¹H NMR (200 MHz): 0,61 (s, 3 H, 3 x H–18); 0,93 (s, 3 H, 3 x H–19); 2,07 (s, 3 H, OAc); 2,12 (s, 3 H, 3 x H–21); 2,54 (t, 1 H, J = 8,8, H–17); 4,23 (m, 1 H, W = 32, H–3); 4,84 (m, 1 H, H–7). FAB MS: 449 (3 %), 427 (2,5 %), 405 (2,5 %), 381 (5 %), 307 (10 %), 285 (10 %), 263 (10 %), 143 (100 %). Pro C₂₃H₃₅NaO₇S: vypočteno: C, 57,72; H, 7,37; S, 6,70, nalezeno: C, 50,66; H, 6,85; S, 4,57.

Příklad 15

3α-(*tert*-Butyldimethylsilyloxy)-5β-pregnan-7α-yl acetát

Směs alkoholu vyrobeného podle příkladu 11 (70 mg, 0,18 mmol) a imidazolu (76 mg, 1,1 mmol) rozpuštěná v N,N-dimethylformamidu (14 ml) byla ochlazena na 0 °C. Poté k ní byl přidán *tert*-butyldimethylsilylchlorid (84 mg, 0,56 mmol) a reakční směs byla míchána za laboratorní teploty. Po 2 hodinách byla reakční směs extrahována ethylacetátem (50 ml), organická fáze promyta roztokem kyseliny citronové, hydrogenuhlčitanu draselného, vodou a sušena. Po odpaření a krystalizaci z ethylacetátu bylo získáno 50 mg (55 %) titulní sloučeniny: t.t. 110 až 112 °C, [α]_D +30,5 (c 0,333, CHCl₃). IR spektrum (CHCl₃): 2955, 2906 ((CH₃)₃C); 1725 (C=O, acetát); 1702 (C=O, keton); 1254, 1021 (C–O, acetát); 1090, 1076 (C–OSi); 853, 837 ((CH₃)₂Si). ¹H NMR (200 MHz): 0,05 (s, 6 H, (CH₃)₂Si); 0,6 (s, 3 H, 3 x H–18); 0,88 (s, 9 H, (CH₃)₃C); 0,91 (s, 3 H, 3 x H–19); 2,04 (s, 3 H, OAc); 2,12 (s, 3 H, 3 x H–21); 2,54 (t, 1 H, J = 8,7, H–17); 3,45 (m, 1 H, W = 32, H–3); 3,87 (q, 1 H, J = 2,4, H–7). FAB MS: 433 (2 %, M – 57, (CH₃)₃C), 373 (18 %, M – (CH₃)₃C, AcOH), 299 (100 %, M – (CH₃)₃(CH₃)₂Si, AcOH), 255 (12 %, M – (CH₃)₃(CH₃)₂SiO, AcOH, CH₃CO). Pro C₂₉H₅₀O₄Si vypočteno: C, 70,97; H, 10,27, nalezeno: C, 70,03; H, 10,44.

Příklad 16

3α-(*tert*-Butyldimethylsilyloxy)-7α-hydroxy-5β-pregnan-20-on

Roztok acetátu vyrobeného podle předchozího příkladu 15 (40 mg, 0,08 mmol) v benzenu (5 ml), ke kterému byl přidán hydroxid draselný v ethanolu (0,89 M, 4 ml) byl zahříván po dobu 3 hodin při teplotě 90 °C. Po zreagování veškeré výchozí látky byla reakční směs nalita na vodu a extrahována etherem (40 ml). Organická fáze byla promyta vodou, sušena a rozpouštědla odpařena. Deskovou chromatografií na tenké vrstvě ve směsi rozpouštědel petrolether/aceton (8:2) byla získána titulní sloučenina (20 mg, 55 %): t.t. 131 až 136 °C, [α]_D +47,6 (c 0,29, CHCl₃). IR spektrum (CHCl₃): 3621 (O–H); 1005 (C–O); 1699 (C=O); 1472, 1463, 1385 ((CH₃)₃C); 1361 (Ac, (CH₃)₃C); 1254 ((CH₃)₂Si); 1098, 1082 (C–OSi). ¹H NMR (200 MHz): 0,05 (s, 6 H, (CH₃)₂Si); 0,60 (s, 3 H, 3 x H–18); 0,88 (s, 12 H, 3 x H–19 a (CH₃)₃C); 2,12 (s, 3 H, 3 x H–21); 2,53 (t, 1 H, J = 9, H–17); 3,41 (m, 1 H, W = 32,7, H–3); 3,86 (m, 1 H, H–7). FAB MS: 449 (11 %, M + 1), 317 (10 %, M – (CH₃)₃(CH₃)₂SiO), 299 (26 %, M + 1 – (CH₃)₃(CH₃)₂SiO, H₂O), 283 (13 %, M + 1 – (CH₃)₃(CH₃)₂SiO, H₂O, O), 255 (14 %, M – (CH₃)₃(CH₃)₂SiO, H₂O, CH₃CO). Pro C₂₇H₄₈O₃Si vypočteno: C, 72,26; H, 10,70, nalezeno: C, 72,20; H, 10,84.

Příklad 17

3α-(*tert*-Butyldimethylsilyloxy)-20-oxo-5β-pregnan-7α-yl nikotinát

K roztoku sloučeniny vyrobené podle předchozího příkladu 16 (240 mg, 0,53 mmol) a 4-dimethylaminopyridinu (10 mg, 0,09 mmol) v pyridinu (10 ml), který byl předem vychlazen na 0 °C, byl přidáván hydrochlorid nikotinoylchloridu (720 mg, 4,0 mmol) po malých dávkách. Reakční směs byla míchána za laboratorní teploty 10 hodin a poté nalita do vody. Organická část byla extrahována ethylacetátem (100 ml). Organická fáze byla extrahována znovu ethylacetátem (100 ml) a spojené organické fáze sušeny a odpařeny. Preparativní chromatografií na tenké vrstvě směsí petrolether/aceton (9:1) byl získán titulní hydroxyderivát (208 mg, 70 %): t.t. 57 až 59 °C, [α]_D +54,9 (c 0,387, CHCl₃). IR spektrum (CHCl₃): 2907 (CH₃, (CH₃)₃(CH₃)₂SiO); 1714 (C=O,

nikotinát); 1703 (C=O, keton); 1286, 1108 (C–O, nikotinát); 1092 (C–OSi). ¹H NMR (400 MHz): 0,05 (s, 6 H, (CH₃)₂Si); 0,63 (s, 3 H, 3 x H–18); 0,77 (s, 9 H, (CH₃)₃C); 0,96 (s, 3 H, 3 x H–19); 2,11 (s, 3 H, 3 x H–21); 2,52 (t, 1 H, J = 9,1, H–17); 3,43 (m, 1 H, W = 32, H–3); 5,21 (q, 1 H, J = 2,8, H–7); 7,44 (ddd, 1 H, J₁ = 7,8, J₂ = 7,8, h = 0,7, H–5, nikotinát); 8,30 (dt, 1 H, J₁ = 8,3, J₂ = 2, H–4, nikotinát); 8,78 (dd, 1 H, J₁ = 4,8, J₂ = 1,7, H–6, nikotinát); 9,27 (dd, 1 H, J₁ = 2, J₂ = 0,7, H–2, nikotinát). FAB MS: 579 (6 %, M + Na), 554 (22 %, M + 1), 496 (7 %, M – (CH₃)₃C), 299 (4 %, M – (CH₃)₃(CH₃)₂SiO, OCOC₆H₄N), 255 (79 %, M – (CH₃)₃C(CH₃)₂SiO, –OCOC₆H₄N, CH₃CO). Pro C₃₃H₅₁O₄Si vypočteno: C, 71,56; H, 9,28; N, 2,53, nalezeno: C, 70,77; H, 9,32; N, 2,23.

Příklad 18

3α-Hydroxy-20-oxo-5α-pregnan-7α-yl nikotinát

K vychlazenému (na 0 °C) roztoku sloučeniny vyrobené v předchozím příkladu (100 mg, 0,18 mmol) v suchém THF (10 ml) byl přidán roztok tetrabutylammonium-fluoridu (1 M v THF, 0,3 ml, 1,6 mmol). Reakční směs byla míchána za laboratorní teploty 2 dny a poté k ní byl přidán další roztok tetrabutylammonium-fluoridu (1 M v THF, 0,1 ml, 0,5 mmol). Po 3 dnech byla reakční směs extrahována ethyl-acetátem (100 ml), organická fáze promyta roztokem kyseliny citronové, hydrogenuhličitanu draselného, vodou a sušena. Preparativní chromatografií na tenké vrstvě směsi petrolether/acetone (9:1) byla získána titulní sloučenina (58 mg, 74 %): t.t. 70 až 73 °C (acetone-heptan), [α]_D +29,2 (c 0,279, CHCl₃). IR spektrum (CHCl₃): 3613; 3451 (O–H); 1715 (C=O, nikotinát); 1705 (C=O, keton); 1287 (C–O, nikotinát); 1034, 1026 (C–OH); 1592, 1421 (nikotinát). ¹H NMR (400 MHz): 0,64 (s, 3 H, 3 x H–18); 0,98 (s, 3 H, 3 x H–19); 2,12 (s, 3 H, 3 x H–21); 2,54 (t, 1 H, J = 9,2, H–17); 3,49 (m, 1 H, W = 31, H–3); 5,20 (q, 1 H, J = 2,7, H–7); 7,45 (ddd, 1 H, J₁ = 7,8, J₂ = 4,8, J₃ = 0,7, H–5, nikotinát); 8,31 (dt, 1 H, J₁ = 7,8, J₂ = 1,7, H–4, nikotinát); 8,80 (dd, 1 H, J₁ = 4,8, J₂ = 1,7, H–6, nikotinát); 9,26 (dd, 1 H, J₁ = 2, J₂ = 0,7, H–2, nikotinát). FAB MS: 440 (12 %, M + 1), 145 (7 %), 124 (100 %), 105 (35 %). Pro C₂₇H₃₇NO₄ vypočteno: C, 73,77; H, 8,48; N, 3,19, nalezeno: C, 73,71; H, 8,95; N, 2,67.

Příklad 19

20-Oxo-5β-pregnan-3α,7α-diyl 3-sulfát 7-nikotinát pyridiniová sůl

Směs sloučeniny, která byla vyrobena podle předcházejícího příkladu 18 (45 mg, 0,1 mmol) a komplexu pyridin-oxid sírový (90 mg, 0,56 mmol), která byla sušena na vakuu (25 °C, 100 Pa) po dobu 1 hodiny, byla rozpuštěna v suchém chloroformu (5 ml) a pod argonem míchána 4 hodiny za laboratorní teploty. Poté stála reakční směs při teplotě –20 °C přes noc, nerozpuštěný komplex pyridin-oxid sírový zfiltrován a filtrát odpařen. Odparek byl rozpuštěn v absolutním methanolu (1 ml), ke kterému byl přidán absolutní ether (4 ml). Směs byla zahušťena na téměř polovinu a nechána stát přes noc při –20 °C. Odpařením rozpouštědel byla získána titulní sloučenina (40 mg, 74 %) jako pěna: [α]_D +42,0 (c 0,321, CHCl₃). IR spektrum (CHCl₃): 3139, 2652 (pyridin); 1714 (C=O, nikotinát); 1703 (C=O, keton); 1287 (C–O, nikotinát); 1175, 978, 958 (O–SO₃). ¹H NMR (400 MHz): 0,63 (s, 3 H, 3 x H–18); 0,98 (s, 3 H, 3 x H–19); 2,11 (s, 3 H, 3 x H–21); 2,56 (t, 1 H, J = 8,7, H–17); 4,32 (m, 1 H, W = 32, H–3); 5,26 (m, 1 H, H–7); 7,74 (dd, 1 H, J₁ = 7,6, J₂ = 5,3, H–5, nikotinát); 7,82 (m, 2 H, H–3 a H–5, pyridinium); 8,33 (t, 2 H, J = 7,8, H–4, pyridinium); 8,60 (d, 1 H, J = 7,6, H–4, nikotinát); 8,88 (m, 2 H, H–2 a H–6, pyridinium); 8,93 (d, 1 H, J = 5, H–6, nikotinát); 9,33 (m, 1 H, H–2, nikotinát). FAB MS: 564 (10 %), 542 (20 %), 519 (12 %, M + 1 – pyridinium), 444 (18 %), 422 (10 %, M + 1 – OSO₃C₅H₆N). Pro C₃₂H₄₂N₂O₇S vypočteno: C, 64,19; H, 7,07; N, 4,68; S, 5,36, nalezeno: C, 58,39; H, 6,88; N, 3,70; S, 6,99.

Příklad 20

Test biologické aktivity

Buněčné kultury

Primárně disociované hippokampální kultury byly připraveny z 1–2 denních krys. Zvířata byla dekapitována a hippokampus izolován. Buněčná suspenze byla připravena rozvolněním trypsinem a mechanickou disociací. Buňky byly nasazeny na 31 mm nebo 12 mm polylysinem potažená krycí sklíčka v hustotě 500 000 buněk/cm². Neuronální kultury byly udržovány v médiu Neurobasal™–A (Invitrogen, Carlsbad, USA) doplněného glutaminem (0,5 mM) a B–27 Serum–Free Supplement (Invitrogen) při 37 °C a 5 % CO₂.

Elektrofyzilogie

Pro elektrofyziologické pokusy byly použity 5 až 10 dní staré kultury. Proudů vzniklé při snímání z celé buňky byly měřeny pomocí patch–clamp zesilovače (Axopatch ID; Axon Instruments, Inc. Foster City, USA) po kompenzaci kapacity a sériového odporu (<10 MΩ) na 80 až 90 %. Agonistou indukované odpovědi byly filtrovány na 1 kHz (filtr 8–pole Bessel; Frequency Devices, Haverhill, USA), digitalizovány při 5 kHz a analyzovány softwarovým programem pClamp verze 9 (Axon Instruments). Borosilikátové mikropipety byly naplněny intracelulárním roztokem, který obsahoval 125 mM D–glukonové kyseliny, 15 mM chloridu cesného, 5 mM EGTA, 10 mM HEPES, 3 mM chloridu horečnatého, 0,5 mM chloridu vápenatého a 2 mM horečnaté soli ATP (pH upraveno na 7,2 roztokem hydroxidu cesného). Extracelulární roztok (ECS) obsahoval 160 mM chloridu sodného, 2,5 mM chloridu draselného, 10 mM HEPES, 10 mM glukózy, 0,2 mM EDTA a 0,7 mM chloridu vápenatého (pH upraveno na 7,3 roztokem hydroxidusodného). Glycin (10 μM) a TTX (0,5 μM) byly přítomny jak v kontrolním, tak v testovacím roztoku. Roztoky se steroidem byly připraveny ze čerstvě připraveného zásobního roztoku (20 mM steroidu rozpuštěného v dimethylsulfoxidu (DMSO)). Ve všech extracelulárních roztocích byla použita stejná koncentrace DMSO. Kontrolní a testovací roztoky byly aplikovány mikroprocesorem kontrolovaným systémem promývání, s rychlostí výměny roztoku v okolí buňky ~10 ms.

Biologická aktivita

Odezvy (proudů) vyvolané 100 μM NMDA byly měřeny na kultivovaných hippokampálních neuronech při udržovaném membránovém potenciálu –60 mV. V souladu a předchozími výsledky pregnanolonsulfát snížil amplitudu NMDA–indukované odpovědi (obr. 1). Při použití 100 μM pregnanolonsulfátu byl průměrný inhibiční efekt 71,3 ± 5,0 % (n = 5). Syntetická analoga pregnanolonsulfátu měla také inhibiční efekt na NMDA–indukované odpovědi s průměrnou mírou inhibice 17 % (sloučenina z příkladu 5) až 71 % (5β–pregnenolonsulfát) při stejné koncentraci steroidu (100 μM). Relativní míra steroidem indukované inhibice byla použita pro výpočet IC₅₀. IC₅₀ byly vypočítány rovnicí $RI = 1 - (1/1 + ([steroid]/IC_{50})^h)$, kde RI je relativní míra steroidem indukované inhibice a h je parametr Hillova koeficientu (1,2). 3D modely steroidu a hodnoty jejich relativní inhibice a vypočtené hodnoty IC₅₀ jsou uvedeny v následující tabulce.

40 Tabulka

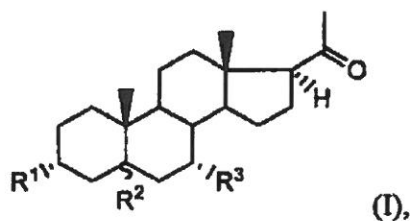
Inhibice NMDA–indukované odpovědi v kulturách hippokampálních neuronů pregnanolonsulfátem a jeho syntetickými analogy.

Sloučenina z příkladu č.	Inhibice (X)	SD	IC ₅₀	IC ₅₀ SD
12	21,4	2,7	299,9	40,9
13	34,1	10,2	185,8	61,1
19	46,9	9,7	116,0	36,5
3	17,4	4,3	383,5	93,5
4	35,2	2,7	167,2	16,3
10	37,8	4,7	153,8	25,0

Odezvy indukované v kulturách hippokampálních neuronů na aplikaci 100 μM NMDA a současně koaplikaci 100 μM pregnanolonsulfátu.

PATENTOVÉ NÁROKY

- 5 1. Pregnanové anionické sloučeniny obecného vzorce I



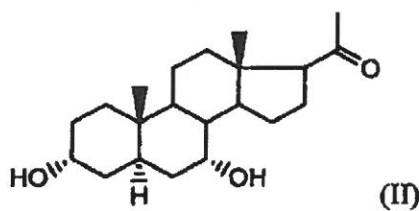
v němž

- R^1 znamená esterovou skupinu obecného vzorce R^4O^- , která je schopna tvořit ion, kde
 R^4 znamená skupinu HSO_3^- , pyridin- SO_3 , $HOOC-(CH_2)_2-CO^-$,
 10 R^2 znamená atom vodíku s konfigurací alfa nebo beta a
 R^3 znamená esterovou skupinu obecného vzorce R^5COO^- , kde R^5 znamená CH_3^- nebo $C_5H_4N^-$,
 a jejich farmaceuticky použitelné soli.

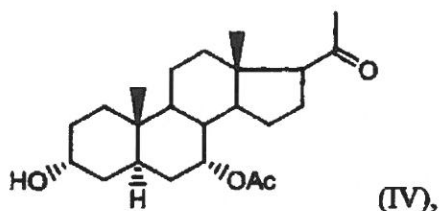
- 15 2. Pregnanové anionické sloučeniny obecného vzorce I podle nároku 1, kterými jsou:

- 20-oxo-5 α -pregnan-3 α ,7 α -diyl 3-hemisukcinát 7-acetát,
 20-oxo-5 α -pregnan-3 α ,7 α -diyl 3-sulfát 7-acetát pyridiniová sůl,
 20-oxo-5 α -pregnan-3 α ,7 α -diyl 3-sulfát 7-acetát sodná sůl,
 20-oxo-5 α -pregnan-3 α ,7 α -diyl 3-sulfát 7-nikotinát pyridiniová sůl,
 20 20-oxo-5 β -pregnan-3 α ,7 α -diyl 3-hemisukcinát 7-acetát,
 20-oxo-5 β -pregnan-3 α ,7 α -diyl 3-sulfát 7-acetát pyridiniová sůl,
 20-oxo-5 β -pregnan-3 α ,7 α -diyl 3-sulfát 7-acetát sodná sůl a
 20-oxo-5 β -pregnan-3 α ,7 α -diyl 3-sulfát 7-nikotinát pyridiniová sůl.

- 25 3. Způsob výroby sloučenin obecného vzorce I podle nároků 1 až 2, v němž R^1 má význam uvedený v nároku 1, R^2 znamená atom vodíku s konfigurací alfa a R^3 znamená CH_3COO^- ,
 vyznačující se tím, že se sloučenina vzorce II



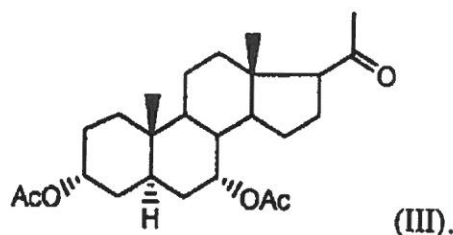
- 30 převede na 3,7-dichráněný derivát, který se parciální hydrolyzou ve vhodném rozpouštědle, jako je alkohol, vodný alkohol, nebo ve směsi rozpouštědel, s výhodou ve směsi methanolu s benzenem, převede na monoester vzorce IV



z něhož se působením anhydridu kyseliny jantarové v pyridinu za přítomnosti DMAP připraví příslušný hemisukcinát vzorce I, v němž R^1 znamená hemisukcinátovou skupinu, R^2 znamená atom vodíku v alfa poloze a R^3 znamená acetoxykupinu,

- 5 nebo se působením komplexu pyridinu–oxid sírový v chloroformu připraví pyridiniumsulfát vzorce I, v němž R^1 znamená pyridiniumsulfátovou skupinu, R^2 znamená atom vodíku v alfa poloze a R^3 znamená acetoxykupinu, načez se může posledně uvedená sloučenina vzorce I, v němž R^1 znamená pyridiniumsulfátovou skupinu, R^2 znamená atom vodíku v alfa poloze a R^3 znamená acetoxykupinu, reakcí s hydroxidem alkalického kovu v alkoholu, s výhodou v methanolu, převést na sloučeninu obecného vzorce I, v němž R^1 znamená sodnou sůl sulfátu, R^2 znamená atom vodíku v alfa poloze a R^3 znamená acetoxykupinu.

4. Způsob výroby podle nároku 3, vyznačující se tím, že 3,7–dichráněný derivát znamená diacetát vzorce III



15

5. Způsob výroby podle nároku 3 nebo 4, vyznačující se tím, že se parciální hydrolyza provádí působením hydroxidu alkalického kovu, jako je hydroxid draselný, sodný nebo lithný, nebo kyseliny, jako je kyselina chlorovodíková, chloristá.

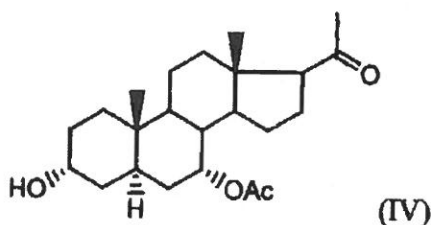
20 6. Způsob výroby podle kteréhokoliv z nároků 3 až 5, vyznačující se tím, že se jako vhodné rozpouštědlo používá alkohol, vodný alkohol nebo směs rozpouštědel, s výhodou ve směsi methanolu s benzenem.

25 7. Způsob výroby podle kteréhokoliv z nároků 3 až 6, vyznačující se tím, že se jako směs rozpouštědel používá směs methanolu s benzenem.

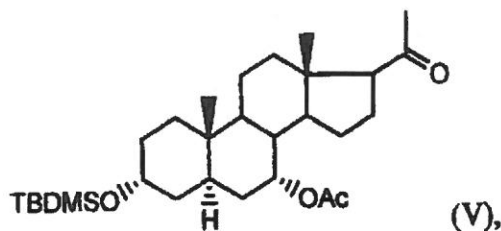
8. Způsob výroby podle kteréhokoliv z nároků 3 až 7, vyznačující se tím, že se reakce s hydroxidem alkalického kovu provádí hydroxidem sodným v alkoholu.

30 9. Způsob výroby podle kteréhokoliv z nároků 3 až 8, vyznačující se tím, že se jako alkohol používá methanol.

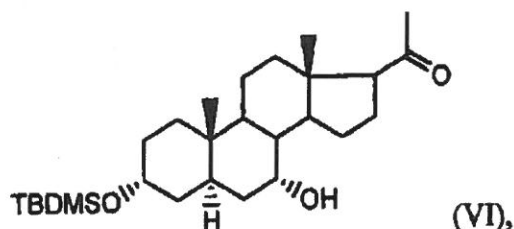
35 10. Způsob výroby sloučenin obecného vzorce I podle nároků 1 a 2, v němž R^1 znamená pyridiniumsulfát, R^2 znamená atom vodíku v alfa poloze a R^3 znamená nikotinoyloxyskupinu, vyznačující se tím, že se sloučenina vzorce IV



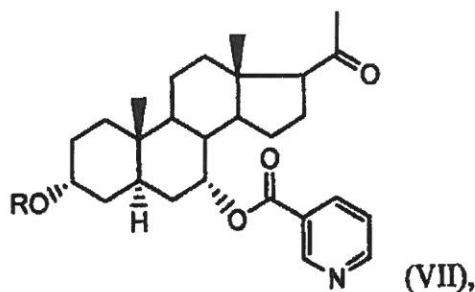
převede reakcí s *tert.*butyldimethylsilylchloridem a imidazolem ve vhodném rozpouštědle na *tert.*butyldimethylsilylderivát vzorce V



který zmýdelněním acetátové skupiny v poloze 7 za zvýšené teploty poskytl sloučeninu vzorce VI



- 5 která se esterifikuje nikotinoylchloridem v pyridinu za přítomnosti DMAP za vzniku nikotinyl-oxysteroidu vzorce VII



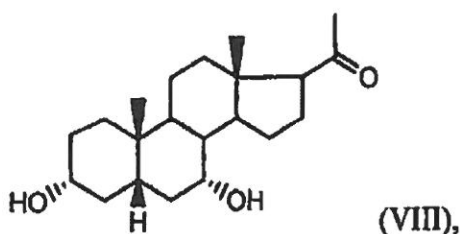
- 10 v němž R znamená TBDMS, a ta působením *p*-toluensulfonové kyseliny v methanolu poskytne sloučeninu vzorce VII, v němž R znamená atom vodíku, která se nechá zreagovat s komplexem pyridinu s oxidem sírovým ve vhodném nereagujícím rozpouštědle.

11. Způsob výroby podle nároku 10, vyznačující se tím, že se jako vhodné rozpouštědlo používá DMF.

- 15 12. Způsob výroby podle nároku 10 nebo 11, vyznačující se tím, že se jako zmýdelnění používá zmýdelnění hydroxidem draselným ve směsi ethanolu a benzenu.

13. Způsob výroby podle nároku 10, vyznačující se tím, že se jako vhodné nereagující rozpouštědlo používá chloroform.

- 20 14. Způsob výroby sloučenin obecného vzorce I podle nároků 1 a 2, v nichž R¹ má význam uvedený v nároku 1, R² znamená atom vodíku s konfigurací beta a R³ znamená CH₃COO, vyznačující se tím, že sloučenina vzorce VIII



kteřá se od sloučeniny vzorce II liší pouze konfigurací atomu vodíku v poloze 5, se nechá zreagovat stejným způsobem jako je popsáno pro sloučeninu II v nárocích 3 až 13.

5 15. Způsob výroby sloučenin obecného vzorce I podle nároků 1 a 2, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že se ze sloučeniny vzorce II, resp. VIII, podle nároků 3 až 13, resp. 14, vyrobí následující sloučeniny obecného vzorce I

20-Oxo-5 α -pregnan-3 α ,7 α -diyl 3-hemisukcinát 7-acetát,
 20-Oxo-5 α -pregnan-3 α ,7 α -diyl 3-sulfát 7-acetát pyridiniová sůl,
 20-Oxo-5 α -pregnan-3 α ,7 α -diyl 3-sulfát 7-acetát sodná sůl,
 10 20-Oxo-5 α -pregnan-3 α ,7 α -diyl 3-sulfát 7-nikotinát pyridiniová sůl,
 20-Oxo-5 β -pregnan-3 α ,7 α -diyl 3-hemisukcinát 7-acetát,
 20-Oxo-5 β -pregnan-3 α ,7 α -diyl 3-sulfát 7-acetát pyridiniová sůl,
 20-Oxo-5 β -pregnan-3 α ,7 α -diyl 3-sulfát 7-acetát sodná sůl a
 20-Oxo-5 β -pregnan-3 α ,7 α -diyl 3-sulfát 7-nikotinát pyridiniová sůl.

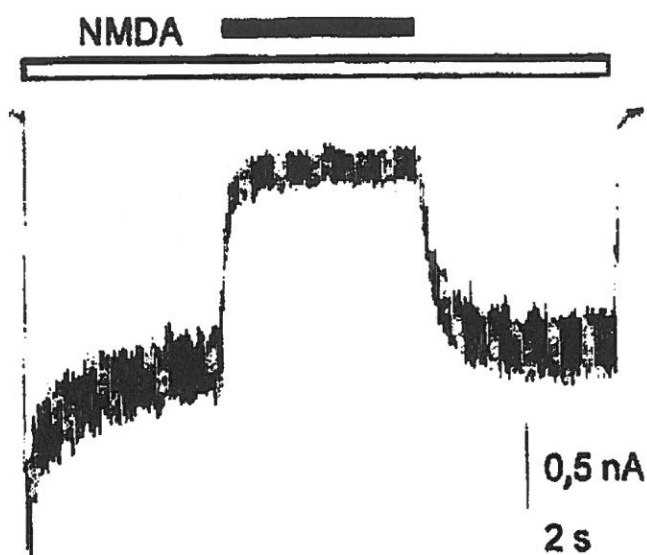
15 16. Použití sloučenin obecného vzorce I podle nároků 1 a 2 pro výrobu farmaceutického prostředku pro léčení neurologických a psychiatrických onemocnění a stavů spojených s nadměrnou aktivací NMDA receptorů, jakými jsou neuroprotektiva proti excitotoxickému poškození centrálního nervového systému, stavy spojené s nadměrnou aktivací NMDA podtypu glutamátových receptorů nebo tam, kde se tento typ receptoru podílí na vzniku nebo průběhu některých duševních a neurologických onemocnění, zvláště jde o traumatické a hypoxické poškození nervové tkáně při chorobách centrální nervové soustavy, jako jsou např. Alzheimerova, Huntingtonova a Parkinsonova choroba, dále při kognitivních poruchách vznikajících ve stáří, dalšími indikacemi jsou tardivní dyskineze, amyotrofická laterální skleróza, olivopontocerebelární degenerace,
 20 25 neurologické obtíže spojené s AIDS infekcí, alergická encefalomyelitida, a pro medikaci epilepsie, úzkosti, deprese, schizofrenie, chronické bolesti i lékové závislosti.

17. Farmaceutický prostředek, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že obsahuje efektivní množství sloučenin obecného vzorce I podle nároků 1 a 2 a popřípadě další adjuvans nebo léčiva.

30 18. Použití farmaceutického prostředku podle nároku 17 pro výrobu léčiva pro léčení neurologických a psychiatrických onemocnění a stavů spojených s nadměrnou aktivací NMDA receptorů jakými jsou neuroprotektiva proti excitotoxickému poškození centrálního nervového systému, stavy spojené s nadměrnou aktivací NMDA podtypu glutamátových receptorů nebo tam, kde se
 35 40 tento typ receptoru podílí na vzniku nebo průběhu některých duševních a neurologických onemocnění, zvláště jde o traumatické a hypoxické poškození nervové tkáně při chorobách centrální nervové soustavy, jako jsou např. Alzheimerova, Huntingtonova a Parkinsonova choroba, dále při kognitivních poruchách vznikajících ve stáří, dalšími indikacemi jsou tardivní dyskineze, amyotrofická laterální skleróza, olivopontocerebelární degenerace, neurologické obtíže spojené s AIDS infekcí, alergická encefalomyelitida, a pro medikaci epilepsie, úzkosti, deprese, schizofrenie, chronické bolesti i lékové závislosti.

Sloučenina obecného vzorce I

NMDA



Obr. 1

Konec dokumentu