

PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

305 733

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.:

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2014-575**
(22) Přihlášeno: **26.08.2014**
(40) Zveřejněno: **24.02.2016**
(Věstník č. 8/2016)
(47) Uděleno: **13.01.2016**
(24) Oznámení o udělení ve věstníku: **24.02.2016**
(Věstník č. 8/2016)

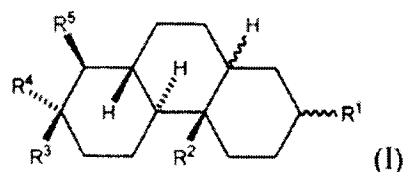
C07J 73/00 (2006.01)
C07J 63/00 (2006.01)
C07J 1/00 (2006.01)
C07C 13/60 (2006.01)
A61K 31/56 (2006.01)
A61P 25/18 (2006.01)
A61P 25/22 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)
A61P 25/30 (2006.01)

(56) Relevantní dokumenty:
PubChem CID: 345104 (2005-03-26), 9543008 (2006-08-02), 439673 (2005-06-24).
WO 00/66522 A; WO 2012/019106 A; EP 0 606 661 A.

(73) Majitel patentu:
Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, v.v.i.,
Praha 6, CZ
Fyziologický ústav AV ČR, v.v.i., Praha 4, CZ

(72) Původce:
RNDr. Eva Kudová, Ph.D., Praha 4, CZ
RNDr. Hana Chodounská, CSc., Praha 6, CZ
Mgr. Vojtěch Kapras, Praha 7, CZ
MUDr. Ladislav Vyklický, DrSc., Kamenice, CZ
RNDr. Karel Valeš, Ph.D., Praha 5, CZ
Dr. Ullrich Jahn, Ph.D., Praha 5, CZ

(74) Zástupce:
RNDr. Ladislava Součková, CSc., Flemingovo
nám. 542/2, 166 10 Praha 6



(54) Název vynálezu:
Amfifilní sloučeniny s neuroprotektivními účinky

(57) Anotace:
Amfifilní sloučeniny s tetradekahydrofenantrenovým skeletem vzorce I a jejich enantiomery, vykazující neuroprotektivní účinky, jejich použití jako léčiva pro léčení neuropsychiatrických poruch souvisejících s nerovnováhami glutamatergního neuropřenašecového systému, jako jsou ischemické poškození centrální nervové soustavy, neurodegenerativní změny a poruchy centrální nervové soustavy, afektivní poruchy, deprese, post-traumatická stresová porucha a nemoci související se stresem, anxieta, schizofrenie a psychotické poruchy, bolest, závislost, roztroušená skleróza, epilepsie, gliomy, a farmaceutický prostředek obsahující uvedené sloučeniny.

CZ 305733 B6

Amfifilní sloučeniny s neuroprotektivními účinky

Oblast techniky

Předkládaný vynález je z oboru farmaceutické chemie. Předmětem je soubor sloučenin, které inhibičně modulují nadměrně aktivované NMDA receptory, a tak chrání tkáň centrálního nervového systému (CNS) před excesivním působením glutamátu.

Dosavadní stav techniky

NMDA receptory jsou multiproteinové komplexy tvořené základním tetramerem, složeným ze dvou NR1 podjednotek a dvou NR2A–2D podjednotek, které tvoří iontový kanál pro kladné ionty (Nature 438, 185–192 (2005)).

Glutamát je hlavním excitačním neuropřenašečem v centrálním nervovém systému savců. Během synaptického přenosu vznikají odpovědi post synaptického neuronu prostřednictvím ionotropních a metabotropních glutamátových receptorů. Mezi ionotropní glutamátové receptory patří N-methyl-D-aspartátové receptory (NMDA), AMPA a kainátové receptory. Ačkoliv současné poznatky naznačují úlohu různých podtypů rodiny glutamátových receptorů v glutamát indukované excitotoxicitě, ionotropní receptory jsou považovány za klíčového hráče v těchto procesech. Aktivace ionotropních glutamátových receptorů vede ke změnám v intracelulárních koncentracích iontů, především vápenatých a sodných. Toxicita vyšších hladin glutamátu je zpravidla spojována se vzestupem intracelulárních hladin Ca^{2+} . V současnosti je poměrně dobře prokázáno, že existuje přímý vztah mezi nadměrným influxem vápníku do buněk a glutamát indukovaným poškozením neuronů. Glutamát indukované patologické zvýšení intracelulárního kalcia je připisováno déletrvající aktivaci ionotropních glutamátových receptorů. Zvýšení intracelulárního vápníku může spustit sestupnou neurotoxickou kaskádu.

Řada preklinických studií dokládá výraznou schopnost NMDA antagonistů zabránit excesivnímu působení glutamátu na nervové buňky a tím omezit narušení funkcí CNS. Nicméně jejich neuroprotektivní potenciál je z klinického pohledu malý. Vzhledem k faktu, že NMDA receptory jsou jedněmi z nejrozšířenějších typů receptorů v CNS, vede jejich podání k řadě závažných nežádoucích účinků od narušení motoriky po indukci psychóz schizofrenního typu. Na druhou stranu velká rozmanitost NMDA receptorů, jejich rozdílná distribuce na synapsích i mimo ně a různé funkční stavy tohoto receptoru nabízí možnost hledat látky selektivně ovlivňující pouze určitou skupinu NMDA receptorů a tím omezit výskyt neočekávaných a nežádoucích účinků při zachování neuroprotektivního působení. (Pharmacol. Rev. 51, 7–61 (1999); Semin. Cell Dev. Biol. 17, 592–604 (2006); Top. Med. Chem. 6, 749–770 (2006); Anesth. Analog. 97, 1108–1116 (2003); Curr. Opin. Pharmacol. 6, 53–60 (2006); Curr. Opin. Investig. Drugs 4, 826–832 (2003).

Předchozí výsledky ukázaly, že přirozeně se vyskytující *3alfa,5beta*-pregnanolon-sulfát *use*-dependentním způsobem ovlivňuje aktivitu NMDA receptorů. V důsledku tohoto mechanismu působení vykazuje výraznější inhibiční působení na NMDA receptorech tonicky aktivovaných glutamát než na fáziicky aktivovaných NMDA receptorech během synaptického přenosu. Právě aktivace extrasynaptických tonicky aktivovaných NMDA receptorů je zásadní pro excitotoxické působení glutamátu (J. Neurosci. 25, 8439–50 (2005)).

Proto jsme zahájili vývoj a testování nových NMDA antagonistů odvozených od neurosteroidů. Tyto zcela nově syntetizované sloučeniny vykazují afinitu k extrasynaptickým NMDA receptorům. Co je však ještě důležitější, předchozí elektrofyziologické studie ukázaly, že tento typ látek se váže pouze na dlouhodobě otevřené NMDA receptory. Předpokládaným neuroprotektivním mechanismem účinku je tedy blokáce excesivního pronikání vápníku do buňky prostřednictvím dlouho otevřených NMDA receptorů. K ostatním typům NMDA receptoru nemají uvedené slou-

činy afinitu, předpokládá se tedy, že budou minimálně ovlivňovat přenos signálu mezi neuro-

5 V posledním desetiletí se biomedicínský výzkum soustředil na studium role neurosteroidů v pato-
fyziologii řady neuropsychiatrických chorob a zhodnocení jejich terapeutického potenciálu.
Mechanismus účinku neurosteroidů je spojován s jejich aktivitou na NMDA a GABA_A recepto-
rech. Experimentální studie na zvířecích modelech ukazují na jejich potenciál k léčbě řady nemo-
cí centrálního nervového systému, především neurodegenerativních chorob, roztroušené sklerózy,
10 afektivních poruch, alkoholismu, bolesti, insomnie či schizofrenie (J. Pharm. Exp. Ther. 116, 1–6
(2007); J. Pharm. Exp. Ther. 293, 747 (2000)).

Neurosteroidy hrají zásadní roli také v regulaci reaktivity na stres a s tím souvisejícími porucha-
mi CNS. Hladina neurosteroidů krátkodobě po vystavení stresu stoupá, jedná se o adaptivní
15 mechanismus. Naproti tomu experimentální modely chronického stresu a deprese u laboratorních
hlodavců ukazují dlouhodobě sníženou koncentraci neurosteroidů jak v mozku, tak v plazmě,
způsobenou sníženou biosyntézou. Podobné nálezy nacházíme i u pacientů trpících depresí nebo
premenstruačním syndromem. To poukazuje na narušení homeostatických mechanismů v CNS
u neuropsychiatrických chorob souvisejících se stresem.

20 Mezi nejlépe prozkoumané neurosteroidy patří pregnenolon, progesteron, dehydroepiandrosteron
(DHEA) a jejich redukované metabolity a sulfátové estery. O regulaci syntézy neurosteroidů
v CNS není známo příliš mnoho poznatků, avšak obecně se soudí, že jejím podkladem jsou inter-
akce více typů buněk. Například syntéza progesteronu Schwannovými buňkami u periferních ner-
vů je regulována difuzními signály z neuronů.

25 Neurotrofické a neuroprotektivní účinky neurosteroidů byly ukázány jak v buněčných kulturách,
tak *in vivo*. Progesteron hraje důležitou roli v neurologickém zotavení z traumatického poškození
mozku a míchy prostřednictvím mechanismů, zahrnujících ochranu před excitotoxickým poško-
zením buněk, před peroxidací lipidů a indukcí specifických enzymů. Například po přetnutí spi-
30 nální míchy potkanů progesteron zvyšuje počet astrocytů, exprimujících *NO*-syntázu těsně nad
a pod místem přetnutí.

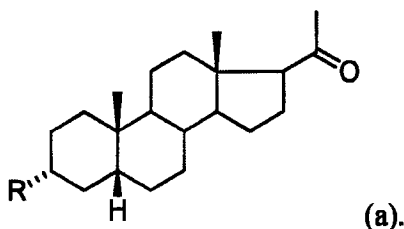
Neurosteroidy tedy významně modulují funkci membránových receptorů pro neuropřenašeče,
zejména GABA_A receptorů, NMDA receptorů a sigma 1 – receptorů. Tyto mechanismy jsou zod-
35 povědné za psychofarmakologické účinky steroidů a částečně vysvětlují jejich antikonvulzivní,
anxiolytické, neuroprotektivní a sedativní účinky, stejně jako jejich vliv na procesy učení a pamě-
ti. Například u pregnanolon–sulfátu bylo prokázáno, že je schopen zvrátit kognitivní deficit u zví-
řat vyššího věku a že má protektivní účinek na paměť v několika modelech amnézie. Nové studie
dokládají přímý vliv neurosteroidů i na nitrobuněčné receptory. Ačkoliv například nejsou dokla-
40 dy o přímé vazbě na glukokortikoidní receptor, neurosteroidy modulují účinek kortikoidů nepří-
mo, prostřednictvím interakcí s proteinkinázami A, C, MAPK (mitogeny aktivovaná proteinkiná-
za) nebo CAMK (kalmodulin–dependentní proteinkináza). Navíc byl prokázán vliv pregnanolonu
a pregnanolon–sulfátu na proteiny asociované s mikrotubuly a na akceleraci polymerace mikrotu-
bulů, čímž dochází k ovlivnění neuronální plasticity. Tyto nově popsané účinky neurosteroidů
45 jsou dosud velmi málo prozkoumané, lze však předpokládat jejich roli v neuroprotektivitě.

Sulfatované a tedy amfifilní steroidní sloučeniny obecně hematoencefalickou bariéru nepronikají,
ale bylo zjištěno, že pregnanolon–sulfát podaný nitrožilně přes hematoencefalickou bariéru pro-
50 niká (Neuropharmacology 61, 61–68 (2011)). V transportu sulfatovaných analogů se pravdě-
podobně uplatňují aktivní mechanismy spojené s transportním proteinem organických iontů
(OATP), který je exprimován v buňkách mozkové tkáně.

Inhibitory NMDA receptoru jsou i některé steroidní deriváty a to zejména redukované deriváty
progesteronu. Jejich neuroprotektivní vlastnosti jsou popsány i v patentové literatuře
55 (US 2012/71453 A1, 2012; WO 2009/108804 A a WO 2009/108809).

Tyto látky účinkují pouze za splnění některých strukturních předpokladů (J. Pharmacol. Exp. Ther. 293, 747–754 (2000)). Nezbytným strukturním požadavkem je hákovitý tvar molekuly; tento požadavek splňují deriváty s *3alfa,5beta*–konfigurací steroidního skeletu, a také v menší míře *3alfa,5alfa*–deriváty. Kromě toho je aktivita podmíněna přítomností ionizovatelné skupiny ve vhodné vzdálenosti, tj. 2 až 8 atomů od steroidního jádra. Tato skupina může být kladně i záporně nabitá. V dosud uveřejněných člancích a patentové literatuře byl zároveň vždy uváděn jako nezbytný strukturní prvek přítomnost acetylového substituentu v poloze 17 steroidního skeletu. Tedy strukturní prvek, který se objevuje v progesteronu, pregnenolonu a pregnanolonech (Br. J. Pharmacol. 166, 1069–1083 (2012); Steroids 76 1409–1418, (2011); WO 2009/108804 A. a J. Med. Chem. 8, 426–432 (1965)).

Výjimkou je přihláška vynálezu US 3 132 160 (1964, patent nebyl udělen) týkající se androstano-
vých derivátů s anestetickým a transquilizním působením. U popsanych sloučenin je však analogicky s klinicky užívaným pregnanolonovým derivátem alfaxalonem, přítomen kyslíkový atom v poloze 11. Vzhledem ke skutečnosti, že výsledky testů ověřujících jakékoliv biologické vlastnosti těchto sloučenin nebyly nikde zveřejněny, považujeme aktivitu uvedenou ve zmíněné přihlášce vynálezu za spekulativní. Neuroprotektivní účinek steroidních derivátů s nabitým substituentem v poloze C–3 nárokují také naše dvě patentové přihlášky: WO 2010/003391 (Anionic pregnane compounds, method for their producing and use of them) a WO 2012/110010 (Pregnanolone derivatives substituted in 3alpha–position with the cationic group, method of their production, usage and pharmaceutical preparation involving them). Oba dokumenty nárokují pregnanové deriváty (polární substituent v poloze C–20) substituované v poloze C–3 anionickou či kationickou skupinou obecného vzorce a



Deriváty nárokované ve zde předkládané přihlášce vynálezu nejsou deriváty pregnanolonu, nemají ketoskupinu v poloze C–20. V případě, že nárokovaná sloučenina karbonylovou skupinu má, tato se ze strukturně–aktivitních důvodů nachází v poloze C–17 a jedná se tedy o androstanové deriváty. V případě jiných polárních modifikací v této části molekuly jde o deriváty s kyslíkatým substituentem v nižším oxidačním stupni (ether) než je C–20 keto skupina.

Odstranění polárního substituentu v poloze C–20, modifikace a substituce D–kruhu v poloze C–17 či C–16 nepolárními či lipofilními substituenty, stejně jako úplné odstranění steroidního D–kruhu, vedly pravděpodobně k lepší rozpustnosti těchto derivátů v membráně a vyšší afinitě k NMDA receptoru, jejímž důsledkem bylo v některých případech až několikanásobné snížení hodnot IC_{50} v porovnání s referenční sloučeninou (*3alfa,5beta*–pregnanolon–sulfát). Námi nárokované sloučeniny dokazují, že vyšší míru inhibice a hodnoty IC_{50} nižší než má referenční sloučenina nelze obecně predikovat, neboť substituce či modifikace na C–, případně D–kruhu v kombinaci s velikostí a složením substituentu v poloze C–3 je vždy zcela unikátní a není možné ji předem předvídat a strukturu navrhnout aditivním přístupem. Výše uvedená tvrzení jsou ilustrována příklady látek (Tabulka II) s hodnotou IC_{50} nižší než má referenční sloučenina.

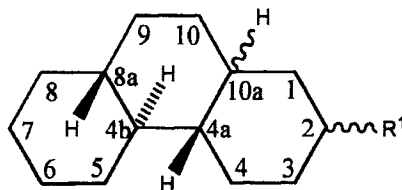
Podstata vynálezu

Předmětem vynálezu jsou sloučeniny s ochranným vlivem na nervovou soustavu, jejichž struktura obsahuje substituovaný tetradekahydrofenantren obecného vzorce I.

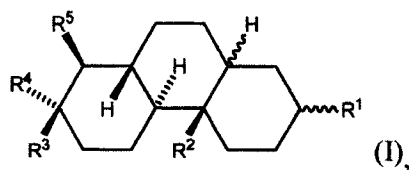
Předpokládá se jejich použití při léčení traumatického poranění mozku, ischemie, Alzheimerovy a Parkinsonovy choroby, zánětlivých procesů nervové soustavy, vaskulární demence, ischemie plodů i novorozenců, neuropatické bolesti, případně v obdobných procesech v humánní i veterinární medicíně. Předmětem vynálezu jsou i léčebné přípravky obsahující deklarované sloučeniny.

Tetradekahydrofenantrenový skelet může mít následující konfiguraci:

- (2*R*,4*aS*,4*bS*,8*aR*,10*aR*)–tetradekahydrofenantren
 10 (2*S*,4*aS*,4*bS*,8*aR*,10*aR*)–tetradekahydrofenantren
 (2*S*,4*aR*,4*bR*,8*aS*,10*aS*)–tetradekahydrofenantren,



- 15 Předmětem vynálezu jsou tedy amfifilní sloučeniny s tetradekahydrofenantrenovým skeletem obecného vzorce I



20 kde

R^1 je zvolen ze skupiny, zahrnující $(-OSO_3H)$, $HOOC-R^6-C(R^7)-R^8-$, nebo $R^9-R^{10}-C(R^{11})-R^{12}-$, kde

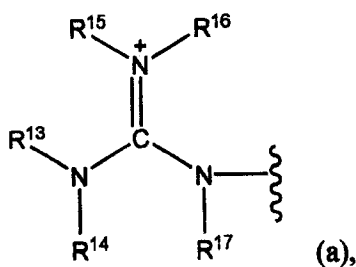
25 R^6 je C_1 až C_6 alkylen nebo C_2 až C_6 alkenylen s přímým nebo větveným řetězcem, popřípadě substituovaný jedním nebo více atomy halogenu či aminovou skupinou,

R^7 je tvořen atomem kyslíku, dusíku nebo síry vázaného dvojnou vazbou, nebo dvěma atomy vodíku.

30

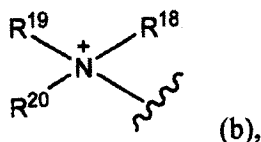
R^8 je jakýkoliv minimálně dvojnásobný atom, s výhodou atom dusíku, kyslíku nebo uhlíku,

R^9 znamená kationickou skupinu zvolenou z guanidylové skupiny obecného vzorce a



35

nebo kvartérní amoniové skupiny obecného vzorce b



kde R^{13} až R^{20} jsou vodíkové atomy nebo C_1 až C_6 alkylové či C_2 až C_6 alkenylové skupiny s přímým nebo větveným řetězcem,

5

R^{10} je C_1 až C_6 alkylen nebo C_2 až C_6 alkenylen s přímým nebo větveným řetězcem, který může být dále substituován jedním až 10 atomy halogenu, nebo aminoskupinou primární či substituovanou C_1 až C_4 alkylem s přímým nebo větveným řetězcem;

10

R^{11} je tvořen atomem kyslíku, dusíku nebo síry vázaného dvojnou vazbou, nebo dvěma atomy vodíku, a

15

R^{12} je zvolený z atomu kyslíku, dusíku nebo uhlíku a v případě, že R^{12} je uhlík či dusík, jsou jeho další valence obsazeny vodíkem, případně vodíky, přičemž kterýkoliv z vodíkových atomů může být nahrazen C_1 až C_4 alkylem, nebo C_2 až C_4 alkenylem;

R^2 je vodíkový atom nebo methyl;

20

R^3 je a) vodíkový atom, a potom

i) R^4 a R^5 jsou každý nezávisle vodíkový atom, nebo

25

ii) jeden z R^4 a R^5 je vodíkový atom a druhý z nich je C_1 až C_6 alkyl či C_2 až C_6 alkenyl s přímým nebo větveným řetězcem, který může být dále substituován v případě alkylu 1 – 13 a v případě alkenylu 1 – 9 atomy halogenu, případně dvojně vázaným atomem kyslíku nebo síry, přičemž v řetězci může být jedna z methylenových skupin nahrazena atomem kyslíku nebo síry,

30

b) C_1 až C_6 alkyl či C_2 až C_6 alkenyl s přímým nebo větveným řetězcem, který může být dále substituován v případě alkylu 1 – 13 a v případě alkenylu 1 – 9 atomy halogenu, případně dvojně vázaným atomem kyslíku nebo síry, přičemž v řetězci může být jedna z methylenových skupin nahrazena atomem kyslíku nebo síry, a potom

35

R^4 a R^5 jsou nezávisle na sobě vodíkovým atomem, nebo

40

c) C_5 či C_6 alicyklický či aromatický substituent, přičemž uhlíkové atomy mohou být funkcionalizovány 1 – 8 atomy halogenu v případě pětičlenného cyklu, nebo 1 – 10 halogenovými atomy v případě šestičlenného cyklu; a potom

45

i) R^4 je vodíkový atom a R^5 je zvolen z vodíkového atomu, nebo C_1 až C_6 alkylu či C_2 až C_6 alkenylu s přímým nebo větveným řetězcem, který může být dále substituován v případě alkylu 1 – 13 a v případě alkenylu 1 – 9 atomy halogenu, případně dvojně vázaným atomem kyslíku nebo síry, přičemž v řetězci může být jedna z methylenových skupin nahrazena atomem kyslíku nebo síry, nebo

50

ii) R^4 a R^5 znamenají alkylenový či alkenylenový substituent $-(CH_m)_n-$, kde $n = 3 - 4$, $m = 1 - 2$, vytvářející s původními uhlíkovými atomy skeletu v poloze 7 a 8 nasycený nebo nenasycený 5 nebo 6 členný cyklus, kde vodíkové atomy použitého alkenylenového substituentu mohou být substituovány nejméně jed-

ním atomem halogenu, nebo C₁ až C₄ alkylem, či C₂ až C₄ alkenylem s přímým nebo větveným řetězcem,

5 popřípadě jedna methylenová skupina v alkylenovém substituentu tvořícím cyklus může být nahrazena karbonylovou skupinou a uhlíkový atom ve vedlejší poloze cyklu substituován další methylenovou skupinou, anebo nahrazena atomem kyslíku nebo síry, přičemž pokud se jedná o atom síry, tento může být dále funkcionalizován atomem kyslíku;

10 nebo mohou být vodíkové atomy jedné methylenové skupiny v alkylenovém substituentu tvořícím cyklus nahrazeny skupinou –O–CH₂–, takže vytvoří oxiranový kruh,

15 d) skupina –CH₂–O–CH(CH₃)–, potom společně s prvním uhlíkem alkylenové skupiny tvořené R⁴ a R⁵, kde R⁴ a R⁵ znamenají alkylenový substituent –(CH_m)_n–, kde n = 3, m = 2, vytváří pětičlenný nasycený, methylovaný heterocyklus;

a enantiomery sloučenin podle obecného vzorce I,

20 s výhradou, že z obecného vzorce I jsou vyloučeny sloučeniny, kde R¹ je HO₂C–R⁶CR⁷–R⁸–, R⁶ je –(CH₂)₂–, R⁷ je atom kyslíku, R⁸ je atom kyslíku a zároveň R³ je methyl, R⁴ a R⁵ jsou společně skupina –(CH₂)₃–, vytvářející s původními uhlíkovými atomy tetradekahydrofenantrenového skeletu v poloze 7 a 8 nasycený pětičlenný cyklus; mající absolutní konfiguraci 3R,5S,8S,9S,10S,13S,14S.

25

Halogen je vybrán ze skupiny zahrnující –F, –Cl, –Br, –I.

30 Alkyl je rovný nebo rozvětvený nasycený; uhlovodíkový substituent, obsahující v jednom ztělesnění jeden až šest uhlíkových atomů, v jiném uspořádání jeden až čtyři uhlíkové atomy, zvolený z methylu, ethylu, *n*-propylu, *iso*-propylu, *n*-butylu, *sec*-butylu, *tert*-butylu, isobutylu, amylu, *t*-amylu, isoamylu, *n*-pentylu, *n*-hexylu a podobně; odtržením jednoho vodíkového atomu z koncové CH₃ skupiny alkyly vznikne příslušný alkylen.

35 Alkenyl je nenasycený uhlovodíkový substituent zahrnující dieny a trieny o rovných nebo rozvětvených řetězcích, obsahující 2 až 6 uhlíkových atomů, případně 2 až 4 uhlíkové atomy, s výhodou zvolený z vinylu, allylu, 1-butenylu, 2-butenylu, 1-pentenylu, 2-pentenylu, 3-pentenylu, 1-hexenylu, 2-hexenylu, 3-hexenylu a podobně; odtržením jednoho vodíkového atomu z koncové skupiny CH nebo CH₂ vznikne odpovídající alkenylen.

40 Cykloalkyl nebo alicyklická skupina je zvolena z nasycených cyklických uhlovodíkových radikálů obsahujících 3 až 6 uhlíkových atomů, s výhodou z cyklopropylu, cyklobutylu, cyklopentylu, cyklohexylu.

45 Cykloalkenylová skupina je s výhodou zvolena z cyklopropenylu, 1-cyklobutenylu, 2-cyklobutenylu, 1-cyklopentenylu, 2-cyklopentenylu, 3-cyklopentenylu, 1-cyklohexenylu, 2-cyklohexenylu, 3-cyklohexenylu.

Aromatická skupina o šesti uhlíkových atomech, ať sama o sobě, nebo v kombinaci s jinými radikály, je s výhodou zvolena z fenylu.

50

Heterocyklus nebo heterocyklická skupina je zvolena z C₃ až C₆ nearomatických cyklických uhlovodíků, obsahujících jeden či více heteroatomů, zvolených z O, N a S. Nearomatické uhlovodíky, obsahující výše zmíněné heteroatomy, mohou být nasycené či částečně nasycené monocyklické radikály.

55

Ve výhodném provedení jsou předmětem vynálezu následující sloučeniny obecného vzorce I:

pyridinium (2*R*,4*aS*,4*bS*,8*aR*,10*aR*)–4*a*–methyltetradekahydrofenantren–2–yl–sulfát (8),

5 pyridinium (2*R*,4*aS*,4*bS*,7*S*,8*aS*,10*aR*)–7–(methoxymethyl)–4*a*,7,8–trimethyltetradeka–hydrofenantren–2–yl–sulfát (18),

4–(((2*R*,4*aS*,4*bS*,7*S*,8*aS*,10*aR*)–7–(methoxymethyl)–4*a*,7,8–trimethyltetradeka–hydrofenantren–2–yl)oxy)–4–oxobutanová kyselina (19),

10 pyridinium (2*R*,4*aS*,7*S*,8*S*,10*aR*)–7–(methoxykarbonyl)–4*a*,7,8–trimethyltetradeka–hydrofenantren–2–yl–sulfát (22),

15 4–(((2*R*,4*aS*,4*bS*,7*R*,8*aS*,10*aR*)–4*a*,7–dimethyltetradekahydrofenantren–2–yl)oxy)–4–oxobutanová kyselina (34),

pyridinium (2*R*,4*aS*,4*bS*,7*R*,8*aS*,10*aR*)–4*a*,7–dimethyltetradekahydrofenantren–2–yl–sulfát (35),

20 methyl (2*S*,4*aS*,4*bS*,7*R*,8*aR*,10*aS*)–2,4*b*–dimethyl–7–(sulfooxy)tetradekahydrofenantren–2–karboxylát (40),

pyridinium (3*R*,5*R*,8*S*,9*S*,10*S*,13*S*,14*S*)–10,13–dimethylhexadekahydro–1*H*–cyklopenta–[a]fenantren–3–yl–sulfát (49),

25 2–(((3*R*,5*R*,8*S*,9*S*,10*S*,13*S*,14*S*)–10,13–dimethylhexadekahydro–1*H*–cyklopenta–[a]fenantren–3–yl)oxy)–2–oxoethanová kyselina (50),

2–(((3*R*,5*R*,8*S*,9*S*,10*S*,13*S*,14*S*)–10,13–dimethylhexadekahydro–1*H*–cyklopenta–[a]fenantren–3–yl)oxy)–2–oxopropanová kyselina (51),

30 2–(((3*R*,5*R*,10*S*,13*S*,14*S*)–10,13–dimethylhexadekahydro–1*H*–cyklopenta[a]fenantren–3–yl)amino)–2–oxooctová kyselina (59),

35 ((3*R*,5*R*,8*S*,9*S*,10*S*,13*S*,14*S*)–10,13–dimethylhexadekahydro–1*H*–cyklopenta[a]fenantren–3–yl)amino)–3–oxopropanová kyselina (61),

4–(((3*R*,5*R*,8*S*,9*S*,10*S*,13*S*,14*S*)–10,13–dimethylhexadekahydro–1*H*–cyklopenta[a]fenantren–3–yl)oxy)–*N,N,N*–trimethyl–4–oxobutan–1–amonium chlorid (62),

40 4–(((3*R*,5*R*,8*R*,9*S*,10*S*,13*R*,14*S*)–10,13–dimethyl–2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15–tetradekahydro–1*H*–cyklopenta[a]fenantren–3–yl)oxy)–4–oxobutanová kyselina (64),

3–(((3*R*,5*R*,8*R*,9*S*,10*S*,13*R*,14*S*)–10,13–dimethyl–2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15–tetradekahydro–1*H*–cyklopenta[a]fenantren–3–yl)oxy)–3–oxopropanová kyselina (65),

45 3–(((3*R*,5*R*,8*R*,10*S*,13*S*,14*S*)–10,13–dimethyl–17–metylenhexadekahydro–1*H*–cyklopenta[a]fenantren–3–yl)oxy)–3–oxopropanová kyselina (67),

50 4–(((3*R*,5*R*,8*R*,9*S*,10*S*,13*S*,14*S*)–10,13–dimethyl–17–metylenhexahydro–1*H*–cyklopenta[a]fenantren–3–yl)oxy)–4–oxobutanová kyselina (68),

4–(((3*R*,5*R*,8*R*,9*S*,10*S*,13*S*,14*S*)–10,13–dimethyl–17–metylenhexadekahydro–1*H*–cyklopenta–[a]fenantren–3–yl)oxy)–4–oxopentanová kyselina (69),

- 2-((3*R*,5*R*,8*R*,9*S*,10*S*,13*S*,14*S*)-10,13-dimethyl-17-oxohexadekahydro-1*H*-cyklopenta[*a*]fenantren-3-yl)octová kyselina (74),
- 2-(((3*R*,5*R*,8*R*,9*S*,10*S*,13*S*,14*S*)-10,13-dimethyl-17-methylenhexadekahydro-1*H*-cyklopenta[*a*]fenantren-3-yl)oxy)-*N,N,N*-trimethyl-2-oxoethan-1-ammonium chlorid (76),
- 3-(((3*R*,5*R*,8*R*,9*S*,10*S*,13*S*,14*S*,*Z*)-17-ethyliden-10,13-dimethylhexadekahydro-1*H*-cyklopenta[*a*]fenantren-3-yl)oxy)-3-oxopropanová kyselina (83),
- 5-(((3*R*,5*R*,8*R*,9*S*,10*S*,13*S*,14*S*,*Z*)-17-ethyliden-10,13-dimethylhexadekahydro-1*H*-cyklopenta[*a*]fenantren-3-yl)oxy)-5-oxopentanová kyselina (85),
- 3-(((3*R*,5*R*,8*R*,9*S*,10*S*,13*S*,14*S*,17*R*)-10,13-dimethyl-17-(prop-1-en-2-yl)hexadekahydro-1*H*-cyklopenta[*a*]fenantren-3-yl)oxy)-3-oxopropanová kyselina (88),
- pyridinium (3*R*,5*R*,8*R*,9*S*,10*S*,13*S*,14*S*,17*S*)-17-jodo-10,13-dimethylhexadekahydro-1*H*-cyklopenta[*a*]fenantren-3-yl-sulfát (93)
- pyridinium (3*R*,5*R*,8*R*,9*S*,10*S*,13*S*,14*S*)-17,17-difluor-10,13-dimethylhexadekahydro-1*H*-cyklopenta[*a*]fenantren-3-yl-sulfát (95),
- pyridinium (3*R*,5*R*,8*R*,9*S*,10*S*,13*S*,14*S*,17*S*)-10,13-dimethylhexadekahydrospiro[cyklopenta[*a*]fenantren-17,2'-oxiran]-3-yl-sulfát (97),
- pyridinium (2*R*,4*aS*,4*bS*,6*aS*,10*bS*,6*aS*,12*aR*)-4*a*,6*a*-dimethyloktadekahydrochrysen-2-yl-sulfát (101),
- (4*S*)-4-amino-5-(((2*R*,4*aS*,4*bS*,6*aS*,10*bS*,12*aR*)-4*a*,6*a*-dimethyloktadekahydrochrysen-2-yl)oxy)-5-oxopentanová kyselina (106),
- pyridinium (3*R*,5*R*,8*S*,9*S*,10*S*,13*R*,14*S*)-10,13-dimethyl-16-methylenhexadekahydro-1*H*-cyklopenta[*a*]fenantren-3-yl-sulfát (114),
- pyridinium (3*R*,5*R*,8*R*,9*S*,10*S*,13*S*,14*S*)-10,13-dimethyl-17-methylenhexadekahydro-1*H*-cyklopenta[*a*]fenantren-3-yl-sulfát (116),
- pyridinium (3*R*,5*R*,8*S*,9*S*,10*S*,13*R*,14*S*,17*S*)-10,13,17-trimethylhexadekahydro-1*H*-cyklopenta[*a*]fenantren-3-yl-sulfát (117),
- pyridinium (3*R*,5*R*,8*S*,9*S*,10*S*,13*S*,14*R*,17*R*)-10,17-dimethylhexadekahydro-1*H*-cyklopenta[*a*]fenantren-3-yl-sulfát (118),
- pyridinium (3*R*,5*R*,8*S*,9*S*,10*S*,13*R*,14*R*,17*S*)-10,17-dimethylhexadekahydro-1*H*-cyklopenta[*a*]fenantren-3-yl-sulfát (119),
- pyridinium (3*R*,5*R*,8*S*,9*S*,10*S*,13*R*,14*S*,17*S*)-17-ethyl-10,13-dimethylhexadekahydro-1*H*-cyklopenta[*a*]fenantren-3-yl-sulfát (120),
- pyridinium (3*R*,5*R*,8*R*,9*S*,10*S*,13*S*,14*S*,17*R*)-10,13-dimethyl-17-(prop-1-en-2-yl)hexadekahydro-1*H*-cyklopenta[*a*]fenantren-3-yl-sulfát (121),
- pyridinium (3*R*,5*R*,8*R*,9*S*,10*S*,13*R*,14*S*,17*R*)-17-isopropyl-10,13-dimethylhexadekahydro-1*H*-cyklopenta[*a*]fenantren-3-yl-sulfát (122),

pyridinium (3*R*,5*R*,8*R*,9*S*,10*S*,13*R*,14*S*,17*R*)-17-((*R*)-sec-butyl)-10,13-dimethylhexadeca-
hydro-1*H*-cyklopenta[*a*]fenantren-3-yl-sulfát (123),

5 pyridinium (3*S*,3*aS*,5*bR*,7*aR*,9*R*,11*aS*,11*bS*,13*aR*)-3,11*a*-dimethylhexadecahydro-1*H*,3*H*-
nafto[2',1':4,5]indeno[1,7*a*-*c*]furan-9-yl-sulfát (124),

pyridinium (3*R*,5*R*,8*R*,9*R*,10*S*,13*S*,14*S*)-13-methylhexadecahydro-1*H*-cyklopenta[*a*]fenantren-
3-yl-sulfát (126),

10 pyridinium (3*R*,5*S*,8*R*,9*R*,10*S*,13*S*,14*S*)-10,13-dimethylhexadecahydro-1*H*-cyklopenta[*a*]fenan-
tren-3-yl-sulfát (127),

pyridinium (2*S*,4*aR*,4*bR*,8*aS*,10*aS*)-4*a*-methyltetradecahydrofenantren-2-yl-sulfát (128),

15 (4*S*)-4-amino-5-(((3*R*,5*R*,8*S*,9*S*,10*S*,13*S*,14*S*)-10,13-dimethylhexadecahydro-1*H*-cyklopenta-
[*a*]fenantren-3-yl)oxy)-5-oxopentanová kyselina (130).

20 Dalším předmětem vynálezu jsou amfifilní sloučeniny s tetradekahydrofenantrenovým skeletem
obecného vzorce I a jemu odpovídající výše uvedené konkrétní sloučeniny, pro použití jako léči-
va.

25 Význakem vynálezu je použití amfifilních sloučenin s tetradekahydrofenantrenovým skeletem
obecného vzorce I a jemu odpovídajících výše uvedených konkrétních sloučenin pro léčení
neuropsychiatrických poruch souvisejících s nerovnováhami glutamátergního neuropřenašečové-
ho systému, jako jsou ischemické poškození centrální nervové soustavy, neurodegenerativní změn-
y a poruchy centrální nervové soustavy, afektivní poruchy, deprese, post-traumatická stresová
porucha a nemoci související se stresem, anxiety, schizofrenie a psychotické poruchy, bolest,
závislosti, roztroušená skleróza, epilepsie, gliomy.

30 Předmětem vynálezu je rovněž použití amfifilních sloučenin s tetradekahydrofenantrenovým ske-
letem obecného vzorce I pro výrobu veterinárního nebo humánního farmaceutického přípravku
pro léčení neuropsychiatrických poruch souvisejících s dysbalancemi glutamátergního neuropře-
našečového systému, jako jsou ischemické poškození centrální nervové soustavy, neurodegenera-
tivní změny a poruchy centrální nervové soustavy, afektivní poruchy, deprese, post-traumatická
35 stresová porucha a nemoci související se stresem, anxiety, schizofrenie a psychotické poruchy,
bolest, závislosti, roztroušená skleróza, epilepsie, gliomy.

40 Dále je předmětem vynálezu i použití amfifilních sloučenin s tetradekahydrofenantrenovým ske-
letem majících obecný vzorec I pro výrobu standardů neuroprotektiv, antidepressiv, anxiolytik,
stabilizátorů nálad, hypnotik, sedativ, analgetik, anestetik, antipsychotik, prokognitiv a neurolep-
tik, případně analytických standardů používaných v experimentálním výzkumu a analytické che-
mii či jako sloučenin obsažených v potravinových doplňcích či kosmetických přípravcích urče-
ných pro zlepšování reakcí jednotlivých částí organismu na zvýšený stres zejména oxidativní,
45 nutriční a způsobený volnými radikály, případně na stárnutí.

50 Předmětem vynálezu je také farmaceutický prostředek pro humánní i veterinární použití, obsahu-
jící jako aktivní složku amfifilní sloučeninu s tetradekahydrofenantrenovým skeletem obecného
vzorce I nebo jednu z výše uvedených konkrétních amfifilních sloučenin odpovídajících obecné-
mu vzorci I.

Předložený vynález konečně zahrnuje i výše uvedený farmaceutický prostředek pro léčení neuro-
psychiatrických poruch souvisejících s nerovnováhami glutamátergního neuropřenašečového
systému, jako jsou ischemické poškození centrální nervové soustavy, neurodegenerativní změny
a poruchy centrální nervové soustavy, afektivní poruchy, deprese, post-traumatická stresová po-

rucha a nemoci související se stresem, anxieta, schizofrenie a psychotické poruchy, bolest, závislosti, roztroušená skleróza, epilepsie, gliomy.

5 Předkládaný vynález bude dále ozřejmen uvedenými příklady provedení, které však nemají být chápány jako omezující jeho rozsah.

Příklady uskutečnění vynálezu

10 Seznam zkratk:

	CHCl ₃	chloroform
	DMSO	dimethylsulfoxid
	MS	hmotnostní spektrometrie
15	HRMS	hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením
	Boc	<i>tert</i> -butoxykarbonyl
	EI	ionizace elektronovým nárazem
	ESI	ionizace elektrosprejem
	ekv.	ekvivalent
20	IČ	infračervená spektroskopie
	MS	hmotnostní spektroskopie
	NMR	nukleární magnetická rezonance
	<i>t</i> -Bu	terciární butyl
	Ac	acetyl
25	HEK	lidské embryonální ledvinové buňky
	GFP	zelený fluorescentní protein
	IC ₅₀	koncentrace, při které dochází k 50% inhibici
	Opti-MEM [®] I	minimální esenciální médium, výrobek firmy Invitrogen
	DHEA	5-dehydroepiandrosteron
30	EGTA	kyselina ethylenglykoltetraoctová
	EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
	HEPES	kyselina (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethanesulfonová

Syntetické postupy

35 Pro změření bodů tání byl použit přístroj Hund-Wetzlar H 600 (Helmut Hund, Německo). Vzor-
ky pro analýzu byly sušeny nad oxidem fosforečným při 50 °C a tlaku 100 Pa. Optická rotace
byla měřena v chloroformu polarimetrem Autopol IV (Rudolf Research Analytical, Flanders,
USA), $[\alpha]_D$ hodnoty jsou uvedeny v $10^{-1} \cdot \text{deg} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ a byly kompenzovány na standardní teplotu
40 20 °C. Infračervená spektra byla měřena v roztocích vzorků v chloroformu nebo v tabletách bro-
midu draselného pomocí spektrometru Bruker IFS 55, vlnočty jsou udány v cm^{-1} . ¹H NMR spek-
tra byla měřena v FT modu při 24 °C a 400 MHz na spektrometru Bruker AVANCE-400 v deu-
terochloroformu nebo deuteromethanolu, s tetramethylsilanem (TMS) jako vnitřním standardem.
Chemické posuny jsou udány v ppm (δ -stupnice), interakční konstanty (J) jsou udány v Hz. Mul-
45 tiplicity signálů jsou označeny následovně: s – singlet, d – dublet, t – triplet, q – kvadruplet, m –
multiplet, písmeno b označuje široký signál (broad). Všechna spektra byla interpretována jako
spektra prvního řádu. Hmotnostní spektra byla měřena na spektrometrech ZAB-EQ (při 70 eV)
nebo LCQ Classic (Thermo Finnigan). Při zpracování reakčních směsí byl používán vodný roz-

tok kyseliny chlorovodíkové (5%), případně nasycený vodný roztok hydrogenuhličitanu sodného. Tenkovrstvá chromatografie (TLC) byla prováděna na deskách pokrytých vrstvičkou silikagelu (ICN Biochemicals). Preparativní sloupcová chromatografie byla prováděna na silikagelu Fluka (60 μm). K detekci sloučenin na TLC deskách bylo použito ponoření do 50% vodného roztoku kyseliny sírové (98%) v metanolu s následným zahřátím na 300 až 400 °C. Rozpouštědla byla z roztoků odpařována na vakuové odparce (0,25 kPa) při teplotě lázně 40 °C. Mobilní fáze pro sloupcovou chromatografii je uvedena vždy u experimentu.

Pro názvy sloučenin bylo použito přednostně doporučené IUPAC názvosloví (PIN) a v případech kdy to bylo vhodné i názvosloví odvozené od příslušných steroidních derivátů.

Pro přípravu testovaných aktivních sloučenin bylo využito syntéz *de-novo* i modifikace vhodných komerčně dostupných prekurzorů.

15 Obecné postupy

Obecný postup I – příprava C–3 sulfátu

Ke směsi alkoholu a komplexu oxid sírový–pyridin (2 ekv.) sušené za sníženého tlaku (30 min, 25 °C, 100 Pa) byl přidán čerstvě sušený chloroform (10 ml na 100 mg) a sušený pyridin (3 kapky) a reakční směs byla míchána pod inertní atmosférou za teploty místnosti 4 h. Potom byla reakční směs chlazená na –5 °C po dobu 18 h, chladná filtrována přes vatku. Filtrát byl odpařen za sníženého tlaku a odparek sušen (1 hod, 25 °C, 100 Pa). Odparek byl znovu rozmíchán v čerstvě sušeném dichlormethanu (minimální množství) a chlazen na –5 °C po dobu 2 h. Pevné podíly byly odfiltrovány, filtrát odpařen za sníženého tlaku a sušen (1 h, 25 °C, 100 Pa).

Obecný postup II – příprava C–3 hemisukcinátu

Ke směsi alkoholu a anhydridu kyseliny jantarové (7 ekv.) sušené přes noc při 50 °C byly přidány suchý pyridin (5 ml na 100 mg) a 4–(*N,N*-dimethylamino)pyridin (0,5 ekv.). Reakční směs byla zahřívána na 120 °C a průběh reakce byl sledován na TLC. Potom byla směs nalita do vody a produkt extrahován chloroformem. Spojené organické extrakty byly promyty nasyceným vodným roztokem chloridu sodného a sušeny bezvodým síranem sodným.

35 Obecný postup III – příprava C–3 hemimalonátu

Alkohol v sušeném toluenu (5 ml na 100 mg) s pyridinem (0,75 ml na 100 mg) byl přidán do suché reakční baňky s 2,2–dimethyl–4,6–dioxo–1,3–dioxolanem (Meldrumova kyselina, 1,1 ekv.). Reakční směs byla za míchání zahřívána na 80 °C a průběh reakce byl sledován na TLC. Poté byla ochlazená na teplotu místnosti, zředěna vodou a okyselena zředěnou kyselinou chlorovodíkovou (5%). Steroid byl extrahován ethyl–acetátem, spojené organické fáze byly promyty zředěnou kyselinou chlorovodíkovou (5%), vodou a sušeny bezvodým síranem sodným. Rozpouštědla byla odpařena za sníženého tlaku.

45 Obecný postup IV – příprava C–3 hemiglutarátu

Hydroxyderivát a anhydrid kyseliny glutarové (258 mg, 2,26 mmol) byly sušeny při 50 °C přes noc. Potom byl přidán sušený pyridin (3 ml na 100 mg) a 4–(*N,N*-dimethylamino)pyridin (0,3 ekv.) a směs byla zahřívána na 120 °C a průběh reakce byl sledován na TLC. Poté byla vychlazená na teplotu místnosti, činidla rozložena nalitím do vody a produkt extrahován chloroformem. Spojené organické extrakty byly promyty nasyceným roztokem chloridu sodného a sušeny bezvodým síranem sodným. Rozpouštědla byla odpařena za sníženého tlaku.

Obecný postup V – katalytická hydrogenace

5 K roztoku příslušné sloučeniny v etanolu (5 ml na 100 mg) a ethyl-acetátu (2,5 ml na 100 mg) byl přidán katalyzátor (Pd/CaCO₃, 5%) a směs byla intenzivně míchána pod mírným přetlakem vodíku za teploty místnosti a průběh reakce byl sledován na TLC. Poté byl katalyzátor odstraněn filtrací a rozpouštědla odpařena za sníženého tlaku.

Obecný postup VI – Wilkinsonova dekarbonylace

10 Směs příslušné látky a tris(trifenylofosfin)rhodium(I) chloridu (1,1 ekv.) v benzonitrilu (24 ml na 1,3 g) byla zahřívána pod inertní atmosférou na 160 °C po dobu 20 h. Poté byla reakční směs ochlazena na teplotu místnosti a filtrací odstraněny žluté pevné podíly. Filtrát byl odpařen za sníženého tlaku.

15 Obecný postup VI – Wittigova reakce za použití *n*-butyl lithia

n-Butyl lithium (2,5M v hexanu, 1,1 ekv.) bylo přidáno za studena po kapkách k roztoku methyl-trifenylofosfonium iodidu (1 ekv.) v sušeném tetrahydrofuranu (30 ml na 4 g) pod inertní atmosférou dusíku a směs byla míchána a zahřívána na 80 °C po dobu 2 h. Poté byl přidán roztok sloučeniny (0,5 ekv.) v sušeném tetrahydrofuranu (minimální množství). Reakční směs byla míchána při 80 °C a průběh reakce byl sledován na TLC. Reakce byla ukončena přidáním nasyceného roztoku chloridu amonného. Produkt byl extrahován do chloroformu, spojené organické extrakty byly promyty nasyceným vodným roztokem chloridu sodného a sušeny bezvodým síranem sodným. Rozpouštědla byla odpařena za sníženého tlaku.

25

Příklad 1: (*S*)-6-(Ethylendioxy)-8a-methyl-3,4,6,7,8,8a-hexahydronaftalen-1(2*H*)-on (2)

30 Diketon 1 (7,36 g, 41.3 mmol), triethyl-orthoformiát (7,58 ml, 45,6 mmol) a ethylen glykol (12,7 ml, 228 mmol) byly rozpuštěny v dichlormethanu (50 ml) a vychlazeny na -10 °C. Pak byl přidán trifluormethansulfonát (150 µl, 830 µmol) a směs byla míchána při -10 °C 1 h. Poté byl přidán triethylamin (200 µl, 1,43 mmol) a celá směs nalita do nasyceného vodného roztoku hydrogenuhličitanu sodného. Produkt byl extrahován do dichlormethanu (3x 50 ml). Spojené organické extrakty byly sušeny bezvodým síranem hořečnatým a rozpouštědla odpařena za sníženého tlaku. Odparek chromatografií na sloupci silikagelu (150 g, 20 % ethyl-acetátu v petrol-éteru) poskytl 7,88 g (86 %) monoketálu 2: t.t. 48 až 51 °C. $[\alpha]_D^{20} +97,7$ (*c* 0,27, CHCl₃). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 1,32 (s, 3H, H-19), 1,65 (gt, *J*₁ = 13,3, *J*₂ = 4,6, 1H, H-7b), 1,69-1,77 (m, 1H, H-1b), 1,77-1,89 (m, 2H, H-2), 1,99-2,07 (m, 1H, H-7a), 2,16-2,08 (m, 1H, H-1b), 2,27 (dddd, *J*₁ = 14,1, *J*₂ = 4,5, *J*₃ = 2,7, *J*₄ = 2,1, 1H, H-6b), 2,37 (dddd, *J*₁ = 15,2, *J*₂ = 4,7, *J*₃ = 2,9, *J*₄ = 1,8 Hz, CH-8b), 2,56 (dddd, *J*₁ = 14,0, *J*₂ = 13,5, *J*₃ = 5,0, *J*₄ = 1,9, 1H, H-6a), 2,64 (ddd, *J*₁ = 15,2, *J*₂ = 13,4, *J*₃ = 6,3 1H, H-8a), 5,41 (t, *J* = 1,3, 1H, H-4), 3,87 - 4,02 (m, 4H, OCH₂CH₂O). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ 212,52 (C, C-9), 146,58 (C, C-5), 123,44 (CH, C-4), 105,41 (C, C-3), 64,58 (CH₂, OCH₂CH₂O), 64,28 (CH₂, OCH₂CH₂O), 50,23 (C, C-10), 37,82 (CH₂, C-8), 30,82 (CH₂, C-6), 29,77 (CH₂, C-2), 28,60 (CH₂, C-1), 24,27 (CH₂, C-7), 23,81 (CH₃, C-19). IČ spektrum (CHCl₃): 2953, 1461, 1447, 1442 (CH₂); 2975 2885 (CH₃); 1711 (C=O); 1661 (C=C). MS (ESI) *m/z*: 223 (40 %, M + H), 245 (100 %, M + Na). HR-MS (ESI) *m/z*: Pro C₁₃H₁₈NaO₃ (M+Na) vypočteno 245,1148; nalezeno: 245,1148. Pro C₁₃H₁₈O₃ (222,3) vypočteno: 70,24 % C, 8,16 % H; nalezeno: 69,86 % C, 8,19 % H.

45

50

Příklad 2: (*S*)-7-(Ethylendioxy)-4b-methyl-1,2,4b,5,6,7,9,10-oktahydrofenantren-3(4H)-on (3a) a (4b*S*,10a*S*)-7-(ethylendioxy)-4b-methyl-1,2,4b,5,6,7,10,10a-oktahydrofenantren-3(9H)-on (3b)

5

Hydrid sodný (9,39 g, 235 mmol, 60% suspenze v oleji, promytý tetrahydrofuranem, 3x 25 ml) rozmíchaný v tetrahydrofuranu (10 ml) byl přidán k vychlazenému (0 °C) roztoku ketonu 2 (20,87 g, 93,89 mmol) v suchém ethyl formiátu (250 ml). Pak byl během 15 min přikapán metanol (3,80 ml, 93,9 mmol) při teplotě 0 °C. Reakční směs během několika minut zhoustla a po 30 min byla ohřáta na teplotu místnosti. Po dalších 30 min byla reakce ukončena přidáním nasyceného roztoku chloridu amonného (400 ml) a produkt byl extrahován ethyl-acetátem (3x 100 ml). Spojené organické extrakty byly sušeny bezvodým síranem sodným, rozpouštědla odpařena za sníženého tlaku a bylo získáno kvantitativní množství krystalického formyl derivátu: ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 1,37 (3H, s, CH₃-19), 1,82 – 2,13 (4H, m, CH₂-1, CH₂-2), 2,22 – 2,43 (2H, m, CH₂-6), 2,30 – 2,57 (2H, m, CH₂-7), 3,84 – 4,05 (4H, m, OCH₂CH₂O), 5,39 (1H, t, *J* = 1,1, CH-4), 8,54 (1H, s, CHOH), 14,67 (1H, bs, OH). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ 190,20 (C, C-9), 185,76 (CH, CHOH), 144,96 (C, C-5), 122,52 (CH, C-4), 106,76 (C, C-8), 105,32 (C, C-3), 64,72 (CH₂, OCH₂CH₂O), 64,26 (CH₂, OCH₂CH₂O), 41,98 (C, C-10), 30,34 (CH₂, C-1), 29,89 (CH₂, C-2), 29,14 (CH₂, C-6), 24,28 (CH₂, C-7), 23,75 (CH₃, C-19).

15

K připravenému formyl derivátu byl přidán butenon (8,77 ml, 105 mmol) a triethylamin (245 μl, 1,75 mmol) a reakční směs byla míchána přes noc. Nadbytek butenonu byl odpařen za sníženého tlaku a surová směs byla rozpuštěna v metanolu (320 ml), roztok byl přidán k vodnému roztoku hydroxidu draselného (15,25 g, 272 mmol) a směs byla zahřívána k varu pod zpětným chladičem a inertní atmosférou 30 min. Roztok byl ochlazen na teplotu místnosti, reakce ukončena přidáním nasyceného roztoku chloridu amonného (400 ml) a produkt byl extrahován ethyl-acetátem (3x 330 ml). Spojené organické extrakty byly promyty nasyceným vodným roztokem chloridu sodného (400 ml) a sušeny bezvodým síranem sodným. Rozpouštědla byla odpařena za sníženého tlaku a odparek chromatografován na sloupci silikagelu (350 g, 0,5 % triethylaminu a 20 % až 50 % ethyl-acetátu v petroléteru). Bylo získáno 5,49 g (22 %) derivátu 3b a 14,53 g (58 %) derivátu 3a.

3a: t.t. 105–108 °C. $[\alpha]_D^{20} +149,8$ (*c* 0,26, CHCl₃). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 1,31 (3H, s, CH₃-19), 1,67 (1H, dtd, *J*₁ = 14,1, *J*₂ = 12,8, *J*₃ = 4,6, CH-7b), 1,61 (1H, ddd, *J*₁ = 13,8, *J*₂ = 10,2, *J*₃ = 4,6, CH-14b), 1,91 – 1,82 (1H, m, CH-1b), 1,85 – 1,94 (2H, m, CH₂-2), 1,93 – 2,00 (1H, m, CH-7a), 2,00 – 2,10 (1H, m, CH-1a), 2,05 – 2,14 (1H, m, CH-14a), 2,21 (1H, ddd, *J*₁ = 14,0, *J*₂ = 3,9, *J*₃ = 2,8, CH-6b), 2,30 (1H, ddd, *J*₁ = 16,5, *J*₂ = 14,1, *J*₃ = 5,0, CH-13b), 2,39 – 2,45 (1H, m, CH-13a), 2,47 (1H, tdd, *J*₁ = 14,0, *J*₂ = 4,4, *J*₃ = 1,9, CH-6a), 2,68 (1H, dtd, *J*₁ = 12,3, *J*₂ = 10,1, *J*₃ = 5,0, *J*₄ = 2,2, CH-8), 3,86 – 4,06 (4H, m, OCH₂CH₂O), 5,36 (1H, d, *J* = 1,3, H-4), 5,97 (1H, d, *J* = 2,1, CH-11). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ 200,34 (C, C-12), 172,37 (C, C-9), 147,21 (C, C-5), 122,65 (CH, C-11), 122,26 (CH, C-4), 105,40 (C, C-3), 64,67 (CH, OCH₂CH₂O), 64,33 (CH, OCH₂CH₂O), 41,39 (C, C-10), 36,42 (CH₂, C-13), 35,22 (CH, C-8), 34,11 (CH₂, C-7), 32,06 (CH₂, C-1), 31,43 (CH₂, C-6), 30,02 (CH₂, C-2), 29,51 (CH₂, C-14), 27,20 (CH₂, C-19). IČ spektrum (CHCl₃): 2978 (CH₃); 2941 (CH₂); 2887 (CH₃); 2865 (CH₂); 1664 (C=O); 1604 (C=C); 1454, 1451 (CH₂); 1379 (CH₃); 1361, 1168, 1132 (CH₂); 1091, 1078, 946, 883 (kruh). MS (ESI) *m/z*: 275 (57 %, M + H), 297 (100 %, M + Na). HR-MS (ESI) *m/z*: Pro C₁₇H₂₃O₃ (M+H) vypočteno: 275,1642; nalezeno: 275,1644. Pro C₁₇H₂₂O₃ (274,2) vypočteno: 74,42 % C, 8,08 % H; nalezeno: 74,29 % C, 7,98 % H.

50 Olejovitý produkt 3b: $[\alpha]_D^{20} +217,7$ (*c* 0,22, CHCl₃). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 1,18 (3H, s, CH₃-19), 1,60 – 1,78 (2H, m, CH-7), 1,74 – 1,98 (2H, m, CH₂-6), 2,12 – 2,23 (1H, m, CH-2b), 2,29 – 2,36 (2H, m, CH₂-14), 2,34 – 2,44 (1H, m, CH-2a), 2,33 – 2,46 (2H, m, CH₂-13), 2,76 (1H, bd, *J*₁ = 20,1, *J*₂ = 1,1, CH-11b), 2,89 (1H, bd, *J*₁ = 20,1, *J*₂ = 1,6, CH-11a), 3,81 – 4,08 (4H, m, OCH₂CH₂O), 5,33 (1H, t, *J* = 1,6, CH-4). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ 211,2 (C, C-

12), 148,44 (C, C-5), 132,39 (C, C-9), 128,58 (C, C-8), 120,22 (CH, C-4), 105,62 (C, C-3), 64,67 (CH, OCH₂CH₂O), 64,17 (CH, OCH₂CH₂O), 38,50 (CH₂, C-11), 38,04 (CH₂, C-13), 37,63 (C, C-10), 32,44 (CH₂, C-7), 32,26 (CH₂, C-1), 30,17 (CH₂, C-6/C-14), 30,09 (CH₂, C-6/C-14), 29,09 (CH₂, C-2), 23,02 (CH₃, C-19). IČ spektrum (CHCl₃): 2954, 2927 (CH₂); 2855 (CH₂); 1713 (C=O); 1674 (C=C); 1450, 1443 (CH₂); 1380 (CH₃); 1363, 1137 (CH₂); 1086, 946, 961 (kruh). MS (ESI) *m/z*: 275 (100 %, M + H), 297 (42 %, M + Na). HR-MS (ESI) *m/z*: Pro C₁₇H₂₃O₃ (M+H) vypočteno: 275,1642; nalezeno: 275,1664. Pro C₁₇H₂₂O₃ (274,4) vypočteno: 74,42 % C, 8,08 % H; nalezeno: C, 74,80 % C, 8,82 % H.

10

Příklad 3: (4b*S*,10a*S*)-7-(Ethylendioxy)-4b-methyl-1,2,4,4a,4b,5,6,7,10,10a-dekahydrofenantren-3(9H)-on (4)

15

20

25

30

35

40

K sušenému (lithiový drát a katalytické množství chloridu železitého) čerstvě destilovanému kapalnému amoniaku v tříhrdlé baňce, vychlazené na -78 °C, pod chladičem s pevným oxidem uhličitým byl pod ochrannou atmosférou dusíku přidán roztok enomu 3a (9,074 g, 33,07 mmol) v tetrahydrofuranu (90 ml), následovaný ethanolem (4,96 ml, 84,9 mmol). Potom bylo za intenzivního míchání, po částech přidáno kovové lithium (2,66 g, 383 mmol) nakrájené na malé kousky. Když přetrvávající modré zbarvení ukázalo dokončení redukce, byl přebytek amoniaku opatrně odpařen. Zbytek byl nalit do nasyceného vodného roztoku hydrogenuhličitánu sodného (300 ml) a produkt extrahován do ethyl-acetátu (3x 100 ml). Spojené organické extrakty byly promyty nasyceným vodným roztokem chloridu sodného, sušeny bezvodým síranem hořečnatým a odpařeny za sníženého tlaku. Odparek byl chromatografován na sloupci silikagelu (150 g, 0,5 % triethylaminu, 30 % ethyl-acetátu v petroléteru). Bylo získáno 7,63 g (83 %) produktu 4 ve formě bezbarvého oleje: $[\alpha]_D^{20} +144,7$ (*c* 0,41, CHCl₃). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 1,07 (3H, s, CH₃-19), 1,10 – 1,17 (1H, m, CH-7b), 1,25 – 1,34 (1H, m, CH-14b), 1,30 – 1,47 (1H, m, CH-9), 1,51 – 1,61 (1H, m, CH-1b), 1,64 – 1,69 (1H, m, CH-1a), 1,72 – 1,82 (2H, m, CH₂-2), 1,75 – 1,85 (1H, m, CH-8), 1,81 – 1,89 (1H, m, CH-7a), 1,97 – 2,04 (1H, m, CH-14a), 2,07 – 2,14 (1H, m, CH-6b), 2,09 – 2,17 (1H, m, CH-11b), 2,24 – 2,32 (1H, m, CH-6a), 2,28 – 2,38 (2H, m, CH₂-13), 2,33 – 2,44 (1H, m, CH-11a), 3,82 – 4,07 (4H, m, OCH₂CH₂O), 5,31 (1H, t, *J* = 1,2, CH-4). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ 211,82 (C, C-21), 149,20 (C, C-5), 121,12 (CH, C-4), 105,77 (C, C-3), 64,61 (CH, OCH₂CH₂O), 64,25 (CH, OCH₂CH₂O), 53,03 (CH, C-9), 41,09 (CH₂, C-11), 40,88 (CH₂, C-13), 37,65 (C, C-10), 35,88 (CH, C-8), 34,09 (CH₂, C-1), 33,59 (CH₂, C-7), 33,34 (CH₂, C-14), 31,57 (CH₂, C-6), 29,66 (CH₂, C-2), 17,55 (CH₃, C-19). IČ spektrum (CHCl₃): 2969 (CH₃); 2938 (CH₂); 2888, 2864 (CH₃); 1711 (C=O); 1664 (C=C); 1440 (CH₂); 1381, 1366 (CH₃); 1089, 1233, 1182, 1169, 1113 (COCOC); 1009, 964, 947 (kruh). MS (ESI) *m/z*: 277 (23 %, M + H), 299 (100 %, M + Na), 575 (21 %, 2M + Na). HR-MS (ESI) *m/z*: Pro C₁₇H₂₅O₃ (M+H) vypočteno: 277,17982; nalezeno: 277,17993. Pro C₁₇H₂₄NaO₃ (M+Na) vypočteno: 299,16177; nalezeno: 299,16181. Pro C₁₇H₂₄O₃ (276,4) vypočteno: 73,88 % C, 8,75 % H; nalezeno: 74,01 % C, 8,69 % H.

45

Příklad 4: (4a*S*,4b*R*,10a*R*)-7,7-Dimethoxy-4b-methyl-1,2,3,4,4a,5,6,7,9,10,10a-dodekahydrofenantren (5)

50

55

K míchanému roztoku ketonu 4 (1,00 g, 3,62 mmol) v methanolu (25 ml) byl za teploty místnosti přidán tosylhydrazid (1,01 g, 5,42 mmol). Po 30 min, kdy podle tenkovrstvé chromatografie byla hotova konverze na hydrazon byl přidán během 1 h za míchání a chlazení na 25 °C, tetrahydridoboritan sodný (2,74 g, 72,4 mmol). Reakční směs byla míchána přes noc a poté byla nalita do vody (100 ml) a produkt extrahován *n*-pentanem (3x 20 ml). Spojené organické extrakty byly promyty nasyceným vodným roztokem chloridu sodného, sušeny bezvodým síranem hořečnatým a rozpouštědla odpařena za sníženého tlaku. Chromatografie na sloupci silikagelu (30 g, 3 % ethyl-acetátu v *n*-pentanu) poskytla 708 mg (75 %) ketálu 5: $[\alpha]_D^{20} +123,2$ (*c* 0,57, CHCl₃). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 0,83 – 0,94 (1H, m, CH-9), 0,87 – 0,97 (1H, m, CH-12b), 0,99 (3H, s, CH₃-19), 0,95 – 1,04 (1H, m, CH-14b), 1,01 – 1,15 (1H, m, CH-7b), 1,12 – 1,23 (2h, m, CH-

11b, CH-13b), 1,35 (1H, qt, $J_1 = 11,2$, $J_2 = 3,6$, CH-8), 1,52 – 1,61 (1H, m, CH-1b), 1,61 – 1,70 (3H, m, CH-7a, CH-11a, CH-12a), 1,65 – 1,75 (1H, m, CH-14a), 1,70 – 1,80 (4H, m, CH-1a, CH₂-2, CH-13a), 2,02 (1H, ddd, $J_1 = 13,7$, $J_2 = 4,3$, $J_3 = 2,4$, CH-6b), 2,22 (1H, tdd, $J_1 = 13,7$, $J_2 = 4,7$, $J_3 = 1,6$, CH-6a), 3,85 – 4,04 (4H, m, OCH₂CH₂O), 5,24 (1H, d, $J = 1,4$, CH-4). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ 151,86 (C, C-5), 119,58 (CH, C-4), 106,29 (c, C-3), 64,54 (CH₂, OCH₂CH₂O), 64,20 (CH₂, OCH₂CH₂O), 53,47 (CH, C-9), 37,56 (C, C-10), 37,11 (CH, C-8), 35,22 (CH₂, C-7), 34,68 (CH₂, C-12), 34,56 (CH₂, C-1), 32,14 (CH₂, C-6), 29,93 (CH₂, C-2), 26,80 (CH₂, C-13), 26,25 (CH₂, C-11), 25,61 (CH₂, C-14), 17,92 (CH₃, C-19). IČ spektrum (CHCl₃): 2970 (CH₃); 2927 (CH₂); 2886, 2855 (CH₃); 1659 (C=O); 1451 (CH₂); 1451 (CH₂); 1380, 1364 (CH₃); 1233 (COCOC); 1170, 1113 (ketál); 1086, 1014, 954, 947 (C–O–C). MS (ESI) m/z : 263 (23 %, M + H), 285 (13 %, M + Na). HR-MS (ESI) m/z : Pro C₁₇H₂₆NaO₂ (M+Na) vypočteno: 285,18250; nalezeno: 285,18243. Pro C₁₇H₂₆O₂ (262,4) vypočteno: 77,82 % C; 9,99 % H; nalezeno: 77,94 % C, 10,08 % H.

15

Příklad 5: (4a*S*,4b*S*,8a*R*,10a*R*)-4a-Methyl-dodekahydrofenantren-2(1H)-on (6)

K roztoku ketálu 5 (380 mg, 1,45 mmol) v acetonu (10 ml) a vodě (0,5 ml) byla přidána kyselina chlorovodíková (35%, 3 kapky) a reakční směs byla míchána za teploty místnosti přes noc. Pak byl roztok zahuštěn na rotační odparce, nalit do vodného roztoku kyseliny chlorovodíkové (5%, 30 ml) a produkt extrahován *n*-pentanem (3x 20 ml). Spojené organické extrakty byly promyty nasyceným vodným roztokem hydrogenuhličitanu sodného, sušeny bezvodým síranem sodným a rozpouštědla odpařena za sníženého tlaku. Odparek byl rozpuštěn v ethanolu (20 ml). K roztoku byl přidán hydroxid draselný (45 mg) ve vodě (120 μl) a katalyzátor (Pd/CaCO₃, 5%, 40 mg). Směs byla hydrogenována pod mírným přetlakem vodíku 3 h. Potom byl katalyzátor odfiltrován, rozpouštědla částečně odpařena a zbytek nalit do vody. Produkt byl extrahován *n*-pentanem (3x 20 ml). Spojené organické extrakty byly sušeny bezvodým síranem hořečnatým a odpařením ve vakuu rotační odparky bylo získáno 291 mg (91 %) ketonu 6, produkt tvořila směs izomerů *5alfa* a *5beta* v poměru 1:9. Keton 6: $[\alpha]_D^{20} +27,8$ (c 0,43, CHCl₃). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 0,97 (3H, s, CH₃-19), 0,98 – 1,07 (1H, m), 1,15 – 1,27 (2H, m, CH-6b, CH-7b), 1,31 – 1,41 (1H, m, CH-1b), 1,42 – 1,49 (2H, m, CH-7a, CH-9), 1,65 – 1,72 (4H, m), 1,77 – 1,86 (2H, m, CH-5), 1,85 – 1,96 (1H, m, CH-6a), 1,98 – 2,06 (2H, ddd, $J_1 = 14,9$, $J_2 = 4,7$, $J_3 = 2,4$, CH-4b), 2,02 – 2,10 (1H, m, CH-2b), 2,16 (1H, dddd, $J_1 = 14,7$, $J_2 = 4,3$, $J_3 = 2,5$, CH-1a), 2,37 (1H, tdd, $J_1 = 14,7$, $J_2 = 5,5$, $J_3 = 0,9$, CH-2a), 2,72 (1H, dd, $J_1 = 14,9$, $J_2 = 13,3$, CH-4a). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ 213,39 (C, C-3), 44,53 (CH, C-5), 42,34 (CH₂, C-4), 40,36 (CH, C-9), 37,29 (CH₂, C-4), 36,92 (CH, C-8), 36,46 (CH₂, C-1), 35,10 (CH₂), 35,00 (C, C-10), 28,42 (CH₂, C-7), 27,26 (CH₂), 26,51 (CH₂), 26,45 (CH₂), 25,61 (CH₂), 22,69 (CH₃, C-19). IČ spektrum (CHCl₃): 2981, 2929, 2856 (CH₂); 1707 (C=O); 1455, 1448, (CH₂); 1382 (CH₃). MS (EI) m/z : 149 (100 %, (M – C₄H₅O), 220 (66 %, M). HR-MS (ESI) m/z : Pro C₁₅H₂₄O (M⁺) vypočteno 220,1822; nalezeno: 220,1825. Pro C₁₅H₂₄O (220,4) vypočteno: 81,76 % C; 10,98 % H; nalezeno: 81,61 % C; 11,03 % H.

45

Příklad 6: (2*R*,4a*S*,4b*S*,8a*R*,10a*R*)-4a-Methyl-tetradekahydrofenantren-2-ol (7)

Směs ketonu 6 (274 mg, 1,24 mmol), dichlormethanu (5 ml) a sušeného metanolu (5 ml) byla ochlazená na –78 °C. Pak byl za míchání přidán sušený chlorid ceritý (337 mg, 1,37 mmol) a *tetra*-hydridoboritan sodný (52 mg, 1,37 mmol). Po 15 min míchání při teplotě –78 °C byla reakční směs pomalu ohřívána na teplotu laboratoře a reakce ukončena přidáním zředěné kyseliny chlorovodíkové (5%, 25 ml). Produkt byl extrahován dichlormethanem (3x 10 ml), spojené organické extrakty byly promyty nasyceným vodným roztokem hydrogenuhličitanu sodného a sušeny bezvodým síranem hořečnatým. Odpařením rozpouštědel a chromatografií odparky na sloupci silikagelu (10 g, 1 % étheru v *n*-pentanu) bylo získáno 186,6 mg (68 %) 3α,5β-alkoholu 7a a 5,5 mg (2 %) 3β,5β-alkoholu 7b: $[\alpha]_D^{20} +21,8$ (c 0,29, CHCl₃). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ

0,87 (3H, s, CH₃-19), 0,84 – 0,96 (1H, m, CH-7b), 0,90 – 1,04 (2h, m, CH-1b, CH-14b), 1,14 – 1,24 (2H, m, CH-13b, CH-11b), 1,15 – 1,29 (2H, m, CH-6b, CH-12b), 1,24 – 1,33 (1H, m, CH-8), 1,32 – 1,39 (1H, , CH-12a), 1,35 – 1,42 (1H, m, CH-5), 1,31 – 1,44 (1H, m, CH-2b), 1,39 – 1,46 (1H, m, CH-9), 1,50 (1H, dddd, $J_1 = 12,6$, $J_2 = 4,7$, $J_3 = 3,8$, $J_4 = 2,4$, CH-4b), 1,58 – 1,66 (2H, m, CH-1a, CH-7a), 1,60 – 1,70 (1H, m, CH-11a), 1,62 – 1,70 (1H, m, CH-2a), 1,71 – 1,80 (1H, m, CH-13a), 1,72 – 1,84 (1H, m, CH-4a), 1,77 – 1,87 (1H, m, CH-1a), 1,84 – 1,91 (1H, m, CH-6a), 2,18 (1H, bs, OH), 3,62 (1H, tt, $J_1 = 11,1$, $J_2 = 4,7$, CH-3). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ 71,73 (CH, C-3), 42,22 (CH, C-5), 40,00 (CH, C-9), 37,25 (CH, C-8), 36,21 (CH₂, C-4), 35,17 (35,17 (CH₂, C-1), 34,64 (CH₂, C-14), 34,53 (C, C-10), 30,54 (CH₂, C-2), 29,09 (CH₂, C-12), 27,28 (CH₂, C-13), 27,02 (CH₂, C-6), 26,53 (CH₂, C-11), 25,34 (CH₂, C-7), 23,34 (CH₃, C-19). IČ spektrum (CHCl₃): 3609, 3452 (OH); 2977 (CH₂); 2927 (CH₂); 2858 (CH₂); 1450 (CH₂); 1380, 1364 (CH₃); 1035, 1015 (C-OH). MS (ESI) m/z : 245 (100 %, M + Na). HR-MS (ESI) m/z : Pro C₁₅H₂₆NaO (M+Na) vypočteno: 245,1876; nalezeno: 245,1875. Pro C₁₅H₂₆O (222,4) vypočteno: 81,07 % C, 11,79 % H; nalezeno: 81,11 % C, 11,98 % H.

15

Příklad 7: Pyridinium (2*R*,4*aS*,4*bS*,8*aR*,10*aR*)-4*a*-methyltetradekahydrofenantren-2-yl-sulfát (8)

Látka 8 byla připravena dle *Obecného postupu I – příprava C-3 sulfátu* z látky 7a (166 mg, 747 μmol). Byl získán sulfát 8 (248 mg, 87 %): $[\alpha]_D^{20} +22,6$ (c 0,23, CHCl₃). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 0,86 (3H, s, CH₃-19), 0,83 – 0,93 (1H, m, CH-11b), 0,90 – 1,00 (1H, m), 0,95 – 1,04 (1H, m, CH-1b), 1,22 – 1,35 (1H, m, CH-8), 1,12 – 1,40 (5H, m, CH₂-6), 1,38 – 1,48 (2H, m, CH-5, CH-9), 1,54 – 1,63 (1H, m, CH-11a), 1,50 – 1,64 (1H, m, CH-2b), 1,56 – 1,66 (2H, m), 1,71 – 1,78 (1H, m), 1,79 – 1,88 (3H, m, CH-1a, CH-4b), 1,90 – 2,03 (2H, m, CH-4a, CH-2a), 4,47 (1H, tt, $J_1 = 11,3$, $J_2 = 4,9$, CH-3), 7,99 – 8,03 (2H, m, CH-3'), 8,48 (1H, tt, $J_1 = 7,9$, $J_2 = 1,6$, CH-4'), 8,99 – 8,01 (2H, m, CH-2'). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ 145,60 (CH, C-4'), 142,37 (CH, C-2'), 127,12 (CH, C-3'), 79,67 (CH, C-3), 42,34 (CH, CH-5), 40,05 (CH, C-9), 37,29 (CH, C-8), 35,29 (CH₂), 34,67 (CH₂, C-1), 34,52 (C, C-10), 33,26 (CH₂, C-4), 29,09 (CH₂, C-6), 27,89 (CH₂, C-2), 27,38 (CH₂), 26,93 (CH₂), 26,61 (CH₂), 25,41 (CH₂, C-11), 23,32 (CH₃, C-19). IČ spektrum (CHCl₃): 2927 (CH₂); 2856 (CH₂); 2450–2750 (NH⁺); 2135 (NH⁺); 1490 (kruh); 1450 (CH₂); 1380 (CH₃); 1255, 1171, (SO₃); 1047 (SO₃); 970, 953, (COS); 828 (COS); 682 (=CH); 624 (SO₃). MS (ESI) m/z : 301 (100 %, M – C₅H₆N⁺). HR-MS (ESI) m/z : Pro C₁₅H₂₅O₄S (M–C₅H₆N⁺) vypočteno: 301,1479; nalezeno: 301,1479. Pro C₂₀H₃₁NO₄S (381,5) vypočteno: 62,96 % C, 8,19 % H; N 3,67 % N; nalezeno: 60,82 % C, 8,09 % H; 3,61 % N.

35

Příklad 8: 4-(((2*R*,4*aS*,4*bS*,8*aR*,10*aR*)-4*a*-Methyltetradekahydrofenantren-2-yl)oxy)-4-oxo-butanová kyselina (9)

Látka 9 byla připravena dle *Obecného postupu II – příprava C-3 hemisukcinátu* z látky 7a (47 mg, 0,21 mmol). Chromatografií na sloupci silikagelu (4 – 10 % acetonu v petroléteru) bylo získáno 52 mg (76 %) látky 9: t.t. 131–133 °C (aceton/*n*-heptan). $[\alpha]_D^{20} +45,5$ (c 0,20, CHCl₃). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 0,87 (3H, s, H-19) 2,51 – 2,76 (4H, m, H-2' a H-4'), 4,76 (1H, tt, $J_1 = 11,3$, $J_2 = 4,7$, H-3). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ 177,10, 171,83, 75,31, 42,31, 40,26, 37,47, 35,38, 34,84, 34,55, 32,30, 29,45, 29,24, 29,04, 27,49, 27,10, 26,89, 26,75, 25,59, 23,53. IČ spektrum (CHCl₃): 3517 (OH, monomer); 1727, 1717 (C=O); 1232, 1176, 1170 (COC). MS (ESI) m/z : 345,2 (100 %, M + Na). HR-MS (ESI) m/z : Pro C₁₉H₃₀O₄Na (M+Na) vypočteno: 345,2036; nalezeno: 345,2036.

50

Příklad 9: Methyl (1*S*,2*S*,4*aS*,4*bS*,7*R*,8*aR*,10*aR*)-7-acetoxy-2,4*b*-dimethyl-1-(2-oxoethyl)tetradekahydrofenantren-2-karboxylát (11)

5 Míchaný roztok enol-acetátu 10 (5,0 g, 13,35 mmol) v dichlormethanu (150 ml) a ledové kyselině octové (13 ml) byl ozonizován při teplotě $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ do modrého zbarvení roztoku. Potom byl k reakční směsi přidán postupně po malých dávkách dimethylsulfid (2 ml, 27,37 mmol), ledová kyselina octová (130 ml) a voda (28 ml). Vzniklý roztok byl míchán 18 hodin při teplotě místnosti. Produkt byl extrahován do dichlormethanu, spojené organické extrakty byly promyty vodou, sušeny bezvodým síranem hořečnatým a rozpouštědla byla odpařena za sníženého tlaku na rotační odparce. Odparek byl rozpuštěn v étheru, roztok ochlazen na $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ a přidáním etherického roztoku diazomethanu byla volná karboxylová skupina esterifikována. Chromatografií na sloupci silikagelu (10 % ethyl-acetátu v petroléteru) bylo získáno 4,45 g (88 %) nekrytalizujícího methylesteru 11: $[\alpha]_{\text{D}}^{20} -9,6$ (c 0,24, MeOH). $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CD_3OD): δ 0,89 (3H, s, H-18), 1,11 (3H, s, H-19), 2,02 (3H, s, OAc), 3,65 (3H, s, OCH_3), 4,66 – 4,76 (1H, m, H-3), 9,67 (1H, s, CHO). $^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CD_3OD): δ 201,97, 178,37, 170,76, 74,08, 52,12, 47,59, 46,71, 41,69, 41,46, 39,83, 37,80, 36,78, 34,88, 34,77, 32,10, 26,96, 26,72, 26,31, 23,33, 21,55, 19,83, 15,56. IČ spektrum (CHCl_3): 2828 (CHO); 1721 (C=O); 1435, 1385, 1364 (CH_3); 1253 (COO). MS (ESI) m/z : 401,3 (100 %, M + Na). HR-MS (ESI) m/z : Pro $\text{C}_{22}\text{H}_{34}\text{O}_5\text{Na}$ (M+Na) vypočteno: 401,2299; nalezeno: 401,2297.

Příklad 10: Methyl (1*S*,2*S*,4*aS*,4*bS*,7*R*,8*aR*,10*aR*)-7-acetoxy-1,2,4*b*-trimethyltetradekahydrofenantren-2-karboxylát (12)

25 Látka 12 byla připravena dle *Obecného postupu VI – Wilkinsonova dekarbonylace* z látky 11 (1,33 g, 3,65 mmol). Chromatografií na sloupci silikagelu (10 % acetonu v petroléteru) bylo získáno 1,31 g (69 %) 12: $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CD_3OD): δ 0,72 (3H, d, $J = 6,7$, H-15), 0,89 (3H, s, H-18), 1,06 (3H, s, H-19), 2,03 (3H, s, OAc), 3,66 (3H, s, OCH_3), 4,66 – 4,76 (1H, m, H-3). $^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CD_3OD): δ 179,21, 170,77, 74,35, 51,85, 47,76, 42,36, 41,56, 39,66, 37,74, 37,05, 34,86 (2x C), 32,19, 27,07, 26,75, 25,52, 23,36, 21,58, 20,09, 15,34, 14,64. IČ spektrum (CHCl_3): 1721 (C=O); 1467, 1386, 1024 (OAc); 1364, 1160 (COOCH_3). MS (ESI) m/z : 373,2 (100 %, M+Na). HR-MS (ESI) m/z : Pro $\text{C}_{21}\text{H}_{34}\text{O}_4\text{Na}$ (M+Na) vypočteno: 373,2349; nalezeno: 373,2348.

Příklad 11: (2*R*,4*aS*,4*bS*,7*S*,8*S*,8*aS*,10*aR*)-7-(Hydroxymethyl)-4*a*,7,8-trimethyltetradekahydrofenantren-2-ol (13)

40 Směs esteru 12 (1,00 g, 2,86 mmol) a hydridohlinitanu lithného (2,86 mg, 8,58 mmol) v tetrahydrofuranu (30 ml) byla zahřívána k varu pod inertní atmosférou argonu 2 h. Nadbytek činidla byl opatrně rozložen nasyceným vodným roztokem síranu sodného, anorganický materiál byl odstraněn filtrací a promyt ethyl-acetátem. Filtrát byl promyt vodným roztokem kyseliny chlorovodíkové (5%), vodou, nasyceným vodným roztokem hydrogenuhličitanu sodného a sušen bezvodým síranem sodným. Rozpouštědla byla odpařena za sníženého tlaku. Odparek 585 mg (73 %) 13 se nepodařilo vykrytalizovat: $[\alpha]_{\text{D}}^{20} -3,4$ (c 0,33, CHCl_3). $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CD_3OD): δ 0,69 (3H, s, H-18), 0,78 (3H, d, J , 6,3, H-15), 0,89 (3H, s, H-19), 2,03 (3H, s, OAc), 3,35 (2H, dd, $J_1 = 92,2$, $J_2 = 10,9$, 3,56 – 3,66 (1H, m, H-3). $^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CD_3OD): δ 72,01, 71,74, 41,80, 40,57, 39,96, 38,21, 38,15, 36,46, 35,80, 35,17, 34,98, 30,79, 27,46, 26,13, 23,53, 20,49, 15,69, 12,61. IČ spektrum (CHCl_3): 3628, 3616 (OH); 2935, 2866 (CH_2); 1380 (CH_3); 1035 (C–OH). MS (ESI) m/z : 303,3 (100 %, M+Na). HR-MS (ESI) m/z : Pro $\text{C}_{18}\text{H}_{32}\text{O}_2\text{Na}$ (M+Na) vypočteno: 303,2295; nalezeno: 303,2295.

Příklad 12: (4a*S*,4b*S*,7*S*,8*S*,8a*S*,10a*R*)-7-(Hydroxymethyl)-4a,7,8-trimethyldodekahydrofenantren-2(1H)-on (14)

Vodný roztok chlornanu sodného (4,5%, 7,7 ml) byl přidán do roztoku diolu 13 (585 mg, 2,09 mmol) v kyselině octové (18 ml). Reakční směs byla míchána za teploty místnosti 1 h, pak byl přidán propan-2-ol (11 ml) a směs byla míchána 30 min. Reakce byla ukončena přidáním vody (20 ml), produkt byl extrahován chloroformem (3 x 50 ml), spojené organické extrakty byly promyty nasyceným vodným roztokem chloridu sodného a sušeny bezvodým síranem sodným. Rozpouštědla byla odpařena a odparek chromatografován na sloupci silikagelu (4 – 10 % acetonu v petroléteru). Bylo získáno 412 mg, (71 %) nekystalizujícího ketonu 14: $[\alpha]_D^{20} -2,7$ (*c* 0,29, CHCl₃). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 0,73 (3H, s, H-18), 0,82 (3H, d, *J* = 6,3, H-15), 0,99 (3H, s, H-19), 3,38 (2H, dd, *J*₁ = 101,4, *J*₂ = 10,9, H-17). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ 213,44, 71,47, 44,04, 42,38, 40,44, 40,22, 38,18, 37,87, 37,40, 36,89, 35,68, 35,34, 26,93, 25,51, 22,83, 20,80, 15,72, 12,56. IČ spektrum (CHCl₃): 3630 (OH); 2935, 2860 (CH₂); 1708 (C=O), 1383 (methyl); 1032 (CCO). MS (ESI) *m/z*: 301,2 (100 %, M+Na). HR-MS (ESI) *m/z*: Pro C₁₈H₃₀O₂Na (M+Na) vypočteno: 301,2138; nalezeno: 301,2139.

Příklad 13: ((4a*S*,4b*S*,7*S*,8*S*,8a*S*,10a*R*)-4a,7,8-Trimethyldodekahydro-1H-spiro[fenantren-2,2'-[1,3]dioxolan]-7-yl)methanol (15)

Směs ketonu 14 (550 mg, 1,98 mmol), triethyl orthoformiátu (2,3 ml, 13,85 mmol), ethylen glykolu (2,2 ml, 39 mmol) a kyseliny *para*-toluensulfonové (60 mg, 0,32 mmol) v benzenu (10 ml) byla míchána za teploty místnosti 1 h. Pak byla reakční směs nechána stát 17 h při teplotě 50 °C. Po ochlazení byla směs nalita do nasyceného vodného roztoku chloridu sodného, produkt byl extrahován ethyl-acetátem, spojené organické extrakty byly promyty nasyceným vodným roztokem chloridu sodného a sušeny bezvodým síranem hořečnatým. Rozpouštědla byla odpařena a odparek chromatografován na sloupci silikagelu (1 % triethylaminu a 10 % ethyl-acetátu v petroléteru). Bylo získáno 542 mg (85 %) olejovitého ketálu 15: $[\alpha]_D^{20} -2,7$ (*c* 0,26, CHCl₃). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 0,70 (3H, s, H-18), 0,78 (3H, d, *J* = 6,3, H-15), 0,92 (3H, s, H-19), 3,35 (2H, dd, *J*₁ = 89,0, *J*₂ = 10,9, H-17), 3,93 (4H, OCH₂CH₂O). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ 110,20, 71,76, 64,37, 64,22, 40,60, 40,59, 39,28, 38,15, 38,00, 35,78, 35,66, 34,99, 34,00, 30,32, 27,02, 25,90, 23,27, 20,69, 15,69, 12,58. IČ spektrum (CHCl₃): 3630 (OH); 2976, 2881, 1381 (methyl); 2928, 1471 (CH₂), 1471, 1094, 947 (ketál); 1030 (COH). MS (CI) *m/z*: 321,2 (52 %, M - H), 323,2 (54 %, M + H). HR-MS (CI) *m/z*: Pro C₂₀H₃₃O₃ (M-H) vypočteno: 321,2433; nalezeno: 321,2430.

Příklad 14: (4a*S*,4b*S*,7*S*,8a*S*,10a*R*)-7-(Methoxymethyl)-4a,7,8-trimethyldodekahydrofenantren-2(1H)-on (16)

Hydrid sodný (60% suspenze v oleji, 346 mg) byl přidán k roztoku ketálu 15 (430 mg, 1,33 mmol) v sušeném tetrahydrofuranu (30 ml) a směs byla pod inertní atmosférou argonu 1 h míchána a zahřívána na 90 °C. Pak byl přidán methyl jodid (0,7 ml, 11,4 mmol) a směs byla dále pod inertní atmosférou argonu 5 h míchána a zahřívána na 90 °C. Po ochlazení byl produkt extrahován ethyl-acetátem, spojené organické extrakty byly promyty nasyceným vodným roztokem chloridu sodného, sušeny bezvodým síranem hořečnatým a rozpouštědla odpařena za sníženého tlaku. Odparek byl rozpuštěn v acetonu (10 ml), byla přidána zředěná kyselina chlorovodíková (5%, 150 μl) a směs byla míchána za teploty místnosti 1 h. Reakce byla ukončena přidáním nasyceného vodného roztoku hydrogenuhličitanu sodného (10 ml), produkt byl extrahován ethyl-acetátem, spojené organické extrakty byly promyty nasyceným roztokem chloridu sodného a sušeny bezvodým síranem sodným. Odpařením rozpouštědel bylo získáno 322 mg (83 %) nekystalizujícího ketoderivátu 16: $[\alpha]_D^{20} -3,5$ (*c* 0,37, CHCl₃/MeOH, 2: 0,14). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 0,72 (3H, s, H-19), 0,80 (3H, d, *J* = 6,3, H-15), 0,98 (3H, s, H-18), 3,09 (2H, dd, *J*₁ =

129,6, $J_2 = 9,1$ H-17), 3,32 (3H, OCH₃). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ 213,49, 81,78, 59,45, 44,12, 42,39, 40,75, 40,11, 37,76, 37,40, 36,94, 36,34, 35,32, 29,85, 26,94, 25,44, 22,80, 20,85, 15,99, 12,59. IČ spektrum (CHCl₃): 2928 (CH₂); 1707 (C=O); 1382 (methyl); 1101 (COC). MS (CI) m/z : 293,2 (72 %, M + H). HR-MS (CI) m/z : Pro C₁₉H₃₃O₂ [M + H] vypočteno: 293,2481; nalezeno: 293,2477.

Příklad 15: (2*R*,4*aS*,4*bS*,7*S*,8*aS*,10*aR*)-7-(Methoxymethyl)-4*a*,7,8-trimethyltetradekahydrofenantren-2-ol (17)

Roztok ketonu 16 (400 mg, 1,37 mmol) v methanolu (20 ml) byl ochlazen na 0 °C a za míchání byl přidán *tetra*-hydridoboritan sodný (57 mg, 1,51 mmol). Směs byla míchána 1 h při 0 °C, pak byla ohřata na teplotu místnosti a reakce ukončena přidáním zředěné kyseliny chlorovodíkové (5%, 15 ml). Produkt byl extrahován chloroformem (3x 20 ml), spojené organické extrakty byly promyty nasyceným vodným roztokem hydrogenuhličitanu sodného a sušeny bezvodým síranem hořečnatým. Odpařením rozpouštědel a chromatografií odparku (7 % acetonu v petroléteru) bylo získáno 323 mg (80 %) hydroxyderivátu 17: t.t. 107–108 °C (aceton/*h*-heptan). $[\alpha]_D^{20} -9,2$ (*c* 0,37, CHCl₃). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 0,69 (3H, s, H-19), 0,77 (3H, d, $J = 6,4$, H-15), 0,88 (3H, s, H-18), 3,07 (2H, dd, $J_1 = 114,3$, $J_2 = 9,1$, H-17), 3,32 (3H, OCH₃), 3,57 – 3,66 (1H, m, H-3). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ 82,11, 72,04, 59,45, 41,85, 40,93, 39,88, 38,11, 37,71, 36,48, 36,46, 35,20, 34,96, 30,78, 27,48, 26,06, 23,52, 20,54, 15,96, 12,68. IČ spektrum (CHCl₃): 3609 (OH); 2977 (CH₃); 1100 (COC). MS (ESI) m/z : 317,2 (100 %, M + Na). HR-MS (ESI) m/z : Pro C₁₉H₃₄O₂Na (M+Na) vypočteno: 317,2451; nalezeno: 317,2451.

Příklad 16: Pyridinium (2*R*,4*aS*,4*bS*,7*S*,8*S*,8*aS*,10*aR*)-7-(methoxymethyl)-4*a*,7,8-trimethyltetradekahydrofenantren-2-sulfát (18)

Látka 18 byla připravena dle *Obecného postupu I – příprava C-3 sulfátu* z látky 17 (78 mg, 0,26 mmol). Byl získán sulfát 18 (40 mg, 33 %): $[\alpha]_D^{20} +4,0$ (*c* 0,30, CHCl₃/MeOH, 1,849:0,341). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 0,68 (3H, s, H-19), 0,75 (3H, d, $J = 6,1$, H-15), 0,86 (3H, s, H-18), 3,06 (2H, dd, $J_1 = 112,6$, $J_2 = 9,1$, H-17), 3,31 (3H, s, OCH₃), 4,46 (1H, tt, $J_1 = 10,9$, $J_2 = 4,9$, H-3), 8,01 (2H, m, H-2' a H-4', pyridinium), 8,49 (1H, t, $J = 8,6$, H-3', pyridinium), 8,92 – 9,05 (2H, m, H-1' a H-5', pyridinium). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ 145,84 (C-1', C-5'), 142,41 (C-3'), 127,30 (C-2', C-4'), 82,13, 79,89, 59,43, 41,84, 41,00, 39,82, 38,04, 37,70, 36,50, 35,10, 34,84, 33,25, 27,91, 27,31, 26,01, 23,43, 20,50, 15,95, 12,66. IČ spektrum (CHCl₃): 2976, 2933 (CH₂OCH₃); 1263, 1255, 1183, 1044, 954 (SO₃). MS (ESI) m/z : 373,2 (100 %, M – H – pyridin). HR-MS (ESI) m/z : Pro C₁₉H₃₃O₅S (M–H–pyridin) vypočteno: 373,2054; nalezeno: 373,2054.

Příklad 17: 4-(((2*R*,4*aS*,4*bS*,7*S*,8*aS*,10*aR*)-7-(Methoxymethyl)-4*a*,7,8-trimethyltetradekahydrofenantren-2-yl)oxy)-4-oxobutanová kyselina (19)

Látka 19 byla připravena dle *Obecného postupu II – příprava C-3 hemisukcinátu* z látky 17 (70 mg, 0,23 mmol). Chromatografií na sloupci silikagelu (10 % acetonu v petroléteru) bylo získáno 78 mg (83 %) derivátu 19: $[\alpha]_D^{20} +6,5$ (*c* 0,27, CHCl₃). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 0,68 (3H, s, H-19), 0,77 (3H, d, $J = 6,1$, H-15), 0,88 (3H, s, H-18), 2,51 – 2,76 (4H, m, OCCH₂CH₂CO), 3,08 (2H, dd, $J_1 = 126,8$, $J_2 = 9,0$, H-17), 3,33 (3H, s, OCH₃), 4,75 (1H, tt, $J_1 = 11,3$, $J_2 = 4,8$, H-3). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ 177,20, 171,85, 81,97, 75,13, 59,44, 41,63, 40,80, 39,85, 38,03, 37,71, 36,45, 34,97, 34,85, 32,06, 29,45, 29,05, 27,29, 26,67, 25,97, 23,45, 20,55, 16,00, 12,63. IČ spektrum (CHCl₃): 2935 (CH₂OCH₃); 1717 (C=O, COOH); 1100 (COC). MS (ESI) m/z : 393,3 (100 %, M – H). HR-MS (ESI) m/z : Pro C₂₃H₃₇O₅ (MH) vypočteno:

393,2647; nalezeno: 393,2643. Pro $C_{23}H_{38}O_5$ (394,3) vypočteno: 70,02 % C, 9,71 % H; nalezeno: 69,76 % C, 9,68 % H.

5 Příklad 18: Methyl (1*S*,2*S*,4*aS*,4*bS*,7*R*,8*aR*,10*aS*)-7-hydroxy-1,2,4*b*-trimethyltetradekahydrofenantren-2-karboxylát (20)

K roztoku 12 (100 mg, 0,29 mmol) v methanolu (5 ml) byl přidán roztok hydroxidu draselného (60 mg, 1,07 mmol) v methanolu (2 ml) a směs byla míchána za laboratorní 18 h. Pak byla nalita do vody, produkt extrahován oxanem ethylnatým. Spojené organické podíly byly promyty zředěnou kyselinou chlorovodíkovou (5%), vodou nasyceným roztokem hydrogenuhlíčitanu sodného a sušeny bezvodým síranem sodným. Odpaření rozpouštědel za sníženého tlaku poskytlo odparek 20 83 mg (94 %), který vykristaloval ze směsi ethyl-acetát/*n*-heptan): t.t. 144 – 146 °C (ethyl-acetát/*n*-heptan). $[\alpha]_D^{20} +6,2$ (*c* 0,33, $CHCl_3$). 1H NMR (400 MHz, CD_3OD): δ 0,73 (3H, d, $J = 6,7$, H-15), 0,89 (3H, s, H-19), 1,06 (3H, s, H-18), 3,67 (3H, s, OCH₃), 3,58 – 3,68 (1H, m, H-3). ^{13}C NMR (101 MHz, CD_3OD): δ 179,26, 71,92, 51,87, 47,78, 42,32, 41,78, 39,69, 37,81, 37,06, 36,43, 35,18, 34,86, 30,73, 27,25, 25,62, 23,41, 20,10, 15,38, 14,66. IČ spektrum ($CHCl_3$): 3609, 1054, 1033 (OH); 3020, 2942 (CH₃); 1720 (C=O); 1243 (COC). MS (ESI) *m/z*: 331,3 (100 %, M + Na). HR-MS (ESI) *m/z*: Pro $C_{19}H_{32}O_3Na$ (M+Na) vypočteno: 331,2244; nalezeno: 331,2243.

Příklad 19: 4-(((2*R*,4*aS*,7*S*,8*S*,10*aR*)-7-(Methoxykarbonyl)-4*a*,7,8-trimethyltetradekahydrofenantren-2-yl)oxy)-4-oxobutanová kyselina (21)

Látka 21 byla připravena dle *Obecného postupu II – příprava C-3 hemisukcinátu z látky 20* (100 mg, 0,32 mmol). Chromatografií na sloupci silikagelu (10 % acetonu v petroléteru) byla získána látka 21 (68 mg, 51 %) jako bílá pevná látka: t.t. 145 – 147 °C (ethyl-acetát/*n*-heptan). $[\alpha]_D^{20} +21,5$ (*c* 0,21, $CHCl_3$). 1H NMR (400 MHz, CD_3OD): δ 0,73 (3H, d, $J = 6,7$, H-15), 0,90 (3H, s, H-19), 1,06 (3H, s, H-18), 2,55 – 2,72 (4H, m, OCCH₂CH₂CO), 3,67 (3H, s, OCH₃), 4,70 – 4,81 (1H, m, H-3). ^{13}C NMR (101 MHz, CD_3OD): δ 179,30, 171,91, 74,93, 51,88, 47,77, 42,33, 41,58, 39,67, 37,74, 37,03, 34,87, 34,83, 32,11, 29,83, 29,47, 29,03, 27,06, 26,70, 25,51, 23,34, 20,09, 15,34, 14,63. IČ ($CHCl_3$): 3020, 1361 (CH₃); 2950 (CH₂); 1724, 1718 (C=O); 1243, 1166 (COC). MS (ESI) *m/z*: 431,2 (100 %, M + Na). HR-MS (ESI) *m/z*: Pro $C_{23}H_{36}O_6Na$ (M+Na) vypočteno: 431,2404; nalezeno: 431,2403.

Příklad 20: Pyridinium (2*R*,4*aS*,7*S*,8*S*,10*aR*)-7-(methoxykarbonyl)-4*a*,7,8-trimethyltetradekahydrofenantren-2-yl-sulfát (22)

Látka 22 byla připravena dle *Obecného postupu I – příprava C-3 sulfátu z látky 20* (104 mg, 0,34 mmol). Byl získán sulfát 22 (55 mg, 35 %). t.t. 145 – 147 °C (ethyl-acetát/*n*-heptan). $[\alpha]_D^{20} +10,9$ (*c* 0,40, $CHCl_3$). 1H NMR (400 MHz, CD_3OD): δ 0,71 (3H, d, $J = 6,6$, H-15), 0,88 (3H, s, H-19), 1,05 (3H, s, H-18), 3,67 (3H, s, OCH₃), 4,47 (1H, tt, $J_1 = 10,9$, $J_2 = 5$, H-3), 8,02 (2H, m, H-2' a H-4', pyridinium), 8,49 (1H, t, $J = 7,8$, H-3', pyridinium), 8,96 – 9,02 (2H, m, H-1' a H-5', pyridinium). ^{13}C NMR (101 MHz, CD_3OD): δ 179,30, 145,89 (C-1', C-5'), 142,41, 127,33 (C-2', C-4'), 79,53, 51,85, 47,75, 42,37, 41,77, 39,62, 37,72, 37,09, 35,10, 34,73, 33,27, 27,91, 27,07, 25,55, 23,32, 20,06, 15,36, 14,64. IČ spektrum ($CHCl_3$): 3140, 3100, 1490 (pyridinium); 1720 (C=O); 1264, 1183, 1175, 1044, 954 (SO₃); 1245, 1192 (C-O). MS (ESI) *m/z*: 387,2 (100 %, M – pyridin). HR-MS (ESI) *m/z*: Pro $C_{19}H_{31}O_6S$ (M-pyridin) vypočteno: 387,1847, nalezeno: 387,1844.

Příklad 21: (2*S*,4*aS*,4*bS*,7*S*,8*aR*,10*aR*)-7-hydroxy-2,4*b*-dimethyl-1-(((*E*)-3-oxoindolin-2-yliden)methyl)tetradeka-hydrofenantren-2-karboxylová kyselina (24)

5 Roztok *o*-nitrobenzaldehydu (2,75 g) v metanolu (25 ml) byl přidán do směsi 3*beta*-hydroxy-5*beta*-androstan-17-onu (23) (5,0 g, 17,22 mmol) v methanolovém roztoku hydroxidu draselného (4%, 125 ml). Reakční směs byla míchána za teploty místnosti 18 h a pak byly přidány další methanolové roztoky hydroxidu draselného (0,5 g v 1 ml) a *o*-nitrobenzaldehydu (275 mg v 2,5 ml). Po 20 h byla reakční směs zahuštěna za sníženého tlaku na 1/3 objemu, naředěna vodou (20 ml), přefiltrována přes aktivní uhlí a filtrát byl okyselen zředěnou kyselinou chlorovodíkovou (5%). Vzniklá žlutá sraženina kyseliny 24 byla odsáta, promyta vodou a sušena
10 (6,1 g, 84 %): t.t. 242 – 245 °C (metanol/voda). $[\alpha]_D^{20}$ -182,2 (*c* 0,29, CH₃OH). ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD): δ 0,98 (3H, s, H-18), 1,24 (3H, s, H-19), 2,86 (1H, dd, *J*₁ = 11,4, *J*₂ = 10, H-14), 4,02 – 4,07 (1H, m, H-3), 5,81 (1H, d, *J* = 11,6, H-15), 6,79 (1H, t, *J* = 7,7), 6,93 (1H, d, *J* = 8,2), 7,41 (1H, t, *J* = 7,7), 7,52 (1H, d, *J* = 7,7). ¹³C NMR (101 MHz, CD₃OD): δ 187,72,
15 181,39, 155,99, 140,14, 137,88, 125,48, 121,86, 119,96, 117,67, 112,83, 67,68, 48,85, 48,09, 39,98, 38,12, 37,64, 37,60, 36,53, 34,23, 30,63, 28,55, 27,74, 27,64, 24,26, 21,01, 16,09. IČ spektrum (KBr): 3445, 3343 (OH, NH); 2976, 1383 (methyl); 2613 (OH, dimer); 1708 (C=O, dimer); 1693 (C=O, indolon); 1639 (C=C); 1613, 1486, 1468, 1448 (kruh, indolon); 1003 (C-OH). MS (ESI) *m/z*: 446,3 (100 %, M + Na), 424,3 (45 %, M + H). HR-MS (ESI) *m/z*: Pro C₂₆H₃₃O₄NNa (M+Na) vypočteno: 446,2302; nalezeno: 446,2301.
20

Příklad 22: Methyl (2*S*,4*aS*,4*bS*,7*S*,8*aR*,10*aR*)-7-hydroxy-2,4*b*-dimethyl-1-(((*E*)-3-oxoindolin-2-yliden)methyl)-tetradekahydrofenantren-2-karboxylát (25)

25 Čerstvě připravený éterický roztok diazomethanu byl za míchání přidán do vychlazeného roztoku kyseliny 24 (0 °C, 5 g, 11,80 mmol) v etheru. Po ukončení reakce (TLC) byl nadbytek diazomethanu odpařen a bylo získáno 5,1 g (99 %) nekrytalizujícího methylesteru (25): $[\alpha]_D^{20}$ -208,1 (*c* 0,26, CHCl₃). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 0,97 (3H, s, H-18), 1,24 (3H, s, H-19), 2,72 (1H, t, *J* = 10,7, H-14), 3,56 (1H, s, OCH₃), 4,12 – 4,14 (1H, m, H-3), 5,77 (1H, d, *J* = 11,1, H-15), 6,87 (1H, t, *J* = 7,7), 6,93 (1H, d, *J* = 8,2), 7,42 (1H, t, *J* = 7,7), 7,66 (1H, d, *J* = 7,7). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ 185,93, 179,78, 154,04, 138,80, 136,25, 125,06, 122,45, 119,89, 116,52, 112,22, 67,03, 52,44, 47,65, 47,54, 38,67, 37,81, 36,59, 36,33, 35,60, 33,58, 29,64, 28,00, 26,94, 26,51, 23,85, 19,91, 16,00. IČ spektrum (CHCl₃): 3616 (OH); 2979, 1435, 1384,
30 1716 (C=O); 1701 (C=O, indolon); 1644 (C=C). MS (ESI) *m/z*: 460,4 (100 %, M + Na), 438,4 (52 %, M + H). HR-MS (ESI) *m/z*: Pro C₂₇H₃₆O₄N (M+H) vypočteno: 438,2639; nalezeno: 438,2639.
35

40 Příklad 23: Methyl (2*S*,4*aS*,4*bS*,7*S*,8*aR*,10*aR*)-7-acetoxy-2,4*b*-dimethyl-1-(((*E*)-3-oxoindolin-2-yliden)methyl)-tetradekahydrofenantren-2-karboxylát (26)

Do vychlazené (0 °C) směsi methylesteru 25 (7,2 g, 16,45 mmol) a 4-(*N,N*-dimethylamino)-pyridinu (200 mg, 1,64 mmol) v pyridinu (50 ml) byl za míchání přidán acetanhydrid (46 ml).
45 Reakční směs byla ohřáta na teplotu místnosti a po 2 h byla reakce ukončena přidáním malého množství vody. Reakční směs byla nalita do zředěné kyseliny chlorovodíkové (5%, 150 ml), produkt extrahován ethyl-acetátem (3x 80 ml), spojené organické fáze byly promyty vodou (2x 100 ml), nasyceným roztokem hydrogenuhličitanu sodného, nasyceným roztokem chloridu sodného a sušeny bezvodým síranem sodným. Rozpouštědla byla odpařena za sníženého tlaku a bylo
50 získáno 7,0 g, (89 %) nekrytalizující látky 26: $[\alpha]_D^{20}$ -221,1 (*c* 0,274, CHCl₃). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 0,98 (3H, s, H-18), 1,24 (3H, s, H-19), 2,04 (3H, s, OAc), 2,73 (1H, t, *J* = 10,7, H-14), 3,56 (3H, s, OCH₃), 5,05 – 5,11 (1H, m, H-3), 5,76 (1H, d, *J* = 11,2, H-15), 6,87 (1H, t, *J* = 7,7), 6,93 (1H, d, *J* = 8,2), 7,42 (1H, t, *J* = 7,7), 7,65 (1H, d, *J* = 7,7). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ 185,92, 179,66, 170,81, 154,04, 138,83, 136,28, 125,04, 122,43, 119,90,

116,31, 112,23, 70,55, 52,44, 47,61, 38,82, 47,46, 37,74, 37,14, 36,60, 35,35, 30,63, 30,46, 26,82, 26,36, 25,18, 23,80, 21,62, 19,90, 16,00. IČ spektrum (CHCl₃): 2979, 1385, 1379 (methyl); 1727 (C=O, OAc); 1717 (C=O, COOMe); 1702 (C=O, indolon); 1645 (C=C); 1615, 1485, 1470, 1448 (kruh, indolon). MS (ESI) *m/z*: 502,4 (100 %, M + Na), 480,4 (30 %, M + H).
 5 HR-MS (ESI) *m/z*: Pro C₂₉H₃₈O₅ (M+1) vypočteno: 480,2745; nalezeno: 480,2746.

Příklad 24: Methyl (2*S*,4*aS*,4*bS*,7*S*,8*aR*,10*aR*)-7-acetoxy-1-formyl-2,4b-dimethyltetradekahydrofenantren-2-karboxylát (27)

10

Látka 27 byla připravena z látky 26 (7,0 g, 14,60 mmol) analogicky dle přípravy látky 11 za použití dimethylsulfid (3,4 ml, 46,53 mmol, 1 hod., teplota místnosti). Chromatografií na sloupci silikagelu (180 g, 6 % ethyl-acetátu v petroléteru) bylo získáno 4,27 g (80 %) nekystalizujícího aldehydu 27, který byl použit surový do další reakce: ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 0,99 (3H, s, H-18), 1,24 (3H, s, H-19), 2,04 (3H, s, OAc), 2,62 (1H, dd, *J*₁ = 11,2 a *J*₂ = 3,0, H-14), 3,69 (3H, s, OCH₃), 5,05 – 5,11 (1H, m, H-3), 9,72 (1H, d, *J* = 3,0, CHO). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ 204,77, 177,45, 170,75, 70,45, 60,18, 52,32, 38,45, 45,24, 36,97, 36,85, 35,27, 32,41, 30,58, 30,51, 26,33, 26,26, 25,10, 23,71, 21,61, 19,73, 16,89.

20

Příklad 25: Methyl (2*S*,4*aS*,4*bS*,7*S*,8*aR*,10*aR*)-7-acetoxy-2,4b-dimethyltetradekahydrofenantren-2-karboxylát (28)

Látka 28 byla připravena dle *Obecného postupu VI – Wilkinsonova dekarbonylace* z látky 27 (2 g, 5,49 mmol). Chromatografií na sloupci silikagelu (3 % acetonu v petroléteru) bylo získáno 1,31 g (71 %, olej) 28: [α]_D²⁰ +14,6 (*c* 0,314, CHCl₃). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 0,95 (3H, s, H-18), 1,19 (3H, s, H-19), 2,05 (3H, s, H-OAc), 3,66 (3H, s, H-OCH₃), 5,03 – 5,10 (1H, m, H-3). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ 179,37, 170,84, 70,79, 51,89, 42,43, 39,41, 37,56, 34,97, 34,49, 31,73, 30,65, 30,32, 28,82, 26,53, 25,21, 23,93, 21,65, 20,57, 20,51. IČ spektrum (CHCl₃): 2975, 2941, 1491, 1378 (methyl); 1722 (C=O); 1262, 1243, 1025 (C-O). MS (ESI) *m/z*: 359,2 (100 %, M + Na). HR-MS (ESI) *m/z*: Pro C₂₀H₃₂O₄Na (M+Na) vypočteno: 359,2193; nalezeno: 359,2191.

35

Příklad 26: (2*S*,4*aS*,4*bS*,7*S*,8*aS*,10*aR*)-7-(Hydroxymethyl)-4a,7-dimethyltetradekahydrofenantren-2-ol (29)

Látka 29 byla připravena z látky 28 (1,25 g, 3,71 mmol) analogicky dle přípravy látky 13. Bylo získáno 905 mg (92 %) diolu 29: t.t. 139 – 140 °C (ethyl-acetát/*n*-heptan). [α]_D²⁰ +13,1 (*c* 0,29, CHCl₃). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 0,89 (3H, s, H-18), 0,95 (3H, s, H-19), 3,24 – 3,30 (2H, m, CH₂OH), 4,08 – 4,14 (1H, m, H-3). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ 74,89, 67,29, 42,71, 39,88, 39,08, 35,85, 35,34, 34,37, 33,59, 31,92, 29,62, 29,34, 28,10, 26,79, 24,09, 20,74, 20,32. IČ spektrum (CHCl₃): 3630, 3618 (OH); 2936, 2863 (CH₂); 1031, 998 (C-OH). MS (ESI) *m/z*: 289,2 (100 %, M + Na). HR-MS (CI) *m/z*: Pro C₁₇H₂₉O₂ (M-1) vypočteno: 265,2168; nalezeno: 265,2170.

50

Příklad 27: (2*S*,4*aS*,4*bS*,8*aR*,10*aS*)-2,4b-Dimethyl-7-oxotetradekahydrofenantren-2-karb-aldehyd (30)

Bezvodý octan sodný (158 mg, 1,93 mmol) a pyridinium chlorochromát (826 mg, 3,86 mmol) byly přidány do roztoku 29 (320 mg, 1,20 mmol) v dichlormethanu (20 ml). Reakční směs byla za teploty místnosti míchána pod inertní atmosférou argonu 2 h a pak byla naředěna ethyl-acetátem (80 ml) a přefiltrována přes sloupec s neutrálním oxidem hlinitým (60 g). Rozpouštědla byla

odpařena za sníženého tlaku a bylo získáno 280 mg (89 %) aldehydu 30, který byl použit surový do další reakce: $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 1,02 (3H, s, H-19), 1,12 (3H, s, H-18), 9,41 (1H, s, CHO). $^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CDCl_3): δ 212,89, 206,05, 44,45, 42,37, 40,38, 39,05, 37,35, 36,57, 35,11, 31,29, 31,17, 29,85, 28,45, 26,60, 22,81, 20,02, 17,58.

5

Příklad 28: (4a*S*,4b*S*,7*R*,8a*S*,10a*R*)-4a,7-Dimethyldodekahydrofenantren-2(1H)-on (31a), (4a*S*,4b*S*,8a*S*,10a*R*)-4a,7-dimethyl-3,4,4a,4b,5,8,8a,9,10,10a-dekahydrofenantren-2(1H)-on (31b) a (4a*S*,4b*S*,8a*S*,10a*R*)-4a,7-dimethyl-3,4,4a,4b,5,6,8a,9,10,10a-dekahydrofenantren-2(1H)-on (31c)

10

Látka 31a, 31b, 31c byly připraveny dle *Obecného postupu VI – Wilkinsonova dekarboxylace* z látky 30 (280 mg, 1,07 mmol). Chromatografií na sloupci silikagelu (3 % acetonu v petroletheru) byla získána nedělitelná směs tří produktů 31a, 31b a 31c (210 mg, 91,1 : 4,3 : 4,6).

15

Příklad 29: (2*R*,4a*S*,4b*S*,7*R*,8a*S*,10a*R*)-4a,7-Dimethyldodekahydrofenantren-2-ol (32a), (2*R*,4a*S*,4b*S*,8a*S*,10a*R*)-4a,7-dimethyl-3,4,4a,4b,5,8,8a,9,10,10a-dekahydrokenantren-2-ol (32b) a (2*R*,4a*S*,4b*S*,8a*S*,10a*R*)-4a,7-dimethyl-3,4,4a,4b,5,6,8a,9,10,10a-dekahydrokenantren-2-ol (32c)

20

Směs tří látek 31a, 31b a 31c v tetrahydrofuranu (18 ml) byla vychlazená na teplotu $-40\text{ }^\circ\text{C}$ a za míchání byl přidán tri-*tert*-butoxy hydridohlinitan lithný (210 mg, 0,83 mmol). Po 2 h byla směs ohřívána na teplotu místnosti a reakce ukončena přidáním vodného roztoku kyseliny chlorovodíkové (5%, 20 ml). Produkt byl extrahován chloroformem, spojené organické extrakty byly promyty nasyceným roztokem hydrogenuhlčitanu sodného, nasyceným roztokem chloridu sodného a sušeny bezvodým síranem sodným. Rozpouštědla byla odpařena za sníženého tlaku a byla získána směs tří hydroxyderivátů 32a, 32b a 32c (180 mg).

25

30

Příklad 30: (2*R*,4a*S*,4b*S*,7*R*,8a*S*,10a*R*)-4a,7-Dimethyltetradekahydrofenantren-2-ol (33)

K odparku 32a, 32b a 32c rozpuštěním v dichlormethanu (15 ml) byla přidána směs octanu sodného (66 mg, 0,81 mmol), vody (0,6 ml) a kyseliny peroxyoctové (9%, 2,4 ml) a reakční směs byla míchána 2 h za teploty místnosti. Reakce byla ukončena přidáním nasyceného vodného roztoku siřičitanu sodného, produkt byl extrahován chloroformem, spojené organické extrakty byly promyty vodou a sušeny bezvodým síranem hořečnatým. Rozpouštědla byla odpařena za sníženého tlaku a chromatografií (5 % acetonu v petroletheru) bylo získáno 90 mg (36 %, 3 stupně) žádané látky 33: $[\alpha]_D^{20} +24,0$ (*c* 0,27, CHCl_3). $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 0,79 (3H, s, H-19), 0,84 (3H, d, $J = 7,3$, H-18), 3,53 (1H, tt, $J_1 = 11,1$ a $J_2 = 4,7$, H-3). $^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CDCl_3): δ 72,11, 42,49, 41,02, 40,80, 36,58, 34,86, 34,81, 32,70, 30,95, 30,87, 29,48, 27,81, 27,37, 23,62, 19,35, 18,31. IČ spektrum (CHCl_3): 3608 (OH); 2958, 2866 (methyl); 1038, 1029 (C-OH). MS (CI) *m/z*: 236,2 (8 %, M), 235,2 (15 %, M - H). HR-MS (CI) *m/z*: Pro $\text{C}_{16}\text{H}_{27}\text{O}$ (M-1) vypočteno: 235,2061; nalezeno: 235,2070.

35

40

45

Příklad 31: 4-(((2*R*,4a*S*,4b*S*,7*R*,8a*S*,10a*R*)-4a,7-Dimethyltetradekahydrofenantren-2-yl)oxy)-4-oxobutanová kyselina (34)

50

Látka 34 byla připravena dle *Obecného postupu II – příprava C-3 hemisukcinátu* z látky 33 (65 mg, 0,27 mmol). Chromatografií na sloupci silikagelu (10 % acetonu v petroletheru) bylo získáno 40 mg (43 %) látky 34: t.t. 119 – 121 $^\circ\text{C}$ (aceton/*n*-heptan). $[\alpha]_D^{20} +43,9$ (*c* 0,273, CHCl_3). $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 0,90 (3H, s, H-18), 0,94 (3H, d, J , 7,2, H-19), 2,74 –

2,54 (4H, m, H-2' a H-4'), 4,75 (1H, tt, $J_1 = 11,4$ a $J_2 = 4,7$, H-3). ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ 171,26, 171,83, 75,29, 42,32, 40,99, 40,78, 34,84, 34,53, 32,67, 32,33, 30,92, 29,45, 29,40, 29,06, 27,80, 27,20, 26,89, 23,58, 19,36, 18,31. IČ spektrum (CHCl_3): 1727, 1716 (C=O); 1280 (C-O, dimer); 1232, 1176 (COC). MS (ESI) m/z : 335,4 (100 %, M - H). HR-MS (ESI) m/z : Pro $\text{C}_{20}\text{H}_{31}\text{O}_4$ (M-1) vypočteno: 335,2228; nalezeno: 335,2228.

Příklad 32: Pyridinium (2*R*,4*aS*,4*bS*,7*R*,8*aS*,10*aR*)-4*a*,7-dimethyltetradekahydrofenantren-2-yl-sulfát (35)

Látka 35 byla připravena dle *Obecného postupu I – příprava C-3 sulfátu* z látky 33 (108 mg, 0,46 mmol). Byl získán sulfát 35 (66 mg, 36 %): t.t. 147 – 149 °C. $[\alpha]_{\text{D}}^{20} +25,3$ (c 0,25, CHCl_3). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 0,88 (3H, s, H-18), 0,92 (3H, d, $J = 7,2$, H-19), 4,46 (1H, tt, $J_1 = 11,3$ a $J_2 = 4,8$, H-3), 8,00 (2H, m, H-2' a H-4', pyridinium), 8,47 (1H, t, $J = 8,6$, H-3', pyridinium), 8,95 – 9,01 (2H, m, H-1' a H-5', pyridinium). ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ 145,78 (C-1', C-5'), 142,51 (C-3'), 127,26 (C-2', C-4'), 79,87, 42,52, 41,06, 40,74, 34,81, 34,70, 33,45, 32,72, 30,89, 29,40, 28,05, 27,81, 27,20, 23,54, 19,33, 18,30. IČ spektrum (CHCl_3): 3140, 3099, 1490, 826 (pyH); 1380 (methyl); 1263, 1255, 1173, 1047, 953 (SO_3). MS (ESI) m/z : 315,3 (100 %, M - H - pyridin). HR-MS (ESI) m/z : Pro $\text{C}_{16}\text{H}_{27}\text{O}_4\text{S}$ (M-H-pyridin) vypočteno: 315,1636; nalezeno: 315,1634.

Příklad 33: Methyl (2*S*,4*aS*,4*bS*,7*S*,8*aR*,10*aS*)-7-hydroxy-2,4*b*-dimethyltetradekahydrofenantren-2-karboxylát (36)

K roztoku acetátu 28 (1,7 g, 5,1 mmol) v methanolu (85 ml) byla za míchání přidána směs hydroxidu draselného (1,3 g, 23,2 mmol) ve vodě (1 ml) a v methanolu (40 ml). Po 7 h stání za teploty místnosti byla reakční směs zahuštěna za sníženého tlaku na 1/3 svého objemu, produkt byl extrahován ethyl-acetátem (3x 20 ml), spojené organické fáze byly promyty vodou (2x 20 ml), zředěnou kyselinou chlorovodíkovou (5%, 2x 20 ml), nasyceným roztokem hydrogenuhlčitanu sodného, nasyceným roztokem chloridu sodného a sušeny bezvodým síranem sodným. Rozpouštědla byla odpařena za sníženého tlaku a bylo získáno 1,24 g, (83 %) nekystalizující látky 36: $[\alpha]_{\text{D}}^{20} +13,5$ (c 0,47, CHCl_3). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 0,94 (3H, s, H-19), 1,19 (3H, s, H-18), 3,66 (3H, s, H-OCH₃), 4,07 – 4,15 (1H, m, H-3). ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ 179,45, 67,19, 51,87, 42,49, 39,26, 36,76, 35,22, 34,53, 33,54, 31,71, 29,50, 28,96, 28,06, 26,68, 23,97, 20,57, 20,51. IČ spektrum (CHCl_3): 1719 (C=O); 1381 (methyl); 1245, 1033 (C-O). MS (ESI) m/z : 317,2 (100 %, M + Na). HR-MS (ESI) m/z : Pro $\text{C}_{18}\text{H}_{30}\text{O}_3\text{Na}$ (M+Na) vypočteno: 317,2087; nalezeno: 317,2087.

Příklad 34: Methyl (2*S*,4*aS*,4*bS*,8*aR*,10*aS*)-2,4*b*-dimethyl-7-oxotetradekahydrofenantren-2-karboxylát (37)

Jonesovo činidlo bylo přikapáno k vychlazenému (0 °C) roztoku hydroxyderivátu 36 (300 mg, 1,02 mmol) v acetonu (5 ml). Průběh reakce byl sledován pomocí TLC a reakce byla ukončena přidáním methanolu (5 ml). Směs byla nalita do vody, produkt byl extrahován ethyl-acetátem (3x 20 ml), spojené organické fáze byly promyty nasyceným roztokem hydrogenuhlčitanu sodného, vodou a sušeny bezvodým síranem sodným. Rozpouštědla byla odpařena za sníženého tlaku a bylo získáno 250 mg (84 %) ketonu 37: $[\alpha]_{\text{D}}^{20} +22,9$ (c 0,38, CHCl_3). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 1,00 (3H, s, H-19), 1,22 (3H, s, H-18), 3,66 (3H, s, OCH₃). ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ 213,04, 179,09, 51,93, 44,51, 42,38, 42,24, 40,24, 37,38, 36,61, 35,02, 34,38, 31,58, 29,83, 28,38, 26,66, 22,75, 20,60, 20,55. IČ spektrum (CHCl_3): 2980, 2934, 1465, 1435, 1383 (methyl); 1720, 1711 (C=O); 1244, 1124 (C-O). MS (ESI) m/z : 315,2 (100 %, M + Na). HR-MS (ESI) m/z : Pro $\text{C}_{18}\text{H}_{28}\text{O}_3\text{Na}$ (M+Na) vypočteno: 315,1931; nalezeno: 315,1929.

Příklad 35: Methyl (2*S*,4*aS*,4*bS*,7*R*,8*aR*,10*aS*)-7-hydroxy-2,4*b*-dimethyltetradekahydrofenantren-2-karboxylát (38)

5

Látka 38 byla připravena z látky 37 (100 mg, 0,34 mmol) analogicky dle přípravy látek 32. Byl získán nekystalizující hydroxyderivát 38 (71 mg, 71 %): $[\alpha]_D^{20} +21,6$ (*c* 0,19, CHCl₃). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 0,90 (3H, s, H-18), 1,18 (3H, s, H-19), 3,66 (3H, s, H-OCH₃), 3,58 – 3,65 (1H, m, H-3). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 179,37, 171,94, 51,88, 42,39, 42,33, 39,98, 36,52, 34,91, 34,66, 34,48, 31,91, 30,82, 29,10, 27,22, 23,46, 20,59, 20,33. IČ spektrum (CHCl₃): 3608 (OH); 2976, 2936, 1435, 1389 (methyl); 2936, 2865 (CH₂); 1720 (C=O); 1192, 1126, 1036, 1022 (C-O). MS (ESI) *m/z*: 317,2 (100 %, M + Na). HR-MS (ESI) *m/z*: Pro C₁₈H₃₀O₃Na (M+Na) vypočteno: 317,2087; nalezeno: 317,2088.

15

Příklad 36: 4-(((2*R*,4*aS*,4*bS*,7*S*,8*aS*,10*aR*)-7-(Methoxykarbonyl)-4*a*,7,8*a*-trimethyltetradekahydrofenantren-2-yl)oxy)-4-oxobutanová kyselina (39)

Látka 39 byla připravena dle *Obecného postupu II – příprava C-3 hemisukcinátu* z látky 38 (60 mg, 0,20 mmol). Chromatografií na sloupci silikagelu (15 % acetonu v petroléteru) bylo získáno 42 mg (52 %) derivátu 39: t.t. 110–111 °C (aceton/*n*-heptan). $[\alpha]_D^{20} +23,3$ (*c* 0,29, CHCl₃). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 0,91 (3H, s, H-19), 1,19 (3H, s, H-18), 2,56 – 2,72 (4H, m, H-2' a H-4'), 3,66 (3H, s, H-OCH₃), 4,75 (1H, tt, *J*₁ = 11,3, *J*₂ = 4,7, H-3). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ 179,37, 176,38, 171,86, 75,02, 51,91, 42,42, 42,39, 42,15, 39,97, 34,70, 34,58, 34,48, 32,24, 31,89, 29,46, 29,02, 28,92, 27,06, 26,83, 23,42, 20,58, 20,36. IČ spektrum (CHCl₃): 2937 (OCH₃); 1718 (C=O); 1242, 1126, 1102 (C-O). MS (ESI) *m/z*: 393,3 (100 %, M – H), 394,3 (25 %, M). HR-MS (ESI) *m/z*: Pro C₂₂H₃₃O₆ (M-1) vypočteno: 393,2283; nalezeno: 393,2283.

30

Příklad 37: Methyl (2*S*,4*aS*,4*bS*,7*R*,8*aR*,10*aS*)-2,4*b*-dimethyl-7-(sulfooxy)tetradekahydrofenantren-2-karboxylát (40)

Látka 40 byla připravena dle *Obecného postupu I – příprava C-3 sulfátu* z látky 38 (100 mg, 0,34 mmol). Byl získán sulfát 40 (72 mg, 47 %): t.t. 115–118 °C. $[\alpha]_D^{20} +24,1$ (*c* 0,23, CHCl₃). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 0,89 (3H, s, H-19), 1,17 (3H, s, H-18), 3,65 (3H, s, OCH₃), 4,45 (1H, tt, *J*₁ = 11,0, *J*₂ = 5,0, H-3), 8,01 (2H, m, H-2' a H-4', pyridinium), 8,48 (1H, tt, *J*₁ = 7,9, *J*₂ = 1,5, H-3', pyridinium), 8,99 (2H, dd, *J*₁ = 6,5, *J*₂ = 1,4), H-1' a H-5', pyridinium). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ 179,39, 145,90 (C-1', C-5'), 142,46 (C-3'), 127,33 (C-2', C-4'), 79,55, 64,51, 51,87, 42,40, 42,33, 39,91, 34,83, 34,55, 34,48, 33,38, 31,84, 29,02, 28,01, 27,05, 23,38, 20,57, 20,29. IČ spektrum (CHCl₃): 3140, 3099, 1490 (pyH); 1720 (C=O); 1435, 1380 (methyl); 1254, 1049, 957 (SO₃); 1245, 1192, 1013 (C-O). MS (ESI) *m/z*: 373,2 (100 %, M – H – pyridin). HR-MS (ESI) *m/z*: Pro C₁₈H₂₉O₆S (M-H-pyridin) vypočteno: 373,1690; nalezeno: 373,1688.

45

Příklad 38: (4*aS*,4*bS*,7*S*,8*aS*,10*aR*)-7-(Hydroxymethyl)-4*a*,7-dimethyldodekahydrofenantren-2(1H)-on (41)

Vodný roztok chlornanu sodného (4,5%, 1,05 ml) byl přidán do roztoku diolu 29 (80 mg, 0,30 mmol) v kyselině octové (2,5 ml). Reakční směs byla míchána za teploty místnosti 1 h, pak byl přidán propan-2-ol (1,5 ml) a směs byla míchána 30 min. Reakce byla ukončena přidáním vody (5 ml), produkt byl extrahován chloroformem (3x 10 ml), spojené organické extrakty byly promyty nasyceným roztokem chloridu sodného a sušeny bezvodým síranem sodným. Rozpouštědla byla odpařena a odparek chromatografován na sloupci silikagelu (4 – 10 % acetonu v pet-

rolétheru). Bylo získáno 48 mg (60 %) olejovitého ketonu 41: $[\alpha]_D^{20} +26,1$ (*c* 0,38, CHCl₃). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 0,92 (3H, s, H-18), 1,01 (3H, s, H-19), 3,24 – 3,34 (2H, m, CH₂OH). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ 213,36, 74,67, 44,65, 42,48, 42,47, 40,85, 37,42, 36,74, 35,86, 35,14, 34,24, 31,79, 28,77, 26,76, 22,85, 20,84, 20,28. IČ spektrum (CHCl₃): 3630 (OH); 2931, 2867 (CH₂); 1705 (C=O); 1034 (CCO). MS (ESI) *m/z*: 287,2 (100 %, M + Na). HR-MS (ESI) *m/z*: Pro C₁₇H₂₈O₂Na (M+Na) vypočteno: 287,1982; nalezeno: 287,1981.

Příklad 39: ((4a*S*,4b*S*,7*S*,8a*S*,10a*R*)-4a,7-Dimethyldodekahydro-1H-spiro[fenantren-2,2'-[1,3]dioxolan]-7-yl)methanol (42)

Látka 42 byla připravena z látky 41 (350 mg, 1,32 mmol) analogicky dle přípravy látky 15. Chromatografií na sloupci silikagelu (1 % triethylaminu a 10 % ethyl-acetátu v petroléther) bylo získáno 336 mg (82 %) olejovitého ketálu 42: $[\alpha]_D^{20} +19,5$ (*c* 0,11, CHCl₃). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 0,89 (3H, s, H-18), 0,93 (3H, s, H-19), 3,26 (2H, s, CH₂OH), 3,93 (4H, s, OCH₂CH₂O). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ 110,20, 74,94, 64,39, 64,22, 42,70, 41,22, 39,96, 35,82, 35,75, 34,77, 34,39, 33,86, 31,90, 30,37, 29,23, 26,86, 23,30, 20,74, 20,27. IČ spektrum (CHCl₃): 3630, 3475 (OH); 1382, 1364 (methyl); 1183, 1093, 1068, 947 (COCOC); 1034 (CCO). MS (ESI) *m/z*: 331,3 (100 %, M + Na). HR-MS (ESI) *m/z*: Pro C₁₉H₃₂O₃Na (M+Na) vypočteno: 331,2244; nalezeno: 331,2246.

Příklad 40: (4a*S*,4b*S*,7*S*,8a*S*,10a*R*)-7-(Methoxymethyl)-4a,7-dimethyldodekahydro-1H-spiro[fenantren-2,2'-[1,3]dioxolan] (43)

Hydrid sodný (60% suspenze v oleji, 200 mg) byl přidán k roztoku ketálu 42 (250 mg, 0,81 mmol) sušeném tetrahydrofuranu (17 ml) a směs byla pod inertní atmosférou argonu 1 h míchána a zahřívána na 90 °C. Pak byl přidán methyl jodid (0,4 ml, 6,5 mmol) a směs byla dále pod inertní atmosférou argonu 5 h míchána a zahřívána na 90 °C. Po ochlazení byl produkt extrahován ethyl-acetátem, spojené organické extrakty byly promyty nasyceným vodným roztokem chloridu sodného a sušeny bezvodým síranem hořečnatým. Odpařením rozpouštědel bylo získáno 240 mg (92 %) nekrytalizujícího methoxyderivátu (42): $[\alpha]_D^{20} +15,9$ (*c* 0,41, CHCl₃). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 0,89 (3H, s, H-18), 0,92 (3H, s, H-19), 2,99 (2H, s, CH₂), 3,33 (3H, s, OCH₃), 3,93 (4H, m, OCH₂CH₂O). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ 110,24, 85,24, 64,37, 64,21, 59,54, 43,20, 41,25, 39,85, 35,75, 35,23, 34,91, 34,76, 33,87, 31,87, 30,36, 29,19, 26,89, 23,30, 20,81, 20,73. IČ spektrum (CHCl₃): 2928, 1449 (CH₂); 2832, 1438, 1387, 1381, 1366 (methyl); 1186, 1094, 1068, 947 (COCOC); 1102 (COC). MS (ESI) *m/z*: 345,3 (55 %, M + Na). HR-MS (ESI) *m/z*: Pro C₂₀H₃₅O₃ (M+1) vypočteno: 323,2581; nalezeno: 323,2580.

Příklad 41: (4a*S*,4b*S*,7*S*,8a*S*,10a*R*)-7-(Methoxymethyl)-4a,7-dimethyldodekahydrofenantren-2(1H)-on (43b)

K roztoku ketálu 42 (145 mg, 0,45 mmol) v acetonu (2,5 ml) byla přidána zředěná kyselina chlorovodíková (5 %, 50 μl) a směs byla míchána za teploty místnosti 1 h. Reakce byla ukončena přidáním nasyceného vodného roztoku hydrogenuhličitanu sodného (10 ml), produkt byl extrahován ethyl-acetátem, spojené organické extrakty byly promyty nasyceným vodným roztokem chloridu sodného a sušeny bezvodým síranem sodným. Odpařením rozpouštědel bylo získáno 120 mg (96 %) nekrytalického ketoderivátu 43b: $[\alpha]_D^{20} +24,8$ (*c* 0,42, CHCl₃). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 0,91 (3H, s, H-18), 1,00 (3H, s, H-19), 3,02 (2H, s, CH₂OH), 3,34 (3H, s, OCH₃). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ 213,45, 84,91, 59,55, 46,05, 42,93, 42,49, 40,71, 37,43, 36,77, 35,27, 35,13, 34,70, 31,77, 28,72, 26,79, 22,85, 20,85, 20,83. IČ spektrum (CHCl₃): 2931, 2866 (CH₂); 1706 (C=O); 1383 (methyl); 1102 (COC). MS (ESI) *m/z*: 301,3 (100 %, M + Na),

279,3 (20 %, M + H). HR-MS (ESI) m/z : Pro $C_{18}H_{30}O_2Na$ (M+Na) vypočteno: 301,2138; nalezeno: 301,2138.

5 Příklad 42: (2*R*,4*aS*,4*bS*,7*S*,8*aS*,10*aR*)-7-(Methoxymethyl)-4*a*,7-dimethyltetradekahydrofenantren-2-ol (44)

Látka 44 byla připravena z látky 43 (40 mg, 0,14 mmol) analogicky dle přípravy látky 17 za použití metanolu. Chromatografií (10 % acetonu v petrolétheru) bylo získáno 28 mg (70 %) olejovitého hydroxyderivátu 44: $[\alpha]_D^{20} +19,7$ (c 0,44, $CHCl_3$). 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 0,88 (3H, s, H-18), 0,89 (3H, s, H-19), 3,00 (2H, s, CH_2OH), 3,33 (3H, s, OCH_3), 3,58 – 3,67 (1H, m, H-3). ^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$): δ 85,22, 72,05, 59,55, 43,15, 42,44, 40,48, 36,53, 35,21, 35,00, 34,88, 34,73, 32,06, 30,82, 29,40, 27,32, 23,54, 20,79, 20,52. IČ spektrum ($CHCl_3$): 3609, 3451 (OH); 2956, 2865, 1388, 1380 (methyl); 1102 (COC); 1036 (C-OH). MS (ESI) m/z : 303,4 (100 %, M + Na). HR-MS (ESI) m/z : Pro $C_{18}H_{32}O_2Na$ (M+Na) vypočteno: 303,2295; nalezeno: 303,2295.

20 Příklad 43: 4-(((2*R*,4*aS*,4*bS*,7*S*,8*aS*,10*aR*)-7-(Methoxymethyl)-4*a*,7-dimethyltetradekahydrofenantren-2-yl)oxy)-4-oxobutanová kyselina (45)

Látka 45 byla připravena dle *Obecného postupu II – příprava C-3 hemisukcinátu* z látky 44 (60 mg, 0,21 mmol). Chromatografií na sloupci silikagelu (10 % acetonu v petrolétheru) bylo získáno 41 mg (50 %) derivátu 45: t.t. 107–109 °C (aceton/*n*-heptan). $[\alpha]_D^{20} +38,8$ (c 0,26, $CHCl_3$). 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 0,88 (3H, s, H-19), 0,90 (3H, s, H-18), 2,53 – 2,72 (4H, m, $OCCH_2CH_2CO$), 3,01 (2H, s, CH_2OH), 3,34 (3H, s, OCH_3), 4,69 – 4,81 (1H, m, H-3). ^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$): δ 177,12, 171,83, 85,10, 75,17, 59,55, 43,06, 42,26, 40,44, 35,24, 34,78 (2x), 34,68, 32,24, 32,04, 29,45, 29,33, 29,04, 27,17, 26,81, 23,50, 20,85, 20,55. IČ spektrum ($CHCl_3$): 1726, 1717 (C=O); 1385 (methyl); 1169, 1101 (COC). MS (ESI) m/z : 403,2 (100 %, M + Na). HR-MS (ESI) m/z : Pro $C_{22}H_{36}O_5Na$ (M+Na) vypočteno: 403,2455; nalezeno: 403,2455.

35 Příklad 44: Pyridinium (2*R*,4*aS*,4*bS*,7*S*,8*aS*,10*aR*)-7-(methoxymethyl)-4*a*,7-dimethyltetradekahydrofenantren-2-yl-sulfát (46)

Látka 46 byla připravena dle *Obecného postupu I – příprava C-3 sulfátu* z látky 44 (98 mg, 0,35 mmol). Byl získán sulfát 46 (105 mg, 68 %): t.t. 132 – 134 °C. $[\alpha]_D^{20} +22,0$ (c 0,26, $CHCl_3$). 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 0,87 (3H, s, H-19), 0,88 (3H, s, H-18), 3,65 (3H, s, OCH_3), 2,99 (2H, s, CH_2O), 3,32 (3H, s, CH_3O), 4,46 (1H, tt, $J_1 = 11,1$, $J_2 = 4,8$, H-3), 8,00 (2H, m, H-2' a H-4', pyridinium), 8,47 (1H, tt, $J_1 = 7,9$, $J_2 = 1,7$, H-3', pyridinium), 8,92 – 9,06 (2H, m, H-1' a H-5', pyridinium). ^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$): δ 145,78 (C-1', C-5'), 142,52 (C-3'), 127,27 (C-2', C-4'), 85,23, 79,75, 59,53, 43,20, 42,47, 40,43, 35,22, 34,94, 34,91, 34,63, 33,39, 32,01, 29,34, 28,01, 27,17, 23,47, 20,79, 20,51. IČ spektrum ($CHCl_3$): 3140, 3099, 1490, 1024 (pyridinium); 1388, 1381 (methyl); 1262, 1254, 1173, 1047 (SO_3); 1109, 1101 (COC). MS (ESI) m/z : 359,3 (100 %, M – H – pyridin). HR-MS (ESI) m/z : Pro $C_{18}H_{31}O_5S$ (100 %, M–H–pyridin) vypočteno: 359,1898; nalezeno: 359,1895.

50 Příklad 45: (3*R*,5*R*,8*S*,9*S*,10*S*,13*S*,14*S*)-10,13-Dimethylhexadekahydro-1*H*-cyklopenta[*a*]fenantren-3-ol (48)

Kovový zinek (42 g) byl za stálého míchání postupně přisypáván ke směsi komerčně dostupného 3*alfa*-hydroxy-5*beta*-androstan-17-onu 47 (6 g, 0,02 mol) v methanolu (90 ml) a dichlormetha-

nu (90 ml). Reakční směs byla ochlazena na 0 °C, byl přikapán trimethylsilylchlorid (84 ml) a směs byla míchána při teplotě místnosti 14 hodin. Průběh reakce byl sledován na TLC. Směs byla přefiltrována přes buničinu, filtrát byl neutralizován nasyceným vodným roztokem hydrogenuhličitanu sodného. Produkt byl extrahován chloroformem (3x 50 ml), spojené organické fáze promyty vodným roztokem kyseliny chlorovodíkové (5%, 30 ml), nasyceným vodným roztokem chloridu sodného, vysušeny bezvodým síranem sodným a rozpouštědla byla odpařena za sníženého tlaku. Produkt byl čištěn chromatografií na silikagelu (4 % acetonu v petroletheru). Bylo izolováno 4,5 g (79 %) *5beta*-androstan-*3alpha*-olu (48). Látka 48: t.t. 143 – 144 °C. $[\alpha]_D^{20} +10,9$ (c 0,27, CHCl₃). IČ spektrum (CHCl₃): 3608, 3446 (OH); 2972, 2887, 1377, (CH₃); 2935, 2865, 1450; (CH₂) 1081, 1065, 1034 (CO). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 0,68 (3H, s, H-18), 0,92 (3H, s, H-19), 3,58 – 3,67 (1H, m, H-3). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): 72,05 (C-3), 54,73, 42,28, 41,09, 40,91, 40,64, 39,22, 36,65, 36,38, 35,63, 34,89, 30,73, 27,37, 26,99, 25,70, 23,56, 20,99, 20,74, 17,65. Pro C₁₉H₃₂O (276,2) vypočteno: 82,55 % C, 11,67 % H; nalezeno: 82,31 % C, 11,82 % H.

15

Příklad 46: Pyridinium (3*R*,5*R*,8*S*,9*S*,10*S*,13*S*,14*S*)-10,13-dimethylhexadekahydro-1H-cyklopenta[*a*]fenantren-3-yl-sulfát (49)

Látka 49 byla připravena dle *Obecného postupu I – příprava C-3 sulfátu* z látky 48 (200 mg, 0,72 mmol). Byly získány bílé krystaly sulfátu 49 (211 mg, 67 %): t.t. 180 – 182 °C (chloroform). $[\alpha]_D^{20} +16,0$ (c 0,28, CHCl₃/MeOH, 2:0,1 ml). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 0,67 (3H, s, H-18), 0,92 (1H, s, H-19), 4,48 (1H, tt, *J*₁ = 11,3, *J*₂ = 4,9, H-3), 7,94 – 8,04 (2H, m, H-2 a H-4, pyridinium), 8,47 (1H, tt, *J*₁ = 7,9, *J*₂ = 1,6, H-3, pyridinium), 8,97 (2H, dt, *J*₁ = 5,6, *J*₂ = 1,5, H-1 a H-5, pyridinium). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃/CD₃OD) δ: 145,57 (C-1' a C-5', pyridinium), 142,33 (C-3', pyridinium), 127,07 (C-2' a C-4', pyridinium), 79,71 (C-3), 54,67, 42,23, 40,97, 40,75, 40,53, 39,13, 36,23, 35,48, 34,67, 33,39, 27,80, 27,10, 26,81, 25,58, 23,35, 20,85, 20,61, 17,53. IČ spektrum (CHCl₃): 1260, 1178, 1050, 970 (OSO₃). MS (EI) *m/z*: 355,2 (100 %, M – pyridinium). HR-MS (ESI) *m/z*: Pro C₁₉H₃₁O₄S vypočteno: 355,1949; nalezeno: 355,1949.

30

Příklad 47: 2-(((3*R*,5*R*,8*S*,9*S*,10*S*,13*S*,14*S*)-10,13-Dimethylhexadekahydro-1H-cyklopenta[*a*]fenantren-3-yl)oxy)-2-oxoethanová kyselina (50)

5beta-Androstan-*3alpha*-ol 48 (100 mg, 0,362 mmol) byl rozpuštěn v sušeném dichlormethanu (2 ml). Roztok byl ochlazen na 0 °C a za míchání byl přidán triethylamin (0,05ml), kapka z roztoku *N,N'*-dimethylformamidu (0,03 ml) v dichlormethanu (2 ml) a chlorid kyseliny šťavelové (0,09 ml, 1,086 mmol). Směs byla ohřáta na 10 °C a při této teplotě míchána 2 h. Nadbytek reagentu byl rozložen přidavkem vody (10 ml) a mícháním za teploty místnosti 30 min. Poté byla oddělena vodná vrstva, dichlormethan odpařen a odparek rozmíchán v ethyl-acetátu (20 ml) a vodném roztoku uhlíčitanu draselného (10%, 50 ml). Organická vrstva obsahující neutrální nečistoty byla odstraněna, vodná fáze opatrně okyselena zředěnou kyselinou chlorovodíkovou (1N, to pH ~ 4) a extrahována ethyl-acetátem (2x 25 ml). Spojené extrakty byly promyty vodou, sušeny bezvodým síranem sodným a rozpouštědla odpařena za sníženého tlaku. Krystalizací ze směsi aceton/*n*-heptan bylo získáno 70 mg (55 %) hemiesteru kyseliny šťavelové 50: $[\alpha]_D^{20} +27,9$ (c 0,32, CHCl₃). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 0,68 (3H, s, H-18), 0,96 (3H, s, H-19), 4,95 (1H, tt, *J*₁ = 11,4, *J*₂ = 4,9, H-3). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ: 157,83, 157,48, 79,67, 54,69, 42,12, 41,08, 40,83, 40,60, 39,13, 36,30, 35,13, 34,88, 31,89, 27,11, 26,81, 26,32, 25,67, 23,37, 20,99, 20,72, 17,63. IČ spektrum (CHCl₃): 1734, 1726 (C=O), 1268, 1246 (C-O). MS (ESI) *m/z*: 275,3 (100 %, M – COCOO), 347,3 (10 %, M – H). HR-MS (ESI) *m/z*: Pro C₂₁H₃₁O₄ (M-H) vypočteno: 347,2228; nalezeno: 347,2232.

50

Příklad 48: 2-(((3*R*,5*R*,8*S*,9*S*,10*S*,13*S*,14*S*)-10,13-Dimethylhexadekahydro-1*H*-cyklopenta[*a*]-fenantren-3-yl)oxy)-2-oxopropanová kyselina (51)

5 Látka 51 byla připravena dle *Obecného postupu III – příprava C-3 malonátu* z látky 48 (100 mg, 0,36 mmol). Chromatografií na sloupci silikagelu (1 – 10 % acetonu v petroléteru) bylo získáno 67 mg (51 %) nekystalizujícího derivátu 51: $[\alpha]_{\text{D}}^{20} +27,8$ (*c* 0,35, CHCl₃). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 0,68 (3H, s, H-18), 0,94 (3H, s, H-19), 3,42 (2H, s, H-2'), 4,80 – 4,90 (1H, m, H-3). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ: 169,05, 168,01, 77,04, 54,72, 42,10, 41,10, 40,94, 40,64, 40,20,
10 39,17, 36,33, 35,20, 34,90, 32,16, 27,15, 26,87, 26,59, 25,68, 23,48, 21,02, 20,75, 17,66. IČ spektrum (CHCl₃): 1755, 1736, 1717 (C=O); 1330 (OH). MS (EI) *m/z*: 317,3 (100 %, M – HCOOH), 361,3 (20 %, M – H), 723,6 (10 %, 2M – H). HR-MS (ESI) *m/z*: Pro C₂₂H₃₃O₄ vypočteno: 361,2385; nalezeno: 361,2380. 52.

15

Příklad 49: (3*R*,5*R*,8*S*,9*S*,10*S*,13*S*,14*S*)-10,13-Dimethylhexadekahydro-1*H*-cyklopenta[*a*]fenantren-3-yl *N*-2-((benzyloxy)-karbonyl)-*N*-omega-nitro-*L*-argininát (52)

Směs androstanolu 48 (150 mg, 0,54 mmol), chráněného Z,NO₂- argininátu (211 mg, 0,6 mmol),
20 a 4-(*N,N*-dimethylamino)pyridinu (7 mg, 0,06 mmol) bylo rozpuštěno ve směsi acetonitrilu (20 ml) a dichlormethanu (10 ml) a byl přidán roztok dicyklohexylkarbodiimidu v benzenu (1M, 0,813 ml). Reakční směs byla míchána v argonové atmosféře 17 h. Vysrážený derivát *N,N'*-dicyklohexylmočoviny byl odstraněn filtrací a filtrát nalit do nasyceného roztoku hydrogenuhličitanu sodného, produkt byl extrahován do ethyl-acetátu (3 x 25 ml), spojené organické fáze byly
25 promyty nasyceným vodným roztokem chloridu sodného (25 ml) a sušeny bezvodým síranem hořečnatým. Rozpouštědla byla odpařena za sníženého tlaku. Vyčištěním surového odparku (484 mg) chromatografií na sloupci silikagelu (20 % acetonu v petroléteru) byl získán produkt 52 (226 mg, 68 %): t.t. 132 – 133 °C. $[\alpha]_{\text{D}}^{20} -7,5$ (*c* 0,25, CHCl₃). ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 0,69 (3H, s, H-18), 0,95 (3H, s, H-19), 3,22 – 3,31 (1H, m, 5'*b*-CH), 3,41 – 3,50 (1H, m, 5'*a*-CH), 4,28 – 4,36 (1H, m, 2'-CH), 4,73 – 4,83 (1H, m, H-3), 5,12 (2H, s, CH₂-benzyl), 5,75 (1H,
30 *d*, *J* = 8,0, NHCBz), 7,23 – 7,40 (5H, m, fenyl). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ: 171,43, 159,42, 136,01, 128,70, 128,49, 127,88, 76,57, 67,51, 54,54, 42,04, 40,98, 40,83, 40,50, 40,41, 40,29, 39,01, 36,24, 35,07, 34,78, 33,91, 32,20, 31,17, 27,06, 26,74, 26,58, 25,64, 26,56, 24,95, 24,48, 23,34, 20,92, 20,63, 17,55. IČ spektrum: 1730 (C=O, ester); 1705 (C=O, karbamát); 1348, 1326,
35 1291 (NO₂); 1231 (fenyl). MS (EI) *m/z*: 634 (100 %, M + Na), 612 (70 %, M + H).

Příklad 50: (3*R*,5*R*,8*S*,9*S*,10*S*,13*S*,14*S*)-10,13-Dimethylhexadekahydro-1*H*-cyklopenta[*a*]fenantren-3-yl *L*-argininát dihydrochlorid (53)

40

K roztoku androstanol-Boc,NO₂-argininátu 52 (203 mg, 0,33 mmol) v methanolu (9,5 ml) a kyselíně octové (0,5 ml) byl přidán paladiový katalyzátor (Pd/C, 10%, 20,3 mg). Směs byla intenzivně míchána za mírného přetlaku vodíku 18 h za teploty místnosti. Průběh reakce byl kontrolován TLC, ve směsi petroléter/aceton, 1:1. Po vymizení výchozí látky byl katalyzátor odfiltrován
45 přes malý sloupec křemeliny. Filtrát byl zředěn chloroformem (5 ml), promyt zředěnou kyselinou chlorovodíkovou (5%, 5 ml) a sušen bezvodým síranem hořečnatým. Vysrážený hydrochlorid 53 (140 mg, 84 %) byl odsát a sušen na vzduchu. Produkt 53 byl vykrytalizován ze směsi methanol/voda: t.t. 238 – 240 °C. $[\alpha]_{\text{D}}^{20} +20$ (*c* 0,32, CHCl₃). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 0,74 (3H, s, H-18), 1,00 (3H, s, H-19), 3,27 (2H, *d*, *J* = 7,8, H-5'), 4,06 (1H, *d*, *J* = 7,8, H-2'), 4,89 (1H, *m*, H-3). ¹³C NMR (101 MHz, CD₃OD) δ: 169,69, 78,49, 62,66, 55,92, 53,69, 43,29, 42,16, 42,03, 41,67, 41,54, 37,54, 35,83, 33,19, 28,75, 28,09, 27,92, 27,57, 26,52, 25,64, 25,54, 23,75, 21,94, 21,43, 22,13, 17,86. IČ spektrum (CHCl₃): 3344, 3164, (NH); 1703, 1681, 1600 (guanidinium); 1727 (C=O, ester). MS (ESI) *m/z*: 433,4 (100 %, M – 2HCl). HR-MS (ESI) *m/z*: Pro C₂₅H₄₅N₄O₂ (M–2HCl) vypočteno: 433,3537; nalezeno: 433,3537.

55

Příklad 51: (3*S*,5*R*,8*S*,9*S*,10*S*,13*S*,14*S*)-10,13-Dimethylhexadekahydro-1*H*-cyklopenta[*a*]fenantren-3-yl 4-methylbenzensulfonát (55)

5 K roztoku 5*beta*-androstan-3*beta*-olu 54 (připravenému stejným postupem jako 48, 4 g, 14,47 mmol) v suchém pyridinu (75 ml) vychlazenému na 0 °C byl přidán 4-(*N,N*-dimethylamino)pyridin (150 mg, 1,2 mmol) a chlorid kyseliny *para*-toluensulfonové (5,52 g, 28,94 mmol). Reakční směs byla ohřívána na teplotu místnosti a poté míchána 24 h. Průběh reakce byl sledován chromatografií na tenké vrstvě silikagelu (petroléter/éter, 4:1). Po vymizení
10 výchozí látky byla reakční směs nalita na led a vyloučený pevný produkt 55 (5,88 g, 94 %) odsát, promyt vodou a sušen při 50 °C: $[\alpha]_D^{20} +2,9$ (*c* 0,61, CHCl₃). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 0,66 (3H, s, H-18), 0,94 (3H, s, H-19), 2,44 (3H, s, CH₃-tosylát), 4,81 – 4,85 (1H, m, H-3), 7,32 (2H, d, *J* = 8,2, tosylát), 7,79 (2H, d, *J* = 8,2, tosylát). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ 144,38, 134,95, 129,83 (2x), 127,75 (2x), 81,06, 54,80, 41,08, 40,62, 40,52, 39,19, 36,91, 36,10, 34,96,
15 31,49, 30,25, 26,64, 26,37, 25,96, 25,63, 23,78, 21,77, 21,21, 20,71, 17,65. IČ spektrum (CHCl₃): 2960 (CH₃); 1174 (SO₂); 905 (C–O). MS (ESI) *m/z*: 883,4 (100 %, 2M + Na), 453,2 (80 %, M + Na). HR-MS (ESI) *m/z*: pro C₂₆H₃₈O₃NaS (M+Na) vypočteno: 453,2434; nalezeno: 453,2434.

20 Příklad 52: (3*R*,5*R*,8*S*,9*S*,10*S*,13*S*,14*S*)-3-Azido-10,13-dimethylhexadekahydro-1*H*-cyklopenta[*a*]fenantren (56)

Tosylderivát 55 (5,88 g, 13,68 mmol) a azid sodný (7,11 g, 109,5 mmol) v *N,N*-dimethylformamidu (65 ml) byly pod argonovou atmosférou míchány při 55 °C 4 h. Poté byla reakční směs
25 nalita do vody, produkt extrahován do ethyl-acetátu (3x 80 ml), spojené organické fáze promyty zředěnou kyselinou chlorovodíkovou (5%, 2x 40 ml), vodou, nasyceným vodným roztokem hydrogenuhličitanu draselného (2x 40 ml), vodou a sušeny bezvodým síranem hořečnatým. Rozpouštědla byla odpařena za sníženého tlaku a odparek (4 g) čištěn chromatografií na sloupci silikagelu (2 % étheru v petroléteru). Bylo získáno 2,8 g (68 %) 3*alfa*-azidu 56 a 0,8 g (19 %) jeho
30 směsi (1:1) s 3*beta* izomerem: $[\alpha]_D^{20} +22,4$ (*c* 0,29, CHCl₃). ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD): δ 0,68 (3H, s, H-18), 0,94 (3H, s, H-19), 3,31 (1H, tt, *J*₁ = 11,8, *J*₂ = 4,5, H-3). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ 61,43, 54,64, 42,57, 41,07, 40,92, 40,61, 39,12, 36,33, 35,85, 34,95, 32,63, 27,27, 26,90 (2x), 25,67, 23,63, 20,98, 20,72, 17,65. IČ spektrum (CHCl₃): 2937, 2868 (CH₃); 2094 (N₃). MS (ESI) *m/z*: 274,25 (100 %, M + N₂H), 259,24 (40 %, M – N₃H). HR-MS (ESI)
35 *m/z*: Pro C₁₉H₃₁ (M–N₃) vypočteno: 259,2426; nalezeno: 259,2423.

Příklad 53: (3*R*,5*R*,8*S*,9*S*,10*S*,13*S*,14*S*)-10,13-Dimethylhexadekahydro-1*H*-cyklopenta[*a*]fenantren-3-amin (57)

40 Látka 57 byla připravena dle *Obecného postupu V – katalytická hydrogenace* z látky 56 (2,80 g, 9,29 mmol). Chromatografií na sloupci silikagelu (20% methanolu a 1% triethylaminu v dichlormethanu) bylo získáno 1,74 g (68 %) aminu 57: $[\alpha]_D^{20} +14,0$ (*c* 0,47, CHCl₃/MeOH, 1,8:0,1). ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD): δ 0,67 (3H, s, H-18), 0,93 (3H, s, H-19), 2,80 (1H, m, H-3). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ 54,64, 51,79, 42,69, 41,09, 40,89, 40,64, 39,18, 36,42,
45 36,22, 34,95, 30,45, 27,38, 27,01, 25,72, 25,66, 23,75, 21,00, 20,75, 17,67. IČ spektrum (měřeno pro hydrochlorid) (KBr): 3104 (NH₃⁺); 2973, 1450, 1377 (CH₃). MS (ESI) *m/z*: 276,3 (100 %, M + H). HR-MS (ESI) *m/z*: pro C₁₉H₃₄N (M+H) vypočteno: 276,2686; nalezeno: 276,2686.

50

Příklad 54: Ethyl 2-(((3*R*,5*R*,8*S*,9*S*,10*S*,13*S*,14*S*)-10,13-dimethylhexadekahydro-1*H*-cyklopenta[*a*]fenantren-3-yl)amino)-2-oxoacetát (58)

5 K roztoku monochloridu-monoethylesteru kyseliny šťavelové (0,2 ml, 1,82 mmol) v suchém benzenu (10 ml) a suchém pyridinu (1 ml) byl za míchání přikapán roztok aminu 57 (100 mg, 0,36 mmol) v suchém benzenu (15 ml). Reakční směs byla míchána za teploty místnosti 1,5 g. Pak byla filtrována, filtrát promyt zředěnou kyselinou sírovou (5%, 2x 10 ml), a sušen bezvodým síranem sodným. Odpařením rozpouštědel za sníženého tlaku bylo získáno 123 mg (90 %) amidu
 10 58: t.t. 165 – 167 °C (aceton/*n*-heptan). $[\alpha]_D^{20} +36,7$ (*c* 0,38, CHCl₃). ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD): δ 0,68 (3H, s, H-18), 0,95 (3H, s, H-19), 1,38 (3H, t, *J* = 7,1, CH₂CH₃), 3,75 – 3,87 (1H, m, H-3), 4,34 (2H, q, *J* = 7,1, CH₂CH₃), 6,96 (1H, d, *J* = 8,6, NH). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ 161,21, 155,77, 63,29, 54,82, 50,24, 42,44, 41,10, 41,04, 40,65, 39,22, 35,94, 34,86, 33,26, 29,85, 27,57, 27,12, 26,94, 25,68, 23,70, 20,99, 20,73, 17,65, 14,16. IČ spektrum (CHCl₃):
 15 1696 (C=O); 1377 (OEt). MS (ESI) *m/z*: 398,3 (100 %, M + Na). HR-MS (ESI) *m/z*: Pro C₂₃H₃₇O₃NNa (M+Na) vypočteno: 398,2666; nalezeno: 398,2668.

20 Příklad 55: 2-(((3*R*,5*R*,8*S*,9*S*,10*S*,13*S*,14*S*)-10,13-Dimethylhexadekahydro-1*H*-cyklopenta[*a*]fenantren-3-yl)amino)-2-oxooctová kyselina (59)

K roztoku chráněného amidu 58 (110 mg, 0,29 mmol) v methanolu (3 ml) ochlazenému na 0 °C byl přikapán roztok hydroxidu sodného (120 mg, 3 mmol) v methanolu (2 ml). Reakční směs
 25 byla míchána při 10 °C 2 h. Poté byla nalita do vody, okyselena zředěnou kyselinou chlorovodíkovou (5%) na pH 2 a produkt extrahován do étheru (3x 10 ml). Spojené organické fáze byly promyty nasyceným roztokem chloridu sodného, sušeny bezvodým síranem sodným a rozpouštědla odpařena za sníženého tlaku. Bylo získáno 59 mg (64 %) monoamidu 59: t.t. 191 – 193 °C. $[\alpha]_D^{20}$
 30 +32,4 (*c* 0,21, CHCl₃/MeOH, 1,8:0,4). ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD): δ 0,69 (3H, s, H-18), 0,96 (3H, s, H-19), 3,70 – 3,85 (1H, m, H-3), 7,14 (1H, d, *J* = 8,2, NH). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ 160,05, 156,62, 54,77, 51,29, 42,45, 41,10, 41,04, 40,62, 39,17, 36,32, 35,83, 34,85, 33,08, 27,40, 27,08, 26,90, 25,67, 23,67, 21,00, 20,72, 17,65. IČ spektrum (měřeno pro sodnou sůl) (KBr): 1649 (C=O, amid); 1532 (amid); 1377 (CH₃). MS (ESI) *m/z* 346,2 (100 %, M – H). HR-MS (ESI) *m/z*: Pro C₁₉H₃₂NO₃ (M–H) vypočteno: 346,2388; nalezeno 346,2386.

35 Příklad 56: (((3*R*,5*R*,8*S*,9*S*,10*S*,13*S*,14*S*)-10,13-Dimethylhexadekahydro-1*H*-cyklopenta[*a*]fenantren-3-yl)amino)-3-oxopropanová kyselina (61)

40 Roztok aminu 57 (100 mg, 0,36 mmol) v sušeném dichlormethanu (2 ml) s pyridiniem (1 kapka) byl přidán k míchanému roztoku methyl-3-oxo-3-chlorpropionátu (0,44 ml, 0,4 mmol) v dichlormethanu (3 ml). Reakční směs byla míchána za teploty místnosti 1 h a potom nalita do vody. Vodná vrstva byla po okyselení zředěnou kyselinou chlorovodíkovou (5%) vytřepána chloroformem, spojené organické vrstvy byly promyty nasyceným vodným roztokem chloridu sodného, nasyceným vodným roztokem hydrogenuhličitanu sodného, opět nasyceným vodným roztokem
 45 chloridu sodného a sušeny bezvodým síranem hořečnatým. Odpařením rozpouštědel za sníženého tlaku byl získán methylester 60 (130 mg, 96 %), který tvořil (podle IČ a NMR spekter) rovnovážná směs keto a enol formy a po charakterizaci hmotnostním spektrem byla použita pro další reakci. MS (ESI) *m/z*: 398,4 (100 %, M + Na), 773,4 (40 %, 2M + Na). HR-MS (ESI) *m/z*: Pro C₂₃H₃₇NO₃Na (M+Na) vypočteno: 398,2666; nalezeno: 398,2666.

50 Roztok methylesteru 60 (130 mg, 0,35 mmol) a hydroxidu sodného (28 mg, 0,69 mmol) ve směsi tetrahydrofuran (1,5 ml) a voda (1,5 ml) byl míchán za teploty místnosti 3 h. Poté byla reakční směs nalita do vody a neutrální podíly odstraněny extrakcí etherem. Vodná fáze byla okyselena zředěnou kyselinou chlorovodíkovou (5%). Produkt byl extrahován do ethyl-acetátu (3x 15 ml).

Spojené organické extrakty byly promyty vodou a sušeny bezvodým síranem hořečnatým a roz-pouštědla odpařena za sníženého tlaku. Chromatografií na sloupci silikagelu (10 % acetonu v petroléteru) bylo získáno 48 mg (37 %) amidu 61: t.t. 126 – 128 °C. $[\alpha]_D^{20} +25,4$ (*c* 0,25, CHCl₃). ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD): δ 0,68 (3H, s, H-18), 0,95 (3H, s, H-19), 3,29 (2H, s, COCH₂CO), 3,83 (1H, tdt, *J*₁ = 12,4, *J*₂ = 8,7, *J*₃ = 4,6, H-3), 6,3 (1H, d, *J* = 8,4, NH). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ 168,78, 167,91, 54,83, 50,59, 42,49, 41,09, 41,03, 40,65, 39,22, 38,58, 36,31, 35,94, 34,86, 33,33, 27,62, 27,11, 26,94, 25,67, 23,68, 20,98, 20,73, 17,64. IČ spektrum (KBr): 1731, 1719 (C=O, amid); 1630, 1622, 1561 (amid); 1377 (CH₃). MS (ESI) *m/z*: 360,3 (100 %, M – H), 721,5 (25 %, 2M – H). HR-MS (ESI) *m/z*: Pro C₂₂H₃₄NO₃ (M–H) vypočteno: 360,2544; nalezeno: 360,2536.

Příklad 57: 4-(((3*R*,5*R*,8*S*,9*S*,10*S*,13*S*,14*S*)-10,13-Dimethylhexadekahydro-1*H*-cyklopenta[*a*]-fenantren-3-yl)oxy)-*N,N,N*-trimethyl-4-oxobutan-1-amonium chlorid (62)

3-Karboxy-*N,N,N*-trimethylpropan-1-amonium chlorid (69 mg, 0,38 mmol) byl suspendován v bezvodém CH₂Cl₂ (1 ml) v atmosféře argonu. K reakční směsi ochlazené v ledové lázni byl přidán po kapkách chlorid kyseliny šťavelové (0,5 ml, 5,82 mmol), následovaný katalytickým množstvím bezvodého *N,N'*-dimethylformamidu (3 μl, 0,03 mmol). Heterogenní směs byla temperována na teplotu místnosti a při té míchána 16 h. Během této doby se vytvořil čirý roztok. Kapalně podíly směsi byly za sníženého tlaku odpařeny a pevný zbytek rozpuštěn v nitromethanu (2 ml) a bezvodém pyridinu (0,10 ml, 1,24 mmol) pod argonem. K tomuto roztoku byla přidána sloučenina 48 (98 mg, 0,35 mmol). Reakční směs byla míchána 4 h a následně byla reakce ukončena přidáním vody (10 ml). Vzniklá směs byla kyselina na pH 4 vodným roztokem HCl (5% obj./obj.). Produkt byl extrahován do chloroformu (3x 20 ml), roztok promyt nasyceným vodným roztokem chloridu sodného (10 ml), vysušen bezvodým síranem hořečnatým a odpařen za sníženého tlaku. Nezreagovaný výchozí steroid 48 byl odstraněn triturací benzenem a zbylý produkt byl krystalizován ze směsi chloroform/*n*-heptan (1:1). Byly tak získány jehlicovité krystaly 62 (122 mg, 79%): t.t. 225 – 227 °C (*n*-heptan/CHCl₃). $[\alpha]_D^{20} +24,9$ (*c* 0,23, CHCl₃). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 0,69 (3H, s, H-18), 0,94 (3H, s, H-19), 2,03 – 2,14 (2H, br m, H-3'), 2,46 – 2,50 (2H, br m, H-2'), 3,46 (9H, br s, N(CH₃)₃), 3,63 – 3,71 (2H, br m, H-4'), 4,72 (1H, tt, *J*₁ = 11,3, *J*₂ = 4,6, H-3). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ 171,55 (CO), 75,45, 65,73, 54,53, 53,60, 41,98, 40,92, 40,77, 40,46, 39,00, 36,18, 35,12, 34,74, 32,26, 30,28, 27,03, 26,71, 26,63, 25,51, 23,33, 20,86, 20,57, 18,50, 17,50. IČ spektrum (CHCl₃): 2950 (CH₃); 1722 (C=O, ester); 1477 (NMe₃⁺) 1386 (CH₃); 1230 (NMe₃⁺); 1185 (CO). MS (ESI) *m/z*: 404 (100 %, M – Cl). HR-MS (ESI) *m/z*: Pro C₂₆H₄₅NO₂ (M–Cl) vypočteno: 404,3523; nalezeno: 404,3526.

Příklad 58: 4-(((3*R*,5*R*,8*R*,9*S*,10*S*,13*R*,14*S*)-10,13-Dimethyl-2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15-tetradekahydro-1*H*-cyklopenta[*a*]fenantren-3-yl)oxy)-4-oxobutanová kyselina (64)

Látka 64 byla připravena dle *Obecného postupu II – příprava C-3 hemisukcinátu* z látky 63 (103 mg, 0,38 mmol). Chromatografií na sloupci silikagelu (25 % ethyl-acetátu v petroléteru) bylo získáno 85 mg (60 %) derivátu 64: t.t. 127,7 – 128,3 °C (aceton/*n*-heptan). $[\alpha]_D^{20} +30,8$ (*c* 0,27, CHCl₃). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 0,74 (3H, s, H-18), 0,97 (3H, s, H-19), 2,58 – 2,71 (4H, m, OCCH₂CH₂CO), 4,75 (1H, tt, *J*₁ = 11,3, *J*₂ = 4,8, H-3), 5,69 (1H, ddd, *J*₁ = 5,6, *J*₂ = 2,9, *J*₃ = 1,4, H-17), 5,83 (1H, m, H-16). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ 177,03, 171,66, 143,89, 129,29, 74,95, 56,16, 45,64, 42,00, 41,30, 36,09, 35,00, 34,92, 34,49, 32,25, 32,01, 29,28, 28,87, 27,00, 26,54, 23,31, 20,72, 17,03. IČ spektrum (CHCl₃): 1717, 1726 (C=O, COOH); 1578 (C=C). MS (ESI) *m/z*: 397,3 (100 %, M + Na). HR-MS (ESI) *m/z*: Pro C₂₃H₃₄O₄Na (M+Na) vypočteno: 397,23493; nalezeno: 397,23484.

Příklad 59: 3-(((3*R*,5*R*,8*R*,9*S*,10*S*,13*R*,14*S*)-10,13-Dimethyl-2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15-tetradekahydro-1*H*-cyklopenta[*a*]fenantren-3-yl)oxy)-3-oxopropanová kyselina (65)

Látka 65 byla připravena dle *Obecného postupu III – příprava C-3 malonátu* z látky 64 (102 mg, 0,37 mmol). Chromatografií na sloupci silikagelu (25 % ethyl-acetátu v petroléteru) bylo získáno (102 mg, 76 %) derivátu 65: t.t. 156,7 – 157,8 °C (aceton/*n*-heptan). $[\alpha]_D^{20} +30,4$ (*c* 0,31, CHCl₃). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 0,74 (3H, s, H-18), 0,98 (3H, s, H-19), 3,42 (2H, s, H-2'), 4,84 (1H, tt, *J*₁ = 11,3, *J*₂ = 4,8, H-3), 5,69 (1H, ddd, *J*₁ = 5,6, *J*₂ = 2,9, *J*₃ = 1,4, H-17), 5,83 (1H, m, H-16). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ 169,06, 167,78, 143,84, 129,29, 76,90, 56,13, 45,64, 42,00, 41,32, 40,08, 36,06, 34,90 (2 x C), 34,48, 32,05, 31,99, 26,95, 26,51, 26,38, 23,27, 20,73, 17,03. IČ spektrum (CHCl₃): 1760, 1735, 1719 (C=O); 1587 (C=C). MS (ESI) *m/z*: 383,2 (100 %, M + Na). HR-MS (ESI) *m/z*: Pro C₂₂H₃₂O₄Na (M+Na) vypočteno: 383,2193; nalezeno: 383,2192.

15

Příklad 60: (3*R*,5*R*,8*R*,9*S*,10*S*,13*S*,14*S*)-10,13-Dimethyl-17-methylenhexadekahydro-1*H*-cyklopenta[*a*]-fenantren-3-ol (66)

Hydrid sodný (60% v parafinovém oleji, 80 mg, 1,70 mmol) byl přidán k roztoku methyltrifenylfosfonium bromidu (619 mg, 1,73 mmol) v sušeném dimethylsulfoxidu (4 ml) pod inertní atmosférou dusíku a reakční směs byla míchána za teploty místnosti 1 h. Potom byl přidán roztok 17-oxo-5*beta*-androstan-3*alfa*-olu 47 (100 mg, 0,34 mmol) v sušeném tetrahydrofuranu (3 ml) a po 1,5 h míchání při 70 °C, byl přidán vodný roztok chloridu amonného. Produkt byl extrahován do chloroformu (2x 20 ml), spojené organické extrakty byly promyty nasyceným vodným roztokem chloridu sodného a sušeny bezvodým síranem sodným. Rozpouštědla byla odpařena za sníženého tlaku a odparek čištěn preparativní tenkovrstvou chromatografií (eluze 40 % étheru v petroléteru). Byla získána sloučenina 66 (90 mg, 90 %): t.t. 147 – 149 °C (aceton/*n*-heptan). $[\alpha]_D^{20} +30,5$ (*c* 0,22, CHCl₃). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 0,75 (3H, s, H-18), 0,93 (3H, s, H-19), 2,22 (1H, dtt, *J*₁ = 17,7, *J*₂ = 8,8, *J*₃ = 2, H_a-16), 2,47 (1H, dddd, *J*₁ = 16,9, *J*₂ = 10, *J*₃ = 4,4, *J*₄ = 2,2, H_b-16), 3,62 (1H, m, H-3), 4,50 – 4,62 (2H, m, =CH₂). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ 162,07 (C-17), 100,79 (C-20), 71,97 (C-3), 54,63, 44,34, 42,32, 40,89, 36,59, 36,04, 35,97, 35,57, 34,88, 30,69, 29,60, 27,28, 26,51, 24,32, 23,53, 20,86, 18,66. IČ spektrum (CHCl₃): 3609, 3451, 1031 (OH); 1653 (C=C). MS (ESI) *m/z*: 311,3 (100 %, M + Na). HR-MS (ESI) *m/z*: pro C₂₀H₃₂ONa (M+Na) vypočteno: 311,2345, nalezeno: 311,2344.

35

Příklad 61: 3-(((3*R*,5*R*,8*R*,9*S*,10*S*,13*S*,14*S*)-10,13-Dimethyl-17-methylenhexadekahydro-1*H*-cyklopenta[*a*]-fenantren-3-yl)oxy)-3-oxopropanová kyselina (67)

Látka 67 byla připravena dle *Obecného postupu III – příprava C-3 malonátu* z látky 66 (200 mg, 0,69 mmol). Chromatografií na sloupci silikagelu (1 – 10 % acetonu v petroléteru) byla získána sloučenina 67 (239 mg, 92 %): t.t. 109 – 111 °C (aceton/*n*-heptan). $[\alpha]_D^{20} +49,5$ (*c* 0,31, CHCl₃). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 0,76 (3H, s, H-18), 0,96 (3H, s, H-19), 2,23 (1H, m, H-16a), 2,48 (1H, m, H-16b), 3,40 (2H, s, COCH₂CO), 4,62 (2H, m, =CH₂), 4,83 (1H, m, H-3). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ 169,29 (COOH), 167,84 (COO), 161,96 (C-17), 100,87, (C-20), 76,87 (C-3), 54,63, 44,34, 42,14, 40,93, 40,30, 36,01, 35,92, 35,15, 34,90, 32,13, 29,61, 27,06, 26,56, 26,38, 24,31, 23,44, 20,91, 18,67. IČ spektrum (CHCl₃): 3510 (OH, COOH, monomer); 3120 (OH, COOH, dimer); 3069, 1654, 885 (=CH₂); 1778 (C=O, COOH, monomer); 1716 (C=O, COOH, monomer). MS (ESI) *m/z*: 397,3 (100 %, M + Na), 771,6 (10 %, 2M + Na). Pro C₂₃H₃₄O₄ (374,5) vypočteno: 73,76 % C, 9,15 % H; nalezeno: 72,74 % C, 9,37 % H.

50

Příklad 62: 4-(((3*R*,5*R*,8*R*,9*S*,10*S*,13*S*,14*S*)-10,13-Dimethyl-17-methylenhexadekahydro-1*H*-cyklopenta[*a*]-fenantren-4-oxobutanová kyselina (68)

5 Látka 68 byla připravena dle *Obecného postupu II – příprava C-3 hemisukcinátu* z látky 66 (200 mg, 0,69 mmol). Chromatografií na sloupci silikagelu (10 % acetonu v petroléteru) byl získán derivát 68 (265 mg, 99 %) v podobě pevné pěny: $[\alpha]_D^{20} +54,5$ (*c* 0,30, CHCl₃). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 0,76 (3H, s, H-18), 0,94 (3H, s, H-19), 2,23 (1H, m, H-16a), 2,47 (1H, m, H-16b), 2,56 – 2,68 (4H, m, OCCH₂CH₂CO), 4,61 (2H, m, =CH₂), 4,74 (1H, m, H-3). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ 177,61 (COOH), 171,81 (COO), 162,03 (C-17), 100,82 (C-20), 75,09 (C-3), 54,66, 44,35, 42,15, 40,91, 36,04, 35,94, 35,25, 34,91, 32,32, 29,62, 29,44, 29,11, 27,11, 26,71, 26,41, 24,32, 23,48, 20,90, 18,67. IČ spektrum (CHCl): 3516 (COOH, monomer), 3100 (COOH, dimer), 1754 (C=O, COOH, monomer), 1717 (C=O, COOH, dimer). MS (ESI) *m/z*: 411,2 (100 %, M + Na). Pro C₂₄H₃₆O₄ (388,5) vypočteno: 74,19 % C, 9,34 % H; nalezeno: 73,97 % C, 9,38 % H.

Příklad 63: 5-(((3*R*,5*R*,8*R*,9*S*,10*S*,13*S*,14*S*)-10,13-Dimethyl-17-methylenhexadekahydro-1*H*-cyklopenta[*a*]fenantren-3-yl)oxy)-5-oxopentanová kyselina (69)

20 Látka 69 byla připravena dle *Obecného postupu IV – příprava C-3 glutarátu* z látky 66 (200 mg, 0,6 mmol). Chromatografií na sloupci silikagelu (10 % étheru v petroléteru) byla získána pevná bílá látka, která krystalizací ze směsi aceton/voda dala požadovaný hemiester 69 (134 mg, 53 %): t.t. 84 – 86 °C (voskovité krystaly). $[\alpha]_D^{20} +52,3$ (*c* 0,17, CHCl₃). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 0,76 (3H, s, H-18), 0,95 (3H, s, H-19), 2,16 – 2,28 (2H, m, H-16a, H-16b), 2,35 – 2,43 (4H, m, zbytek kyseliny glutarové), 4,58 – 4,65 (2H, m, =CH₂), 4,74 (1H, tt, *J*₁ = 11,3, *J*₂ = 4,7, H-3). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ 178,33 (COOH), 172,38 (COO), 161,87 (C-17), 100,66 (C-20), 74,48 (C-3), 54,49, 44,19, 42,00, 40,75, 35,87, 35,78, 35,11, 34,76, 33,59, 32,90, 32,26, 29,46, 26,95, 26,64, 26,25, 24,16, 23,33, 20,74, 19,94, 18,51. IČ spektrum (CHCl₃): 3517 (OH, COOH, monomer); 3069, 1654 (=CH₂); 2675 (OH, COOH, dimer); 1756 (C=O, COOH, monomer); 1713 (C=O, COOH, dimer); 1722 (C=O, ester). MS (ESI) *m/z*: 425,2 (100 %, M + Na). HR-MS (ESI) *m/z*: Pro C₂₅H₃₈O₄Na (M+Na) vypočteno: 425,2662; nalezeno: 425,2662. Pro C₂₅H₃₈O₄ (402,6) vypočteno: 74,59 % C, 9,51 % H; nalezeno: 74,31 % C, 9,82 % H.

35 Příklad 64: 6-(((3*R*,5*R*,8*R*,9*S*,10*S*,13*S*,14*S*)-10,13-Dimethyl-17-methylenhexadekahydro-1*H*-cyklopenta[*a*]fenantren-3-yl)oxy)-6-oxohexanová kyselina (70)

40 Dicyklohexylkarbodiimid (154 mg, 0,74 mmol) v sušeném benzenu (6 ml) byl přidán k roztoku adipové kyseliny (120 mg, 0,82 mmol) v sušeném tetrahydrofuranu (6 ml) pod inertní atmosférou argonu a směs byla míchána za teploty místnosti 1,5 h. Potom byl během 15 minut přikapán roztok hydroxyderivátu 66 (120 mg, 0,41 mmol) a 4-(*N,N*-dimethylamino)pyridinu (7 mg, 0,05 mmol) v sušeném benzenu (7 ml). Reakční směs byla míchána přes noc za teploty místnosti. Pevné podíly byly odfiltrovány, rozpouštědla odpařena za sníženého tlaku a odparek chromatografován na sloupci silikagelu (10 % acetonu v petroléteru). Byl získán hemiester 70 (80 mg, 46 %): t.t. 100 – 102 °C (aceton/voda). $[\alpha]_D^{20} +42,5$ (*c* 0,22, CHCl₃). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 0,76 (3H, s, H-18), 0,95 (3H, s, H-19), 2,18 – 2,51 (6H, m, H_a-16, H_b-16, zbytek kyseliny adipové), 4,61 (2H, m, =CH₂), 4,73 (1H, m, H-3). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ 178,35 (COOH), 172,98 (COO), 162,06 (C-17), 100,81 (C-20), 74,46 (C-3), 54,65, 44,35, 42,15, 40,90, 36,04, 35,94, 35,28, 34,92, 34,45, 33,60, 32,43, 29,62, 27,12, 26,81, 26,42, 24,56, 24,32, 24,25, 23,50, 20,90, 18,67. IČ spektrum (CHCl₃): 3517 (OH, COOH, monomer); 3069, 1654 (=CH₂); 2675 (OH, COOH, dimer); 1755 (C=O, COOH, monomer); 1712 (C=O, COOH, dimer); 1724 (C=O, ester). MS (ESI) *m/z*: 439,2 (100 %, M + Na), 855,5 (5 %, 2M + Na). HR-MS (ESI) *m/z*: Pro C₂₆H₄₀ONa (M+Na) vypočteno: 439,2818; nalezeno: 439,2817.

55

Příklad 65: Ethyl (*E*)-2-((5*R*,8*R*,9*S*,10*S*,13*S*,14*S*)-10,13-Dimethyl-17-oxohexadekahydro-3*H*-cyklopenta[*a*]fenantren-3-yliden)-acetát a Ethyl (*Z*)-2-((5*R*,8*R*,9*S*,10*S*,13*S*,14*S*)-10,13-dimethyl-17-oxohexadekahydro-3*H*-cyklopenta[*a*]fenantren-3-yliden)-acetát (směs 72)

5

Triethyl 2-fosfonoacetát (20,4 ml, 103 mmol) byl přidán po kapkách k suspenzi hydridu sodného (60% disperze v parafinovém oleji, 3,9 g, 98 mmol) v bezvodém tetrahydrofuranu (100 ml) při 0 °C pod inertní atmosférou argonu. Uvolnil se plynný vodík, heterogenní reakční směs se vyčeřila a byla míchána 30 min. Potom byl přikapán 5*beta*-androstan-3,17-dionu 71 (14,9 g, 51,6 mmol) v bezvodém tetrahydrofuranu (40 ml). Reakční směs byla míchána 2 h při 0 °C pod inertní atmosférou argonu, pak byla nalita do nasyceného roztoku chloridu sodného (200 ml), a produkt extrahován do ethyl-acetátu (3x 150 ml). Spojené organické extrakty byly promyty vodou, sušeny bezvodým síranem sodným a rozpouštědla odpařena za sníženého tlaku. Chromatografie odparku na sloupci silikagelu (15 % ethyl-acetátu v petroléteru) poskytla olejovitou směs *E*- a *Z*-izomerů 72 (1:1, poměr podle NMR spektra, 18,5 g, 99 %): ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 0,85 (6H, s, H-18), 0,95 (6H, s, H-19), 1,23 – 1,27 (6H, m, OCH₂CH₃), 2,30 (1H, t, *J* = 13,7, H-4 α , *Z*-izomer), 2,40 – 2,47 (2H, m, H-16), 2,64 (1H, t, *J* = 13,4, H-4 α , *E*-izomer), 3,47 (1H, ddd, *J*₁ = 14,5, *J*₂ = 3,9, *J*₃ = 1,6, H-4 β , *Z*-izomer), 3,55 – 3,61 (1H, m, H-2 β), 4,08 – 4,15 (4H, m, OCH₂CH₃), 5,58 (1H, m, =CH, *E*-izomer), 5,60 (1H, m, =CH, *Z*-izomer). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ 221,25, 221,16, 167,05, 166,85, 164,25, 164,05, 113,08, 113,05, 59,59, 51,66, 47,99, 45,70, 44,89, 41,15, 41,07, 38,67, 38,29, 38,18, 36,04, 35,63, 35,48, 32,80, 31,90, 30,35, 26,99, 26,84, 25,28, 24,80, 23,37, 23,25, 21,94, 20,52, 20,45, 14,46, 13,95.

15

20

25 Příklad 66: 2-((3*R*,5*R*,8*R*,9*S*,10*S*,13*S*,14*S*)-10,13-Dimethyl-17-oxohexadekahydro-1*H*-cyklopenta[*a*]fenantren-3-yl)octová kyselina (74)

Látka 73 byla připravena dle *Obecného postupu V – katalytická hydrogenace* z látky 72 (18,5 mg, 51,6 mmol). Byla získána olejovitá směs 3*alfa*/3*beta*-izomerů 73 (18,5 g, 99 %), které se nepodařilo krystalizací ani částečně oddělit, proto byla surová směs užita pro další reakční stupeň.

30

Roztok hydroxidu draselného (1,8 g, 33 mmol) ve vodě (5 ml) a ethanolu (40 ml) byl přidán ke směsi 73 (2 g, 5,54 mmol). Reakční směs byla zahřívána na 85 °C 1 h. Průběh reakce byl sledován tenkovrstvou chromatografií. Po vymizení výchozí látky byla reakční směs nalita na směs drceného ledu a vody, kyselina zředěnou kyselinou chlorovodíkovou (HCl/H₂O, 1:2) na pH 1. Produkt byl extrahován do chloroformu (3x 50 ml), spojené organické extrakty byly promyty vodou, sušeny bezvodým síranem sodným a rozpouštědla odpařena za sníženého tlaku. Surový produkt (1,88 g) opakovanou krystalizací z ethanolu poskytl čistý 3 α -izomer 74 (133 mg, 7 %): t.t. 130 – 133 °C (ethanol). [α]_D²⁰ +96,5 (*c* 0,25, CHCl₃). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 0,84 (3H, s, H-18), 0,95 (3H, s, H-19), 2,25 (2H, dd, *J*₁ = 7,1 *J*₂ = 3,0, CH₂COOH), 2,44 (1H, m, H-16). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ 221,59 (C-17), 177,85 (COOH), 51,69, 48,04, 43,33, 41,74, 41,05, 37,12, 36,10, 35,61, (2 x C), 35,22, 33,62, 31,92, 27,71, 27,14, 25,55, 23,95, 21,98, 20,26, 13,96. IČ spektrum (CHCl₃): 3518 (COOH, monomer); 3091 (COOH, dimer); 1731 (C=O, COOH, monomer); 1706 (C=O, COOH, dimer); 1706 (C=O). MS (ESI) *m/z*: 355,3 (100 %, M + Na), 687,6 (20 %, 2M + Na). Pro C₂₁H₃₂O₃ (332,3) vypočteno: 75,86 % C, 9,70 % H; nalezeno: 75,89 % C, 9,57 % H.

35

40

45

50 Příklad 67: 7-(((3*R*,5*R*,8*R*,9*S*,10*S*,13*S*,14*S*)-10,13-Dimethyl-17-methylenhexadekahydro-1*H*-cyklopenta[*a*]fenantren-3-yl)oxy)-7-oxoheptanová kyselina (75)

Látka 75 byla připravena dle *Obecného postupu VII – Wittigova reakce za použití *n*-butyl lithia* z látky 74 (130 mg, 0,39 mmol). Chromatografií na sloupci silikagelu (10 % ethyl-acetátu v pet-

rolétheru) byl regenerován výchozí karbonyl (55 mg) a získán methylen derivát 75 (50 mg, 38 %): t.t. 155 – 159 °C (aceton). $[\alpha]_D^{20} +30,4$ (*c* 0,15, CHCl₃). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 0,76 (3H, s, H-18), 0,95 (3H, s, H-19), 2,17 – 2,25 (3H, m, H-16a, CH₂COOH), 2,47 (1H, m, H-16b), 4,61 (2H, d, *J* = 6,8, =CH₂). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ 178,11 (COOH), 162,22 (C-17), 100,74 (C-20), 54,72, 44,37, 43,46, 41,83, 41,03, 37,20, 36,09, 35,99, 35,68, 35,19, 33,70, 29,64, 27,76, 27,37, 26,53, 24,33, 24,05, 20,89, 18,69. IČ spektrum (CHCl₃): 3518 (COOH, monomer); 3090 (COOH, dimer); 1733 (C=O, COOH, monomer); 1706 (C=O, COOH, dimer); 3069, 1653 (=CH₂). MS (ESI) *m/z*: 329,2 (100 %, M – H), 659,5 (20 %, 2M – H). Pro C₂₂H₃₄O₂ (330,5) vypočteno: 79,95 % C, 10,37 % H; nalezeno: 79,66 % C, 10,41 % H.

Příklad 68: 2-(((3*R*,5*R*,8*R*,9*S*,10*S*,13*S*,14*S*)-10,13-Dimethyl-17-methylenhexadekahydro-1H-cyklopenta[*a*]fenantren-3-yl)oxy)-*N,N,N*-trimethyl-2-oxoethan-1-ammonium chlorid (76)

K roztoku betainu (trimethyl glycinu, 255 mg, 1,6 mmol) sušeného přes noc při 50 °C v sušeném dichlormethanu, byl přidán chlorid kyseliny šřavelové (2,06 ml, 24 mmol) a *N,N'*-dimethylformamid (4 kapky). Reakční směs byla míchána za teploty místnosti přes noc. Potom byla rozpouštědla odpařena za sníženého tlaku a k odparku byl přidán sušený nitromethan (6 ml), sušený pyridin (0,3 ml) a hydroxyderivát 66 (160 mg, 0,55 mmol). Reakční směs byla míchána za teploty místnosti přes noc, ráno byla nalita do vody a okyselena zředěnou kyselinou chlorovodíkovou (5%) na pH 4. Produkt byl extrahován do benzenu. Benzenový extrakt byl sušen bezvodým síranem hořečnatým a rozpouštědlo odpařeno za sníženého tlaku. Dvojnásobnou krystalizací (chloroform/*n*-heptan) byla získána kvartérní amoniová sůl 76 (136 mg, 57 %): t.t. 175 – 177 °C. $[\alpha]_D^{20} +43,3$ (*c* 0,24, CHCl₃). ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD): δ 0,76 (3H, s, H-18), 0,95 (3H, s, H-19), 3,65 (9H, br s, N(CH₃)₃), 4,62 (2H, d, *J*₁ = 7,3, =CH₂), 4,80 (1H, tt, *J*₁ = 11,1, *J*₂ = 4,6, H-3), 4,88 (1H, s, H-2'). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ 164,39, 161,84, 102,93, 100,91, 78,00, 63,48, 54,41, 44,31, 42,18, 40,86, 35,90, 35,10, 34,87, 32,16, 29,60, 27,03, 26,57, 26,30, 24,30, 23,39, 20,90, 18,68. IČ spektrum (CHCl₃): 3070, 1654, 1416 (C=CH₂); 2960 (N(CH₃)₃); 1743 (C=O); 1258 (C–O). MS (ESI) *m/z*: 388,3 (100 %, M – Cl), 389,3 (30%, M – Cl + 1). HR-MS (ESI) *m/z*: Pro C₂₅H₄₂NO₂ (M–Cl) vypočteno: 388,3210, nalezeno: 388,3209.

Příklad 69: (3*R*,5*R*,8*S*,9*S*,10*S*,13*S*,14*S*,17*S*)-10,13,17-Trimethylhexadekahydro-1H-cyklopenta[*a*]fenantren-3-ol (77)

Látka 77 byla připravena dle *Obecného postupu V – katalytická hydrogenace* z látky 66 (100 mg, 0,34 mmol). Krystalizací ze směsi aceton/*n*-heptan byl získán methyl derivát 77 (75 mg, 75 %): t.t. 151 – 153 °C (aceton/*n*-heptan). $[\alpha]_D^{20} +18,1$ (*c* 0,21, CHCl₃). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 0,52 (3H, s, H-18), 0,82 (3H, d, *J* = 6,8, 17-Me), 0,92 (3H, s, H-19), 3,62 (1H, m, H-3). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ 72,06 (C-3), 56,04, 45,31, 42,41, 42,34, 41,05, 37,91, 36,70, 36,28, 35,66, 34,90, 30,75, 30,43, 27,40, 26,81, 24,92, 23,58, 20,76, 13,97, 12,17. IČ spektrum (CHCl₃): 3610, 1034 (OH); 1379 (methyl). MS (ESI) *m/z*: 313,2 (100%, M + Na). Pro C₂₀H₃₄O (290,5) vypočteno: 82,69 % C, 11,80 % H; nalezeno: 82,62 % C, 11,37 % H.

Příklad 70: 3-Oxo-3-(((3*R*,5*R*,8*S*,9*S*,10*S*,13*R*,14*S*,17*S*)-10,13,17-trimethylhexadekahydro-1H-cyklopenta[*a*]fenantren-3-yl)oxy)propanová kyselina (78)

Látka 78 byla připravena dle *Obecného postupu III – příprava C-3 malonátu* z látky 77 (151 mg, 0,52 mmol). Chromatografií na sloupci silikagelu (10 – 20 % ethyl-acetátu v petrolétheru) byl získán derivát 78 (162 mg, 82 %): t.t. 158 – 161,2 °C (aceton/*n*-heptan). $[\alpha]_D^{20} +36,9$ (*c* 0,31, CHCl₃). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 0,53 (3H, s, H-18), 0,82 (3H, d, *J* = 6,8, 17-methyl), 0,95 (3H, s, H-19), 3,36 – 3,47 (2H, m, OCCH₂CO), 4,79 – 4,89 (1H, m, H-3). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ 168,80 (COOH), 168,08 (COO), 77,05 (C-3), 55,96, 45,32, 42,34, 42,19,

41,04, 40,15, 37,84, 36,20, 35,19, 34,18, 32,18, 30,40, 27,16, 26,67, 26,59, 24,88, 23,49, 20,77, 13,98, 12,18. IČ spektrum (CHCl₃): 3511 (OH, COOH, monomer); 1760 (C=O, COOH, monomer); 1720 (C=O, COOH, dimer); 1386 (methyl). MS (ESI) *m/z*: 399,4 (100 %, M + Na). HR-MS (ESI) *m/z*: Pro C₂₃H₃₆O₄Na (M+Na) vypočteno: 399,2506; nalezeno: 399,2506.

5

Příklad 71: 4-Oxo-4-(((3*R*,5*R*,8*S*,9*S*,10*S*,13*R*,14*S*,17*S*)-10,13,17-trimethylhexadecahydro-1H-cyklopenta[*a*]fenantren-3-yl)oxy)butanová kyselina (79)

10 Látka 79 byla připravena dle *Obecného postupu II – příprava C-3 hemisukcinátu* z látky 77 (200 mg, 0,69 mmol). Chromatografií na sloupci silikagelu (10 – 20 % ethyl-acetátu v petroléteru) byl získán hemiester 79 (123 mg, 89 %): t.t. 141 – 142 °C (aceton/*n*-heptan). [α]_D²⁰ +34,4 (*c* 0,27, CHCl₃). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 0,51 (3H, s, H-18), 0,81 (3H, d, *J* = 6,8, 17-methyl), 0,92 (3H, s, H-19), 2,55 – 2,66 (4H, m, OCCH₂CH₂CO), 4,73 (1H, m, H-3). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ 175,34 (COOH), 172,03 (COO), 74,98 (C-3), 55,94, 45,29, 42,31, 42,17, 40,97, 37,83, 36,18, 35,29, 34,89, 32,36, 30,38, 29,65, 29,13, 27,19, 26,73, 26,68, 24,87, 23,51, 20,73, 13,97, 12,15. IČ spektrum (CHCl₃): 3515 (OH, COOH, monomer); 3086 (OH, COOH, dimer), 1755 (C=O, COOH, monomer), 1725 (C=O), 1717 (C=O, COOH, dimer), 1381 (methyl). MS (ESI) *m/z*: 389,3 (100 %, M – H). Pro C₂₄H₃₈O₄ (390,5) vypočteno: 73,81 % C, 9,81 % H; nalezeno: 73,76 % C, 9,68 % H.

15

20

Příklad 72: 5-Oxo-5-(((3*R*,5*R*,8*S*,9*S*,10*S*,13*R*,14*S*,17*S*)-10,13,17-trimethylhexadecahydro-1H-cyklopenta[*a*]fenantren-3-yl)oxy)pentanová kyselina (80)

25

Látka 80 byla připravena dle *Obecného postupu IV – příprava C-3 glutarátu* z látky 77 (200 mg, 0,69 mmol). Chromatografií na sloupci silikagelu (20 – 30 % ethyl-acetátu v petroléteru) byl získán derivát 80 (135 mg, 96 %): t.t. 151 – 152 °C (aceton/*n*-heptan). [α]_D²⁰ +31,9 (*c* 0,27, CHCl₃). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 0,52 (3H, s, H-18), 0,82 (3H, d, *J* = 6,8, 17-methyl), 0,93 (3H, s, H-19), 1,96 (2H, p, *J* = 7,3, H-3'), 2,37 (2H, t, *J* = 7,3, H-2'), 2,43 (2H, t, *J* = 7,3 H-4'), 4,74 (1H, m, H-3). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ 177,67 (COOH), 172,52 (COO), 74,74 (C-3), 55,98, 45,32, 42,34, 42,20, 41,01, 37,86, 36,21, 35,32, 34,92, 33,77, 32,92, 32,47, 30,41, 27,21, 26,83, 26,70, 24,90, 23,54, 20,76, 20,12, 13,99, 12,18. IČ spektrum (CHCl₃): 3516 (OH, COOH, monomer); 3089 (OH, COOH, dimer); 1755 (C=O, COOH, monomer); 1723 (C=O); 1713 (C=O, COOH, dimer); 1380 (methyl). MS (ESI) *m/z*: 403,3 (100 %, M – H). Pro C₂₅H₄₀O₄ (404,5) vypočteno: 74,22 % C, 9,97 % H; nalezeno: 74,08 % C, 9,81 % H.

30

35

Příklad 73: (4*S*-4-Amino-5-oxo-5-(((3*R*,5*R*,8*S*,9*S*,10*S*,13*R*,14*S*,17*S*)-10,13,17-trimethylhexadecahydro-1H-cyklopenta[*a*]fenantren-3-yl)oxy)pentanová kyselina (81)

40

K míchané směsi alkoholu 44 (500 mg, 1,72 mmol) a Boc-Glu(OBzl)-OH (640 mg, 1,90 mmol) v čerstvě usušeném benzenu (35 ml) byly přidány 4-(*N,N*-dimethylamino)pyridin (21 mg, 0,172 mmol) a dicyklohexylkarbodiimid (1M roztok v benzenu, 2,5 ml) pod inertní atmosférou argonu za teploty místnosti. Po 18 h byla reakční směs nalita do nasyceného roztoku hydrogenuhlíčitanu sodného (40 ml), produkt byl extrahován do ethyl-acetátu (3x 30 ml), spojené organické fáze byly promyty vodou (2x 10 ml). Vysrážená *N,N'*-dicyklohexylmočovina byla odfiltrována, filtrát byl sušen bezvodým síranem sodným a rozpouštědla odpařena za sníženého tlaku. Další porce *N,N'*-dicyklohexylmočoviny byla odkrystalována a odfiltrována v etheru. Filtrát obsahující požadovaný produkt byl odpařen za sníženého tlaku. Chromatografie odparku na sloupci silikagelu (10 % ethyl-acetátu v petroléteru) poskytla pevnou bílou pěnu chráněného glutamátu (960 mg, 91 %). Produkt byl charakterizován NMR spektry a surový použit pro další stupeň. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 0,53 (3H, s, H-18), 0,83 (3H, d, *J* = 6,8, H-20), 0,94 (3H, s, H-19), 1,43 (9H, s, t-Bu), 2,26 – 2,43 (2H, m, H-4'), 4,32 – 4,41 (1H, m, CH-2'), 4,72 (1H, tt, *J*₁ =

45

50

11,3, $J_2 = 4,7$, H-3), 5,17 (2H, d, $J = 5,1$, CH₂-benzyl), 7,34 – 7,38 (5H, m, fenyl). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ 172,41 (C-1'), 172,37 (C-5'), 155,50 (OCONH), 135,48 (C-1', fenyl), 128,74 (C-3', C-5', fenyl), 128,54 (C-4', fenyl), 128,35 (C-2', C-6', fenyl), 80,15 (*t*-Bu), 74,93 (C-3), 67,32, 55,99, 53,30, 45,32, 42,34, 42,19, 41,01, 37,86, 36,21, 35,30, 34,90, 32,38, 30,91, 30,41, 28,46 (3 x C, *t*-Bu), 27,87, 27,20, 26,78, 26,69, 24,88, 23,53, 20,76, 13,98, 12,17.

K roztoku chráněného esteru kyseliny glutamové (950 mg, 1,56 mmol) v absolutním methanolu (55 ml) byl přidán paladiový katalyzátor na aktivním uhlí (10%, 50 mg). Reakční směs byla míchána za teploty místnosti za energického míchání pod mírným přetlakem vodíku 2 h, během kterých byla reakce dokončena. Poté byl katalyzátor odfiltrován a rozpouštědla odpařena za sníženého tlaku. Odparek byl rozpuštěn v dichlormethanu (8 ml) a za míchání byla po kapkách přidána koncentrovaná kyselina chlorovodíková (5 ml). Reakční směs byla míchána za teploty místnosti 30 min a poté za sníženého tlaku odpařena dosucha. K odparku byla přidána směs methanolu (10 ml) a pyridinu (1 ml) a vzniklý roztok přikapán za míchání do vody (60 ml). Celá směs stála přes noc při teplotě 5 °C. Pevné podíly byly odděleny filtrací, promyty vodou a sušením na vzduchu byl získán poloester 81 (541 mg, 67 %, dva stupně): t.t. 169 – 171 °C (methanol). $[\alpha]_D^{20} +52,5$ (*c* 0,099, CHCl₃/MeOH, 1,7:0,8). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃/CD₃OD, 6:1): δ 0,48 (3H, s, H-18), 0,78 (3H, d, $J = 6,7$, H-20), 0,90 (3H, s, H-19), 2,42 – 2,55 (2H, m, H-4'), 3,52 – 3,61 (1H, m, CH-2'), 4,60 – 4,72 (1H, m, H-3). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃/CD₃OD, 6:1): δ 173,36 (COOH, COO), 75,22 (C-3), 55,86, 55,83, 45,23, 42,25, 42,17, 40,95, 37,76, 36,14, 35,25, 34,83, 32,31, 31,16, 30,32, 29,76, 27,19, 26,65, 26,57, 24,81, 23,47, 20,70, 13,86, 12,05. IR (KBr): 2717, 1540, 1491 (NH₃⁺); 1745, 1718 (C=O, glutamyl ester); 1732 (CO); 1635 (COO⁻); 1022 (COC). MS (ESI) *m/z*: 442,3 (100 %, M + Na), 420,4 (45 %, M + H). HR-MS (ESI) *m/z*: Pro C₂₅H₄₂O₄N (M+H) vypočteno: 420,3108; nalezeno: 420,3108.

Příklad 74: 3-(((3*R*,5*R*,8*R*,9*S*,10*S*,13*S*,14*S*,*Z*)-17-Ethyliden-10,13-dimethylhexadekahydro-1H-cyklopenta[*a*]fenantren-3-ol (82)

Hydroxyderivát 82 byl připraven podle literatury (Chem. Pharm. Bull., 31, 3819–3828, (1983)).

Příklad 75: 3-(((3*R*,5*R*,8*R*,9*S*,10*S*,13*S*,14*S*,*Z*)-17-Ethyliden-10,13-dimethylhexadekahydro-1H-cyklopenta[*a*]fenantren-3-yl)oxy)-3-oxopropanová kyselina (83)

Látka 83 byla připravena dle *Obecného postupu III – příprava C-3 malonátu* z látky 82 (200 mg, 0,69 mmol). Chromatografií na sloupci silikagelu (1 – 10 % acetonu v petroléteru) byl získán derivát 83 (239 mg, 92 %): t.t. 126 – 128 °C (aceton/petroléter). $[\alpha]_D^{20} +24,0$ (*c* 0,55, CHCl₃). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 0,86 (3H, s, H-18), 0,95 (3H, s, H-19), 1,64 (3H, dt, $J_1 = 7,1$, $J_2 = 2,0$, H-21), 3,41 (1H, s, H-2'), 4,84 (1H, m, H-3), 5,12 (1H, qt, $J_1 = 7,2$, $J_2 = 2,1$, H-20). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ 179,31 (COOH), 171,59 (COO), 150,42 (C-17), 113,45 (C-20), 76,94 (C-3), 56,42, 44,59, 41,87, 40,60, 37,50, 35,49, 35,05, 34,80, 32,13, 31,64, 29,03, 27,09, 26,58, 26,33, 24,54, 23,39, 21,19, 17,03, 13,25. IČ spektrum (CHCl₃): 3516 (COOH, monomer); 3114 (COOH, dimer); 1751 (C=O, COOH, monomer); 1726 (C=O); 1717 (C=O, COOH, dimer). MS (ESI) *m/z*: 425,3 (100 %, M + Na). Pro C₂₅H₃₈O₄ (402,5) vypočteno: 74,59 % C, 9,51 % H; nalezeno: 74,68 % C, 9,42 % H.

Příklad 76: 4-(((3*R*,5*R*,8*R*,9*S*,10*S*,13*S*,14*S*,*Z*)-17-Ethylidene-10,13-dimethylhexadekahydro-1H-cyklopenta[*a*]fenantren-3-yl)oxy)-4-oxobutanová kyselina (84)

Látka 84 byla připravena dle *Obecného postupu II – příprava C-3 hemisukcinátu* z látky 82 (200 mg, 0,66 mmol). Chromatografií na sloupci silikagelu (3 – 20 % acetonu v petroléteru) byl získán hemiester 84 (250 mg, 94 %): t.t. 152 – 154 °C (aceton/petroléter). $[\alpha]_D^{20} +58,1$ (*c* 0,21,

CHCl₃). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 0,85 (3H, s, H-18), 0,93 (3H, s, H-19), 1,65 (3H, dt, *J*₁ = 7,1 *J*₂ = 1,9, H-21), 2,57 – 2,69 (4H, m, OCCH₂CH₂CO), 4,75 (1H, m, H-3), 5,11 (1H, qt, *J*₁ = 7,2, *J*₂ = 2,0, H-20). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ 177,07 (COOH), 171,83 (COO), 150,50 (C-17), 113,40 (C-20), 75,13 (C-3), 56,45, 44,59, 42,07, 40,70, 37,54, 35,52, 35,16, 34,82, 32,32, 31,66, 29,46, 29,03, 27,14, 26,74, 26,36, 24,56, 23,44, 21,19, 17,03, 13,25. IČ spektrum (CHCl₃): 3516 (COOH, monomer); 3114 (COOH, dimer); 1751 (C=O, COOH, monomer); 1726 (C=O); 1717 (C=O, COOH, dimer). MS (ESI) *m/z*: 425,3 (100 %, M + Na). Pro C₂₅H₃₈O₄ (402,5) vypočteno: 74,59 % C, 9,51 % H; nalezeno: 74,68 % C, 9,42 % H.

Příklad 77: 5-(((3*R*,5*R*,8*R*,9*S*,10*S*,13*S*,14*S*,*Z*)-17-Ethyliden-10,13-dimethylhexadekahydro-1H-cyklopenta[*a*]fenantren-3-yl)oxy)-5-oxopentanová kyselina (85)

Látka 85 byla připravena dle *Obecného postupu IV – příprava C-3 glutarátu* z látky 82 (150 mg, 0,49 mmol). Chromatografií na sloupci silikagelu (5 – 20% acetonu v petroléteru) byl získán derivát 85 (178 mg, 86 %): t.t. 100 – 103 °C (aceton). [α]²⁰_D +57,3 (*c* 0,39, CHCl₃). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 0,85 (3H, s, H-18), 0,93 (3H, s, H-19), 1,64 (3H, dt, *J*₁ = 7,1 *J*₂ = 1,9, H-21), 2,34 – 2,44 (4H, m, hemiglutarát), 4,74 (1H, m, H-3), 5,11 (1H, qt, *J*₁ = 7,0, *J*₂ = 1,9, H-20). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ 178,19 (COOH), 172,55 (COO), 150,50 (C-17), 113,39 (C-20), 74,67 (C-3), 56,44, 44,59, 42,08, 40,69, 37,53, 35,51, 35,17, 34,82, 33,77, 33,04, 32,41, 31,66, 27,14, 26,82, 26,36, 24,55, 23,44, 21,19, 20,12, 17,03, 13,25. IČ spektrum (CHCl₃): 3517 (COOH, monomer); 3116 (COOH, dimer); 1747 (C=O, COOH, monomer); 1722 (C=O); 1713 (C=O, COOH, dimer). MS (ESI) *m/z*: 439,2 (100 %, M + Na), 855,5 (5 %, 2M + Na). Pro C₂₆H₄₀O₄ (416,6) vypočteno: 74,96 % C, 9,68 % H; nalezeno: 74,77 % C, 9,72 % H.

Příklad 78: (3*R*,5*R*,8*R*,9*S*,10*S*,13*S*,14*S*,17*R*)-10,13-Dimethyl-17-(prop-1-en-2-yl)hexadekahydro-1H-cyklopenta[*a*]fenantren-3-ol (87)

Látka 87 byla připravena dle *Obecného postupu VII – Wittigova reakce za použití *n*-butyl lithia* z látky 86 (1 g, 3,13 mmol). Chromatografií na sloupci silikagelu (10 % ethyl-acetátu v petroléteru) byl získán derivát 87 (760 mg, 76 %): t.t. 149 – 151 °C (aceton/*n*-heptan). [α]²⁰_D +16,6 (*c* 0,39, CHCl₃). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 0,54 (3H, s, H-18), 0,91 (3H, s, H-19), 1,75 (3H, s, H-21), 2,02 (1H, t, *J* = 9,1, H-17), 3,62 (1H, m, H-3), 4,69 (1H, s, H-22a), 4,83 (1H, s, H-22b). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ 145,86 (C-20), 110,78 (=CH₂), 71,99 (C-3), 57,57 (C-17), 56,49 (C-14), 43,58, 42,31, 40,83, 39,25, 36,65, 36,39, 35,56, 34,80, 30,72, 27,34, 26,57, 25,67, 24,78, 24,36, 23,54, 21,04, 13,00. IR (CHCl₃): 3609, 3447, 1033 (OH); 3085, 1639 (=CH₂); 1376 (methyl). MS (ESI) *m/z*: 339,2 (100 %, M + Na). Pro C₂₂H₃₆O (316,5) vypočteno: 83,48 % C, 11,46 % H; nalezeno: 83,49 % C, 11,55 % H.

Příklad 79: 3-(((3*R*,5*R*,8*R*,9*S*,10*S*,13*S*,14*S*,17*R*)-10,13-Dimethyl-17-(prop-1-en)-2-yl)hexadekahydro-1H-cyklopenta[*a*]fenantren-3-yl)oxy)-3-oxopropanová kyselina (88)

Látka 88 byla připravena dle *Obecného postupu III – příprava C-3 malonátu* z látky 87 (200 mg, 0,69 mmol). Chromatografií na sloupci silikagelu (1 – 10 % acetonu v petroléteru) byl získán derivát 88 (158 mg, 81 %): t.t. 147,7 – 148,3 °C (aceton/*n*-heptan). [α]²⁰_D +37,9 (*c* 0,23, CHCl₃). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 0,55 (3H, s, H-18), 0,94 (3H, s, H-19), 1,75 (3H, s, H-21), 2,03 (1H, t, *J* = 9,2, H-17), 3,36 – 3,47 (2H, m, OCCH₂CO), 4,70 (1H, s, =CH₂), 4,79 – 4,91 (2H, m, H-3, =CH₂). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ 168,86 (COOH), 168,03 (COO), 145,84 (C-20), 110,88 (=CH₂), 76,98 (C-3), 57,57 (C-17), 56,44 (C-14), 43,59, 42,11, 40,83, 40,20, 39,18, 36,32, 35,11, 34,81, 32,15, 27,11, 26,58, 26,44, 25,65, 24,80, 24,33, 23,46, 21,06, 13,02. IČ spektrum (CHCl₃): 3599 (OH, COOH, monomer), 3128 (OH, COOH, dimer); 1761 (C=O, COOH, monomer); 1718 (C=O, COOH, dimer), 1638 (=CH₂). MS (ESI) *m/z*: 425,3 (100 %, M +

Na). HR-MS (ESI) m/z : Pro $C_{25}H_{38}O_4Na$ (M+Na): vypočteno: 425,2662 %; nalezeno: 420,2700.
Pro $C_{25}H_{38}O_4$ (402,3) vypočteno: 74,59 % C, 9,51 % H; nalezeno: 74,32 % C, 9,43 % H.

5 Příklad 80: 4-(((3*R*,5*R*,8*R*,9*S*,10*S*,13*S*,14*S*,17*R*)-10,13-Dimethyl-17-(prop-1-en)-2-yl)hexadecahydro-1*H*-cyklopenta[*a*]fenantren-3-yl)oxy)-4-oxobutanová kyselina (89)

Látka 89 byla připravena dle *Obecného postupu III – příprava C-3 hemisukcinátu* z látky 87 (200 mg, 0,66 mmol). Chromatografií na sloupci silikagelu (20 – 30 % ethyl-acetátu v petrol-
10 étheru) byl získán derivát 89 (323 mg, 96 %): t.t. 148 – 149,5 °C (aceton/*n*-heptan). $[\alpha]_D^{20} +42,5$ (*c* 0,30, $CHCl_3$). 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 0,54 (3H, s, H-18), 0,93 (3H, s, H-19), 1,75 (3H, s, H-21), 2,03 (1H, t, $J = 9,2$ H-17), 2,54 – 2,73 (4H, m, $OCCH_2CH_2CO$), 4,67 – 4,79 (2H, m, H-3, =CH₂), 4,84 (1H, s, =CH₂). ^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$): δ 177,32 (COOH), 171,80 (COO), 145,84 (C-20), 110,83 (=CH₂), 75,15 (C-3), 57,58 (C-17), 56,46 (C-14), 43,60, 42,11,
15 40,81, 39,20, 36,33, 35,21, 34,82, 32,34, 29,44, 29,06, 27,15, 26,73, 26,47, 25,66, 24,81, 24,35, 23,50, 21,05, 13,01. IČ spektrum ($CHCl_3$): 3518 (OH, COOH, monomer), 3100 (OH, COOH, dimer); 1755 (C=O, COOH, monomer); 1718 (C=O, COOH, dimer), 1640 (=CH₂). MS (ESI) m/z : 415,2 (100 %, M – H). Pro $C_{26}H_{40}O_4$ (416,6) vypočteno: 74,96 % C, 9,68 % H; nalezeno: 74,94 % C, 9,65 % H.

20

Příklad 81: 2-((3*R*,5*R*,8*R*,9*S*,10*S*,13*S*,14*S*,17*R*)-10,13-Dimethyl-17-(prop-1-en-2-yl)hexadecahydro-1*H*-cyklopenta[*a*]fenantren-3-yl)octová kyselina (91)

Látka 91 byla připravena dle *Obecného postupu VII – Wittigova reakce za použití *n*-butyl lithia* z látky 90 (202 mg, 0,56 mmol). Chromatografií na sloupci silikagelu (20 % etheru v petrol-
25 étheru) byl získán derivát 91 (80 mg, 40 %): t.t. 198 – 200 °C (aceton/*n*-heptan). $[\alpha]_D^{20} +27,3$ (*c* 0,17, $CHCl_3$). 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 0,55 (3H, s, H-18), 0,93 (3H, s, H-19), 2,26 (2H, d, $J = 7,9$ H-2, kyselina octová), 4,70 (1H, s, H_{trans} , =CH₂), 4,84 (1H, s, H_{cis} , =CH₂). ^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$): δ 178,08 (COOH), 145,80 (C-20), 110,60 (C-21), 57,44, 56,37, 43,46,
30 43,25, 41,71, 40,78, 39,11, 36,00, 36,24, 35,54, 34,95, 33,55, 27,62, 27,26, 26,44, 25,52, 24,66, 24,21, 23,92, 20,89, 12,87. IČ spektrum ($CHCl_3$): 3516 (OH, COOH, monomer), 3085 (=CH₂); 2684 (OH, COOH, dimer); 1753 (C=O, COOH, monomer); 1706 (COOH, dimer). MS (ESI) m/z : 481,2 (100 %, M + Na). Pro $C_{24}H_{38}O_2$ (358,6) vypočteno: 80,39 % C, 10,68 % H; nalezeno: 80,44 % C, 10,79 % H.

35

Příklad 82: Pyridinium (3*R*,5*R*,8*R*,9*S*,10*S*,13*S*,14*S*,17*S*)-17-jodo-10,13-dimethylhexadecahydro-1*H*-cyklopenta[*a*]fenantren-3-yl-sulfát (93)

40

Látka 93 byla připravena dle *Obecného postupu I – příprava C-3 sulfátu* z látky 92 (255 mg, 0,63 mmol). Byl získán sulfát 93 (298 mg, 72 %): t.t. 118 – 120 °C. $[\alpha]_D^{20} +58,5$ (*c* 0,39, $CHCl_3/MeOH$, 1,94:0,20). 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 0,79 (3H, s, H-18), 0,92 (3H, s, H-19), 3,76 (1H, t, J , 9,4, H-17 α), 4,39 (1H, tt, $J_1 = 11,0$, $J_2 = 5,0$, H-3), 7,32 (2H, ddd, $J_1 = 7,6$, $J_2 = 4,3$, $J_3 = 1,5$, H-2' a H-4', pyridinium) 7,72 (1H, tt, $J_1 = 7,7$, $J_2 = 1,8$, H-3', pyridinium), 8,64 (2H, dt, $J_1 = 4,6$, $J_2 = 1,7$, H-1' a H-5', pyridinium). ^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$): δ 149,64 (C-1' a C-5', pyridinium), 136,45 (C-3', pyridinium), 128,63 (C-2' a C-4', pyridinium), 78,88, 50,15, 46,46, 44,29, 42,33, 42,12, 40,61, 37,22, 35,55, 34,73, 34,43, 33,45, 27,92, 27,04, 26,47, 25,56, 23,19, 20,58, 17,03. IČ spektrum ($CHCl_3$): 3434, 3608 (OH); 1385 (CH₃); 1027, 1034 (C-O). MS (ESI) m/z : 381,2 (100%, M – H – pyridin). HR-MS (ESI) m/z : Pro $C_{19}H_{30}O_4IS$ vypočteno: 481,0904; nalezeno: 481,0908.

50

Příklad 83: Pyridinium (3*R*,5*R*,8*R*,9*S*,10*S*,13*S*,14*S*)-17,17-difluor-10,13-dimethylhexadekahydro-1*H*-cyklopenta[*a*]fenantren-3-yl-sulfát (95)

Látka 95 byla připravena dle *Obecného postupu I – příprava C-3 sulfátu* z látky 94 (86 mg, 0,28 mmol). Byl získán produkt 95 (96 mg, 73 %): t.t. 185 – 187 °C. $[\alpha]_D^{20} +12,5$ (*c* 0,28, CHCl₃/MeOH, 1,97:0,04). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 0,84 (3H, s, H-19), 0,92 (3H, s, H-19), 4,46 (1H, tt, *J*₁ = 10,8 *J*₂ = 5,1, H-3), 8,09 – 7,99 (2H, m, H-2' a H-4', pyridinium), 8,44 – 8,51 (1H, m, H-3', pyridinium), 7,96 – 8,02 (2H, m, H-1' a H-5', pyridinium). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃ a MeOH): δ 145,84 (C-1' a C-5', pyridinium), 142,42 (C-3', pyridinium), 127,27 (C-2' a C-4', pyridinium), 79,51, 58,64, 49,62, 42,23, 40,48, 35,72, 35,45, 34,70, 33,44, 33,09, 29,23, 27,87, 26,89, 25,69, 23,34, 22,44, 20,06, 18,56, 13,46. IČ spektrum (CHCl₃): 1350, 1121 (CF₂); 1247, 1168, 973, 947 (OSO₃). MS (ESI) *m/z*: 391,2 (100%, M – 1 – pyridin). HR-MS (ESI) *m/z*: Pro C₁₉H₂₉F₂S vypočteno: 391,1760; nalezeno: 391,1757.

Příklad 84: (3*R*,5*R*,8*R*,9*S*,10*S*,13*S*,14*S*,17*S*)-10,13-Dimethylhexadekahydrospiro[cyklopenta[*a*]fenantren-17,2'-oxiran]-3-ol (96)

Tert-butoxid draselný (267 mg, 2,38 mmol) a trimethylsulfonium jodid (486 mg, 2,38 mmol) byly najednou přidány k roztoku 5*beta*-androstán-3*alfa*-olu (47,346 mg, 1,19 mmol) v sušeném *N,N'*-dimethylformamidu (6 ml) pod inertní atmosférou. Reakční směs byla míchána za teploty místnosti přes noc. Potom byl přidán nasycený vodný roztok chloridu sodného a produkt byl extrahován chloroformem (3x 30 ml). Spojené organické extrakty byly sušeny bezvodým síranem sodným a rozpouštědla odpařena za sníženého tlaku. Odparek chromatografií na sloupci silikage-lu (0 – 15 % ethyl-acetátu v petroléteru) poskytl 96 (284 mg, 78 %): t.t. 149 – 150 °C (ether/petroléter). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 0,85 (3H, s, H-18), 0,92 (3H, s, H-19), 2,60 (1H, d, *J* = 5,1, H-20a), 2,89 (1H, d, *J* = 5,1, H-20b), 3,63 (1H, m, H-3). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ 71,84 (C-3), 70,71 (C-17), 53,72 (C-20), 53,05 (C-14), 42,23, 40,79, 40,38, 36,55, 36,15, 35,53, 34,84, 34,32, 30,66, 29,28, 27,18, 26,08, 23,70, 23,45, 20,34, 14,48. HR-MS (ESI) *m/z*: Pro C₂₀H₃₂O₂Na (M+Na) vypočteno: 327,2294; nalezeno: 327,2293.

Příklad 85: Pyridinium (3*R*,5*R*,8*R*,9*S*,10*S*,13*S*,14*S*,17*S*)-10,13-dimethylhexadekahydrospiro[cyklopenta[*a*]fenantren-17,2'-oxiran]-3-yl-sulfát (97)

Látka 97 byla připravena dle *Obecného postupu I – příprava C-3 sulfátu* z látky 96 (50 mg, 0,16 mmol). Byl získán sulfát 97 (36 mg, 47 %) ve formě pěny: $[\alpha]_D^{20} +8,5$ (*c* 0,14, CHCl₃). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 0,83 (3H, s, H-18), 0,91 (3H, s, H-19), 2,64 (1H, d, *J* = 9,3, H-20a), 3,40 (1H, d, *J* = 10,5, H-20b), 4,43 (1H, m, H-3), 7,57 (2H, ddd, *J*₁ = 7,6, *J*₂ = 6,1, *J*₃ = 1,4, H-2' a H-4', pyridinium), 7,99 (1H, tt, *J*₁ = 7,7, *J*₂ = 1,8, H-3', pyridinium), 8,75 (2H, d, *J* = 4,6, H-1' a H-5', pyridinium). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ 83,60 (C-17), 71,83 (C-3), 58,54 (CH₂N₃), 51,52, 46,19, 42,12, 40,64, 36,69, 36,50, 35,49, 34,99, 34,80, 32,35, 30,62, 27,15, 26,34, 23,72, 23,43, 20,50, 14,30. IČ spektrum (CHCl₃): 3140, 3093; 1638 (pyridinium); 1252, 1147 (SO₃). MS (ESI) *m/z*: 383,3 (40 %, M – H – pyridin). HR-MS (ESI) *m/z*: Pro C₂₀H₃₁O₅S (M–H–pyridin) vypočteno: 383,1897; nalezeno: 383,1895.

Příklad 86: (3*R*,5*R*,8*R*,9*S*,10*S*,13*S*,14*S*,17*S*)-17-(Azidomethyl)-10,13-dimethylhexadekahydro-1*H*-cyklopenta[*a*]fenantren-3,17-diol (98)

Roztok sloučeniny 96 (560 mg, 1,83 mmol), azidu sodného (341 mg, 5,68 mmol), a chloridu amonného (341 mg, 6,37 mmol) v ethanolu (28 ml) a vodě (5,6 ml) byl zahříván na 90 °C přes noc. Potom byla přidána voda, ethanol byl odpařen a produkt extrahován chloroformem (2x 50 ml). Spojené organické extrakty byly sušeny bezvodým síranem sodným a rozpouštědla odpa-

řena za sníženého tlaku. Olejovitý odparek chromatografií na sloupci silikagelu (30 % etheru v petroléteru) poskytl 500 mg (78 %) bílé tuhé pěny 98: $[\alpha]_D^{20}$ 0,0 (*c* 0,11, CHCl₃). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 0,86 (3H, s, H-18), 0,93 (3H, s, H-19), 3,26 (1H, d, *J* = 12, H_a-CH₂N₃), 3,54 (1H, d, *J* = 12, H_b-CH₂N₃), 3,63 (1H, m, H-3). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ 83,60 (C-17), 71,83 (C-3), 58,54 (CH₂N₃), 51,52, 46,19, ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 71,84 (C-3), 70,71 (C-17), 53,72 (C-20), 53,05 (C-14), 42,23, 40,79, 40,38, 36,55, 36,15, 35,53, 34,84, 34,32, 30,66, 29,28, 27,18, 26,08, 23,70, 23,45, 20,34, 14,48. IČ spektrum (CHCl₃): 3613, 1037 (3α-OH); 3562, 1116, (17β-OH); 2106 (azid). MS (ESI) *m/z*: 370,2 (100 %, M + Na). HR-MS (ESI) *m/z*: Pro C₂₀H₃₃O₂N₃Na (M+Na) vypočteno: 370,2465; nalezeno: 370,2464.

Příklad 87: (4*bR*,6*aR*,8*R*,10*aS*,10*bS*,12*aS*)-8-Hydroxy-10*a*,12*a*-dimethylhexadekahydrochrysen-1(2H)-on (99)

Jodid sodný (948 mg, 6,3 mmol) byl přidán k roztoku sloučeniny 98 (220 mg, 0,63 mmol) v sušeném acetonitrilu (10 ml). Potom byl přikapán trimethylsilyl chlorid (0,8 m, 6,26 mmol) pod inertní atmosférou. Reakční směs byla míchána za teploty místnosti a průběh reakce sledován TLC. Po dokončení konverze byla přidána zředěná kyselina chlorovodíková (5%, 10 ml). Produkt byl extrahován chloroformem (2x 40 ml). Spojené organické extrakty byly promyty roztokem siřičitanu sodného, nasyceným vodným roztokem chloridu sodného, sušeny bezvodým síranem sodným a rozpouštědla odpařena za sníženého tlaku. Zažloutlý odparek byl chromatografován na sloupci silikagelu (30 % étheru v petroléteru). Bylo získáno 140 mg (73 %) látky 99: t.t. 201 – 201 °C (éter/petroléter). $[\alpha]_D^{20}$ -23,6 (*c* 0,12, CHCl₃). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 0,91 (3H, s, H-18), 1,06 (3H, s, H-19), 2,04 (1H, m, H-16*a*), 2,19 (1H, m, H-17*a*), 2,61 (1H, td, *J*₁ = 14,0, *J*₂ = 6,8, H-17*b*), 3,61 (1H, m, H-3). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ 216,70 (C-17*a*), 71,86 (C-3), 51,73, 48,53, 41,71, 39,88, 37,34, 36,36, 35,68, 35,09, 35,00, 32,79, 30,74, 27,27, 26,11, 25,93, 23,49, 23,16, 19,87, 17,06. IČ spektrum (CHCl₃): 3609, 1037 (OH); 1698 (C=O). MS (ESI) *m/z*: 327,2 (100 %, M + Na), 631,5 (15 %, 2M + Na). Pro C₂₀H₃₂O₂ (304,4) vypočteno: 78,90 % C, 10,59 % H; nalezeno: 78,55 % C, 10,49 % H.

Příklad 88: (2*R*,4*aS*,4*bS*,6*aS*,10*bS*,6*aS*,12*aR*)-4*a*,6*a*-Dimethyloktadekahydrochrysen-2-ol (100)

Látka 100 byla připravena z látky 99 (110 mg, 0,36 mmol) analogicky dle přípravy látky 48. Chromatografie odparku na sloupci silikagelu (30 % étheru v petroléteru) poskytla látku 100 (68 mg, 65 %). t.t. 187 – 189 °C (aceton/*n*-heptan). $[\alpha]_D^{20}$ +17,1 (*c* 0,20, CHCl₃). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 0,78 (3H, s, H-18), 0,89 (3H, s, H-19), 3,62 (1H, m, H-3). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ 72,07 (C-3), 51,26, 42,54, 42,45, 42,00, 40,77, 36,52, 36,03, 35,20, 35,09, 33,77, 30,77, 27,45, 27,39, 25,53, 24,23, 23,62, 21,66, 20,38, 17,09. IČ spektrum (CHCl₃): 3609, 3447, 1031 (OH). MS (ESI) *m/z*: 313,3 (100 %, M + Na). Pro C₂₀H₃₄O (290,4) vypočteno: 82,69 % C, 11,80 % H; nalezeno: 82,42 % C, 11,71 % H.

Příklad 89: Pyridinium (2*R*,4*aS*,4*bS*,6*aS*,10*bS*,6*aS*,12*aR*)-4*a*,6*b*-dimethyloktadekahydrochrysen-2-yl-sulfát (101)

Látka 101 byla připravena dle *Obecného postupu I – příprava C-3 sulfátu* z látky 100 (30 mg, 0,10 mmol). Byl získán sulfát 101 (43 mg, 93 %): t.t. 173 – 174 °C. $[\alpha]_D^{20}$ +20,4 (*c* 0,27, CHCl₃). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 0,76 (3H, s, H-18), 0,87 (3H, s, H-19), 4,45 (1H, m, H-3), 8,00 (2H, m, H-2', H-4', pyridinium), 8,48 (1H, t, *J* = 7,8, H-3', pyridinium), 8,98 (2H, d, *J* = 5,5, H-1', H-5', pyridinium). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ 145,87 (C-1', C-5'), 142,38 (C-3'), 127,32 (C-2', C-4'), 79,82 (C-3), 51,28, 42,52, 42,45, 42,02, 40,67, 35,95, 35,13, 34,97, 33,75, 33,34, 27,92, 27,3, 27,22, 25,45, 24,20, 23,53, 21,63, 20,34, 17,07. IR (CHCl₃): 3139, 3100, 1637, 1490 (pyridinium); 1263, 1238, 1235, 1043 (SO₃). MS ESI *m/z*: 369,3 (100 %, M –

H – pyridin). HR–MS (ESI) m/z : Pro $C_{20}H_{33}O_4S$ (100 %, M–H–pyridin) vypočteno: 369,2105; nalezeno: 369,2103.

- 5 Příklad 90: 3–(((2*R*,4*aS*,4*bS*,6*aS*,10*bS*,12*aR*)–4*a*,6*b*–Dimethyloktadekahydrochrysen–2–yl)oxy)–3–oxopropanová kyselina (102)

Látka 102 byla připravena dle *Obecného postupu III – příprava C–3 malonátu* z látky 100 (132 mg, 0,45 mmol). Chromatografií na sloupci silikagelu (30 % ethyl–acetátu v petrolétheru) byl získán derivát 102 (157 mg, 92 %): t.t. 145,3 – 147,2 °C (aceton/*n*–heptan). $[\alpha]_D^{20} +25,3$ (c 0,29, $CHCl_3$). 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 0,79 (3H, s, H–18), 0,91 (3H, s, H–19), 3,36 – 3,47 (2H, m, $OCCH_2CO$), 4,80 – 4,90 (1H, m, H–3). ^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$): δ 168,89 (COOH), 168,08 (COO), 77,05 (C–3), 51,19, 42,51, 42,35, 41,79, 40,75, 40,17, 35,95, 35,05, 34,73, 33,77, 31,99, 27,43, 27,15, 26,58, 25,39, 24,20, 23,53, 21,62, 20,39, 17,08. IČ spektrum ($CHCl_3$): 3510 (OH, COOH, monomer); 3131 (OH, COOH, dimer); 1759 (C=O, COOH, monomer); 1734 (C=O); 1717 (C=O, COOH, dimer); 1410, 1291 (C–O, COOH, dimer); 1345, 1178 (C–O, COOH, monomer). MS (ESI) m/z : 399,3 (100 %, M + Na). HR–MS (ESI) m/z : Pro $C_{23}H_{36}O_4Na$ (M+Na) vypočteno: 399,2506, nalezeno: 399,2506.

20

Příklad 91: 4–(((2*R*,4*aS*,4*bS*,6*aS*,10*bS*,12*aR*)–4*a*,6*a*–Dimethyloktadekahydrochrysen–2–yl)oxy)–4–oxobutanová kyselina (103)

Látka 103 byla připravena dle *Obecného postupu II – příprava C–3 hemisukcinátu* z látky 100 (100 mg, 0,34 mmol). Chromatografií na sloupci silikagelu (10 % étheru v petrolétheru) byl získán derivát 103 (81 mg, 60 %): t.t. 136 – 138 °C (aceton/voda). $[\alpha]_D^{20} +34,8$ (c 0,21, $CHCl_3$). 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 0,79 (3H, s, H–18), 0,91 (3H, s, H–19), 2,59 (2H, ddd, $J_1 = 7,6$, $J_2 = 6,1$, $J_3 = 1,4$, zbytek kyseliny jantarové), 2,68 (2H, ddd, $J_1 = 7,3$, $J_2 = 6,1$, $J_3 = 1,3$, zbytek kyseliny jantarové), 4,75 (1H, tt, $J_1 = 11,3$, $J_2 = 4,7$, H–3). ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ 177,29 (COOH), 171,66 (COO), 75,05 (C–3), 51,05, 42,37, 42,23, 41,64, 40,58, 35,81, 34,93, 34,68, 33,62, 32,03, 29,28, 28,92, 27,29, 27,04, 26,58, 25,26, 24,05, 23,41, 21,48, 20,23, 16,93. IČ spektrum ($CHCl_3$): 3517 (OH, COOH, monomer); 2674 (OH, COOH, dimer); 1753 (C=O, COOH, monomer); 1717 (C=O, COOH, dimer); 1727 (C=O, ester). MS (ESI) m/z : 413,2 (100 %, M + Na). HR–MS (ESI) m/z : Pro $C_{24}H_{39}O_4$ vypočteno: 391,2843, nalezeno: 391,2839. Pro $C_{24}H_{38}O_4$ (402,6) vypočteno: 73,81 % C, 9,81 % H; nalezeno: 73,54 % C, 9,88 % H.

40

Příklad 92: 5–(((2*R*,4*aS*,4*bS*,6*aS*,10*bS*,12*aR*)–4*a*,6*a*–Dimethyloktadekahydrochrysen–2–yl)oxy)–5–oxopentanová kyselina (104)

Látka 104 byla připravena dle *Obecného postupu IV – příprava C–3 glutamátu* z látky 100 (106 mg, 0,36 mmol). Chromatografií na sloupci silikagelu (1 – 10 % acetonu v petrolétheru) byla získána sloučenina 104 (137 mg, 93 %): t.t. 148,7 – 151,0 °C (aceton/*n*–heptan). $[\alpha]_D^{20} +31,7$ (c 0,33, $CHCl_3$). 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 0,78 (3H, s, H–18), 0,90 (3H, s, H–19), 1,96 (2H, p, $J = 7,3$, H–3'), 2,36 (2H, t $J = 7,3$, H–2'), 2,43 (2H, t, $J = 7,3$, H–4'), 4,74 (1H, m, H–3). ^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$): δ 177,85 (COOH), 172,54 (COO), 74,74 (C–3), 51,22, 42,54, 42,39, 41,81, 40,74, 35,98, 35,11, 34,87, 33,78 (2 x C), 32,99, 32,29, 27,45, 27,21, 26,84, 25,43, 24,21, 23,58, 21,65, 20,39, 20,14, 17,09. IČ spektrum ($CHCl_3$): 3517 (OH, COOH, monomer); 3087 (OH, COOH, dimer); 1750 (C=O, COOH, monomer); 1720 (C=O); 1714 (C=O, COOH, dimer); 1381 (CH_3). MS (ESI) m/z : 427,3 (100 %, M + Na). HR–MS (ESI) m/z : Pro $C_{25}H_{40}O_4Na$ (M+Na) vypočteno: 427,2819, nalezeno: 427,2819.

50

Příklad 93: 5-Benzyl 1-((2*R*,4*aS*,4*bS*,6*aS*,10*bS*,12*aR*)-4*a*,6*a*-dimethyloktadekahydrochrysen-2-yl)-*N*-(*tert*-butoxykarbonyl)-*L*-glutamát (105)

K míchanému roztoku sloučeniny 100 (200 mg, 0,68 mmol), 4-(*N,N*-dimethylamino)pyridinu (8,5 mg, 0,068 mmol) a chráněné aminodikyseliny 5-benzyl-*N*-benzyloxykarbonyl-*L*-glutamo-
 5 vé (Boc-Glu(OBzl)-OH, 255 mg, 0,75 mmol) v sušeném benzenu (15 ml) byl přidán roztok dicyklohexylkarbodiimidu (1M, benzen, 1 ml) a reakční směs byla míchána za teploty místnosti pod inertní atmosférou argonu 5 h. Potom byly pevné podíly odfiltrovány, promyty sušeným benzenem. Reakční směs byla zahuštěna (asi na 2/3), byl přidán nasycený vodný roztok kyselého
 10 uhličitanu sodného a produkt extrahován do chloroformu (2x 50 ml). Spojené organické extrakty byly promyty nasyceným vodným roztokem chloridu sodného a sušeny bezvodým síranem sodným. Chromatografie na sloupci silikagelu (3 % acetonu v petroléteru) poskytla olejovitou sloučeninu 105 (375 mg, 89 %): $[\alpha]_D^{20} +17,5$ (*c* 0,19, CHCl₃). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 0,78 (3H, s, H-18), 0,90 (3H, s, H-19), 1,43 (9H, s, *t*-butyl), 2,15 – 2,25 (1H, m, H-3'), 2,37 –
 15 2,52 (2H, m, H-4'), 4,28 (1H, m, H-2'), 4,76 (1H, m, H-3), 5,10 (3H, m, NH, OCH₂Ph), 7,35 (5H, m, OCH₂Ph). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ 172,77 (C-1', C-5'), 156,15 (NHCO), 135,97 (C-1', benzyl), 128,72 (C-2'', C-6'', benzyl), 128,42 (C-4'', benzyl), 128,35 (C-3'', C-5'', benzyl), 80,06 (OCMe₃), 76,04 (C-3), 66,62 (OCH₂Ph), 53,23, 51,15, 42,51, 42,34, 41,81, 40,72, 35,97, 35,08, 34,77, 33,78, 32,15, 30,49, 28,48 (3 x C, OCMe₃), 28,16, 27,44, 27,17, 26,72,
 20 25,39, 24,21, 23,54, 21,65, 20,40, 17,09. IČ spektrum (CHCl₃): 3436, 1713 (NH-Boc); 3092, 3068, 1454 (benzyl); 1730 (C=O); 1467, 1368, 1381, 1392 (Boc). MS (ESI) *m/z*: 632,4 (100 %, M + Na), 1242,6 (5 %, 2M + 1). Pro C₃₇H₅₅NO₆ (609,8) vypočteno: 72,87 % C, 9,09 % H, 2,30 % N; nalezeno: 73,15 % C, 9,22 % H, 2,15 % N.

25 Příklad 94: (4*S*)-4-Amino-5-(((2*R*,4*aS*,4*bS*,6*aS*,10*bS*,12*aR*)-4*a*,6*a*-dimethyloktadekahydrochrysen-2-yl)-5-oxopentanová kyselina (106)

Roztok chráněného steroidního derivátu 100 (118 mg, 0,19 mmol) v methanolu (5 ml) byl mí-
 30 chán v přítomnosti paladiového katalyzátoru na aktivním uhlí (Pd/C, 10%, 5 mg) pod mírným přetlakem vodíku za teploty místnosti. Průběh reakce byl sledován chromatografií na tenké vrstvě (petroléter/aceton, 1:1). Po 1,5 h byl katalyzátor odfiltrován na krátkém sloupečku silikagelu a promyt chloroformem. Spojené organické podíly byly odpařeny. Chromatografie na sloupci silikagelu (10 % acetonu v petroléteru) poskytla *tert*-butyloxykarbonylem-chráněný produkt
 35 (62 mg, 62 %). Olejovitý odparek byl rozpuštěn v koncentrované kyselině trifluoroctové (1 ml) a roztok ponechán za teploty místnosti 15 min. Potom byla kyselina chlorovodíková odstraněna vyfoukáním proudem dusíku. Ke zbytku byla přidána směs pyridin/metanol (0,5:4,5 ml) a vzniklá směs byla po kapkách přidána ke směsi ledu a vody (5 ml). Až se led rozpustil, byla bílá vy-
 40 loučená sraženina odfiltrována a sušena při 50 °C přes noc. Bylo získáno 106 (34 mg, 68 %): t.t. 162 – 165 °C (metanol). $[\alpha]_D^{20} +20,7$ (*c* 0,26, CHCl₃/MeOH, 1,80:0,04). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃/MeOH): δ 0,72 (3H, s, H-18), 0,85 (3H, s, H-19), 2,41 (2H, m, H-3', H-4'), 3,68 (1H, m, H-2'), 4,75 (1H, m, H-3). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃/MeOH): δ 177,55 (COOH), 171,27 (COO), 76,71 (C-3), 53,42, 50,95, 42,22, 42,06, 41,59, 40,54, 35,72, 34,82, 34,43, 33,49, 33,27, 31,83, 27,47, 27,14, 26,92, 26,42, 25,15, 23,94, 23,18, 21,33, 20,12, 16,73. IČ spektrum (CHCl₃):
 45 2650, 2170, 1610 (NH₃⁺); 1743 (C=O); 1571 (COO⁻). MS (ESI) *m/z*: 418,3 (100%, M – H), 837,5 (40%, 2M – H). HR-MS (ESI) *m/z*: Pro C₂₅H₄₀NO₄ (M–H) vypočteno: 418,2962; nalezeno: 418,2959.

50 Příklad 95: 1-((3*R*,5*R*,8*R*,9*S*,10*S*,13*S*,14*S*)-3-(Methoxymethoxy)-10,13-dimethylhexadeca-
 hydro-1*H*-cyklopenta[*a*]fenantren-17(2*H*,10*H*,14*H*)yliden)-2-(tosyloxy)hydrazin (108)

K roztoku ketonu 107 (1,00 g, 3 mmol) a tosylhydrazidu (1,63 g, 8,5 mmol) v sušeném methanolu (70 ml) bylo přidáno prachové molekulární síto (40 mesh, 2 g) směs byla refluxována za mí-

chání pod argonem 72 h. Průběh reakce byl monitorován TLC, vyvíjení petroléter/acetón, 4 : 1. Reakční směs byla ochlazená na teplotu místnosti, přefiltrována. Filtrát odpařen za sníženého tlaku. Odparek rozpuštěn v toluenu (100 ml), sraženina odfiltrována, filtrát odpařen za sníženého tlaku. Odparek rozpuštěn v ethyl-acetátu. Roztok byl promyt nasyceným vodným roztokem hydrogenuhličitanu sodného (3x 25 ml), nasyceným roztokem chloridu sodného (25 ml) a sušen nad bezvodým síranem sodným. Rozpouštědla byla odpařena za sníženého tlaku a odparek čištěn chromatografií na sloupci silikagelu (15 % ethyl-acetátu v petroléteru). Bylo získáno 1,05 g hydrazonu 108 (67,4 %): t.t. 97,4 – 99,5 °C. $[\alpha]_D^{20} +44,2$ (c 0,33, CHCl₃). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 0,82 (3H, s, H-18), 0,92 (3H, s, H-19), 2,43 (3H, s, Tos), 3,36 (3H, s, H-2', MOM), 3,52 (1H, m, H-3), 4,67 (2H, s, H-1', MOM), 7,29 (2H, m, H-2'' a H-4'', Tos), 7,81 (2H, d, J = 8,3, H-1'' a H-5'', Tos). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ 129,49, 128,64, 128,02, 125,96, 94,62, 55,16, 53,29, 41,95, 40,58, 35,32, 35,23, 34,85, 33,53, 31,76, 27,69, 26,91, 25,83, 25,34, 23,25, 21,82, 21,64, 20,15, 20,09, 19,79, 16,65, 13,69. IČ spektrum (CHCl₃): 2938 (CH₂); 1659 (C=N); 1167 (SO₃); 1045, 1036 (COCOC). MS (ESI) *m/z*: 503,2 (10 %, M – CH₃). Pro C₂₈H₄₂N₂O₅S (518,7) vypočteno: 64,84 % C, 8,16 % H, 5,40 % N; nalezeno: 65,16 % C, 8,50 % H, 5,08 % N.

Příklad 96: (3*R*,5*R*,8*R*,9*S*,10*S*,13*R*,14*S*)-3-(methoxymethoxy)-10,13-dimethyl-2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15-tetradekahydro-1H-cyklopenta[*a*]fenantren (109)

Tosylhydrazon 108 (1 g, 1,93 mmol) v sušeném tetrahydrofuranu (30 ml) byl vychlazen na 0 °C a za míchání bylo přidáno methylithium (14 ml, 1,6 M, éter) pod argonem. Reakční směs byla míchána 2 h při 0 °C a přes noc za teploty místnosti. Poté byla směs opět ochlazená na 0 °C, reakce ukončena přidávkou vody (50 ml). Produkt byl extrahován do ethyl-acetátu (3 x 25 ml), spojené organické extrakty promyty vodným roztokem kyseliny citronové (5%, 30 ml), nasyceným vodným roztokem chloridu sodného a sušeny bezvodým síranem sodným. Rozpouštědla byla odpařena za sníženého tlaku. Odparek (880 mg) byl čištěn chromatografií na sloupci silikagelu (1 % acetonu v petroléteru). Bylo získáno 606,4 mg (98,6 %) nekystalizujícího olefinu 109: $[\alpha]_D^{20} +20,2$ (c 0,35, CHCl₃). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 0,74 (3H, s, H-18), 0,95 (3H, s, H-19), 3,37 (3H, s, H-2' MOM), 3,53 (1H, tt, *J*₁ = 11,2, *J*₂ = 4,7, H-3), 4,69 (2H, s, H-1', MOM), 5,67 (1H, ddd, *J*₁ = 5,8, *J*₂ = 3,0, *J*₃ = 1,5, H-16), 5,83 (1H, ddd, *J*₁ = 5,8, *J*₂ = 2,5, *J*₃ = 1,1, H-16). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ 144,08 (C-17), 129,45 (C-16), 94,75 (O-C-O), 77,01 (C-3), 56,33, 55,31, 45,81, 42,44, 41,44, 36,27, 35,52, 35,21, 34,68, 33,82, 32,19, 27,84, 27,39, 26,76, 23,56, 20,86, 17,19. IČ spektrum (CHCl₃): 3049 (C=C); 2935 (CH₂); 1047, 1036 (COCOC). MS (ESI) *m/z*: 341,4 (100 %, M + Na). HR-MS (ESI) *m/z*: Pro C₂₁H₃₄O₂Na (M+Na) vypočteno: 341,2451; nalezeno: 341,2452. Pro C₂₁H₃₄O₂ (318,5) vypočteno: 79,19 % C, 10,76 % H; nalezeno: 79,29 % C, 10,85 % H.

Příklad 97: (3*R*,5*R*,8*S*,9*S*,10*S*,13*R*,14*S*,16*R*)-3-(Methoxymethoxy)-10,13-dimethylhexadekahydro-1H-cyklopenta[*a*]fenantren-16-ol (110)

K nasycenému roztoku dimeru 9-borabicyklo[3,3,1]nonanu (102 ml, 51 mmol) ochlazenému na 0 °C byl pod argonovou atmosférou přidán roztok olefinu 109 (2 g, 6,30 mmol) v tetrahydrofuranu (42 ml). Reakční směs byla míchána při 0 °C pod argonem 4 h. Poté byla přidána voda (32,6 ml) a vodný roztok hydroxidu sodného (10%, 32,6 ml), peroxid vodíku (30%, 48,6 ml) a vše mícháno za teploty místnosti přes noc. Následovalo přidání siřičitanu sodného (3,36 g), kyseliny octové (98 %, 16,4 ml), vody (80,8 ml) a vodného roztoku kyseliny citronové (5%, 81,8 ml). Produkt byl vytřepán do ethyl-acetátu (3x 80 ml). Spojené organické extrakty byly promyty nasyceným vodným roztokem chloridu sodného (50 ml), vodným roztokem hydrogenuhličitanu sodného (5%, 2x 50 ml), opět nasyceným vodným roztokem chloridu sodného (5 ml) a sušeny bezvodým síranem sodným. Organická fáze byla odpařena za sníženého tlaku a chromatografií odparku na sloupci silikagelu (1 – 5 % acetonu v petroléteru) bylo získáno 1,26 mg (60 %) hydroxyderivátu 110: t.t. 98,7 – 100 °C (acetón/*n*-heptan). $[\alpha]_D^{20} +16,6$ (c 0,33,

CHCl₃). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 0,69 (3H, s, H-18), 0,91 (3H, s, H-19), 3,37 (3H, s, H-2', MOM), 3,53 (1H, tt, *J*₁ = 11,2, *J*₂ = 4,7, H-3), 4,45 (1H, tdd, *J*₁ = 7,6, *J*₂ = 6,0, *J*₃ = 1,6, H-16), 4,69 (2H, s, H-1', MOM). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ 94,72 (C-3), 77,03 (C-16), 72,07, 55,30, 52,31, 52,29, 42,28, 42,11, 40,80, 39,06, 37,44, 35,86, 35,54, 35,05, 33,74, 27,88, 27,33, 26,85, 23,56, 20,59, 18,81. IČ spektrum (CHCl₃): 3612 (OH); 2941 (CH₂); 1040 (COCOC). MS (ESI) *m/z*: 359,3 (100 %, M + Na). HR-MS (ESI) *m/z*: Pro C₂₁H₃₅O₃ (M+H) vypočteno: 359,2558; nalezeno: 359,2558. Pro C₂₁H₃₆O₃ (336,5) vypočteno: 74,95 % C, 10,78 % H; nalezeno: 74,68 % C, 11,02 % H.

Příklad 98: (3*R*,5*R*,8*S*,9*S*,10*S*,13*R*,14*S*)-3-(Methoxymethoxy)-10,13-dimethylhexadekahydro-1H-cyklopenta[*a*]fenantren-16-on (111)

Látka 110 (3,17 g, 9,4 mmol) byla rozpuštěna v čerstvě sušeném dichlormethanu (150 ml). K roztoku byl přidán sušený pyridin (10 ml) a pyridinium chlorochromát (16,7 g, 77,5 mmol). Směs byla míchána pod argonem za teploty místnosti 2 h. Potom byla přefiltrována přes malý sloupec silikagelu (15 g), ten promyt ethyl-acetátem. Rozpouštědla byla odpařena, odparek znovu rozpuštěn v ethyl-acetátu a promyt vodným roztokem kyseliny citronové (5%, 2x 40 ml), nasyceným vodným roztokem chloridu sodného (50 ml), nasyceným vodným roztokem hydrogenuhlíčitanu sodného (2x 30 ml), znovu nasyceným vodným roztokem chloridu sodného (50 ml) a sušen bezvodým síranem sodným. Odpařením rozpouštědel za sníženého tlaku bylo získáno 2,59 g (95 %) produktu 111: t.t. 107,9 – 108 °C (aceton/*n*-heptan). [α]_D²⁰ -134,7 (*c* 0,35, CHCl₃). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 0,86 (3H, s, H-18), 0,95 (3H, s, H-19), 3,37 (3H, s, H-2', MOM), 3,54 (1H, ddd, *J*₁ = 15,8, *J*₂ = 11,1, *J*₃ = 4,7, H-3), 4,69 (2H, s, H-1', MOM). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ 218,91 (C=O), 94,78 (C-3), 56,12, 55,34, 51,91, 42,05, 40,68, 39,49, 39,40, 38,56, 35,47, 35,25, 35,10, 33,71, 27,87, 27,13, 26,89, 23,49, 20,50, 18,23. IČ spektrum (CHCl₃): 2937 (-CH₂-); 1737 (C=O); 1045, 1037 (COCOC). MS (ESI) *m/z*: 335,3 (32 %, M + H) 273,2 (100 %). HR-MS (ESI) *m/z*: Pro C₂₁H₃₅O₃ (M+H) vypočteno: 335,2586; nalezeno: 335,2579. Pro C₂₁H₃₄O₃ (334,5) vypočteno: 75,41 % C, 10,25 % H; nalezeno: 75,66 % C, 10,33 % H.

Příklad 99: (3*R*,5*R*,8*S*,9*S*,10*S*,13*R*,14*S*)-3-Hydroxy-10,13-dimethylhexadekahydro-16H-cyklopenta[*a*]fenantren-16-on

K roztoku chráněného derivátu 111 (3,4 g, 10,2 mmol) v methanolu (95 ml) byl přidán roztok kyseliny chlorovodíkové (1,8 ml, 37%) v methanolu (30 ml). Reakční směs byla míchána pod argonem za teploty místnosti přes noc. Poté byla přidána voda (100 ml) a směs zahuštěna za sníženého tlaku. Produkt byl extrahován do ethyl-acetátu (3x 70 ml), spojené organické fáze promyty nasyceným vodným roztokem hydrogenuhlíčitanu sodného, nasyceným vodným roztokem chloridu sodného, sušeny bezvodým síranem sodným a rozpouštědla odpařena za sníženého tlaku. Byl získán hydroxyketon 112 (3,17 g, 93 %): t.t. 135,8 – 136,7 °C (aceton/*n*-heptan). [α]_D²⁰ -167,4 (*c* 0,33, CHCl₃). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 0,86 (3H, s, H-18), 0,96 (3H, s, H-19), 3,65 (1H, tt, *J*₁ = 10,8, *J*₂ = 4,7, H-3). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ 218,88 (C=O), 71,81, 56,12, 51,91, 42,01, 40,74, 39,48, 39,40, 38,56, 36,55, 35,49, 35,22, 34,96, 30,64, 27,09, 26,93, 23,45, 20,51, 18,23. IČ spektrum (CHCl₃): 2936 (CH₂); 1736 (C=O); 3609, 1032 (OH). MS (ESI) *m/z*: 290,2 (100 %, M + Na). HR-MS (ESI) *m/z*: Pro C₁₉H₃₀O₂ (M+Na) vypočteno: 313,2138; nalezeno: 313,2137. Pro C₁₉H₃₀O₂ (290,4) vypočteno: 78,57 % C, 10,41 % H; nalezeno: 78,27 % C, 10,36 % H.

Příklad 100: (3*R*,5*R*,8*S*,9*S*,10*S*,13*R*,14*S*)-10,13-Dimethyl-16-methylenhexadekahydro-1H-cyklopenta[*a*]fenantren-3-ol (113)

5 Látka 113 byla připravena z látky 112 (800 mg, 2,76 mmol) analogicky dle přípravy látky 66. Chromatografií na sloupci silikagelu (1 – 5 % acetonu v petroléteru) bylo získáno 756 mg (95 %) 113: t.t. 165,3 – 165,6 °C (aceton/*n*-heptan). $[\alpha]_D^{20}$ –69,8 (*c* 0,35, CHCl₃). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 4,88 (ddh, *J*₁ = 4,4, *J*₂ = 3,0, *J*₃ = 1,6, 1H), 3,63 (tt, *J*₁ = 11,1, *J*₂ = 4,7, 1H), 2,33 (ddt, *J*₁ = 16,1, *J*₂ = 7,5, *J*₃ = 1,6, 1H). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ 151,39 (=CH₂), 107,09 (C-16), 71,99 (C-3), 54,39, 49,61, 42,23, 40,89, 40,78, 38,79, 36,63, 35,96, 35,50, 34,91, 33,54, 30,71, 27,29, 26,85, 23,53, 20,92, 17,76. IČ spektrum (CHCl₃): 3609 (–OH); 3015, 1658 (=CH₂); 2934 (CH₂). MS (ESI) *m/z*: 311,3 (100 %, M + Na). HR-MS (ESI) *m/z*: Pro C₂₅H₃₈O₄Na (M+Na) vypočteno: 311,2345; nalezeno: 311,2344. Pro C₂₀H₃₂O (288,5) vypočteno: 83,27 % C, 11,17 % H; nalezeno: 83,02 % C, 11,07 % H.

15

Příklad 101: Pyridinium (3*R*,5*R*,8*S*,9*S*,10*S*,13*R*,14*S*)-10,13-dimethyl-16-methylenhexadekahydro-1H-cyklopenta[*a*]fenantren-3-yl-sulfát (114)

20 Látka 114 byla připravena dle *Obecného postupu I – příprava C-3 sulfátu* z látky 113 (83 mg, 0,29 mmol). Byl získán krystalický sulfát 114 (66 mg, 56 %): t.t. 180 – 182 °C (chloroform). $[\alpha]_D^{20}$ –41,9 (*c* 0,35, CHCl₃). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 0,70 (3H, s, H-18), 0,91 (3H, s, H-19), 2,30 (1H, dd, *J*₁ = 16,0, *J*₂ = 7,7), 4,45 (1H, tt, *J*₁ = 11,2, *J*₂ = 4,9 H-3), 4,87 (2H, m, =CH₂), 8,02 (2H, m, H-2' a H-4', pyridinium), 8,48 (1H, t, *J* = 8,6, H-3', pyridinium), 8,99 (2H, d, *J* = 5,2, H-1' a H-5', pyridinium). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ 218,89 (C-16), 178,74, 145,89 (C-1' a C-5', pyridinium), 142,39 (C-3', pyridinium), 127,31 (C-2' a C-4', pyridinium), 79,51 (C-3), 56,11, 51,94, 42,05, 40,68, 39,48, 39,38, 38,57, 35,42, 35,21, 34,85, 33,42, 27,85, 26,85, 26,82, 23,68, 20,40, 18,02. IČ spektrum (CHCl₃): 1736 (C=O); 1656 (C=C); 1460 (=CH, pyridin); 1263, 1171, 969, 947 (OSO₃). MS (ESI) *m/z*: 467,2 (100 %, M + H – pyridin). HR-MS (ESI) *m/z*: Pro C₂₀H₃₁O₄S vypočteno: 367,1946; nalezeno: 367,1945.

30

Příklad 102: 4-(((3*R*,5*R*,8*S*,9*S*,10*S*,13*R*,14*S*)-10,13-Dimethyl-16-methylenhexadekahydro-1H-cyklopenta[*a*]fenantren-3-yl)oxy)-4-oxobutanová kyselina (115)

35

Látka 115 byla připravena dle *Obecného postupu II – příprava C-3 hemisukcinátu* z látky 114 (95 mg, 0,33 mmol). Chromatografií na sloupci silikagelu (10 – 20 % acetonu v petroléteru) byl získán derivát 115 (120,4 mg, 84,3 %): t.t. 165 – 165,7 °C (aceton/*n*-heptan). $[\alpha]_D^{20}$ –36,8 (*c* 0,29, CHCl₃). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 0,73 (3H, s, H-18), 0,94 (3H, s, H-19), 2,38 – 2,77 (2H, m, H-16a, H-16b), 2,72 – 2,55 (4H, m, poloester kyseliny jantarové), 4,76 (1H, tt, *J*₁ = 11,4, *J*₂ = 4,7 H-3), 4,89 (2H, ddq, *J*₁ = 4,2, *J*₂ = 2,9, *J*₃ = 1,5, =CH₂), 4,58 – 4,65 (2H, m), 4,74 (1H, tt, *J*₁ = 11,3, *J*₂ = 4,7). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ 177,07 (COOH), 171,82 (COO), 151,29 (=CH₂), 107,14 (C-16), 75,11 (C-3), 54,37, 49,61, 42,04, 40,89, 40,77, 38,75, 35,90, 35,16, 34,93, 33,51, 32,34, 29,43, 29,00, 27,11, 26,72, 23,49, 20,94, 17,75. IČ spektrum (CHCl₃): 3518 (OH, COOH, monomer); 3070, 1657 (=CH₂); 2674 (OH, COOH, dimer); 1752 (C=O, COOH, monomer); 1717 (C=O, COOH, dimer); 1727 (C=O, ester). MS (ESI) *m/z*: 387,3 (100 %, M – 1). HR-MS (ESI) *m/z*: Pro C₂₄H₃₅O₄ (M–H) vypočteno: 387,2541; nalezeno: 387,2527. Pro C₂₄H₃₅O₄ (388,5) vypočteno: 74,19 % C, 9,34 % H; nalezeno: 74,19 % C, 9,34 % H.

50

Příklad 103: 5-Benzyl-1-(((3*R*,5*R*,8*S*,9*S*,10*S*,13*S*,14*S*)-10,13-dimethylhexadekahydro-1*H*-cyklopenta[*a*]fenantren-3-yl)oxy)-L-glutamát (129)

5 Látka 129 byla připravena z látky 48 (309 mg, 1,11 mmol) analogicky dle přípravy látky 105. Chromatografií na sloupci silikagelu (3 % acetonu v petroléteru) bylo získáno 214 (36 %) mírně znečištěného žádaného produktu a 361 mg (54 %) čistého olejovitého produktu 129. $[\alpha]_D^{20} +17,8$ (*c* 0,27, CHCl₃). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 0,68 (3H, s, H-18), 0,93 (3H, s, H-19), 1,43 (9H, s, O^tBu), 2,20 (1H, m, H-3a'), 2,44 (2H, m, H-4'), 4,28 (1H, m, H-2'), 4,84 (1H, m, H-3),
10 4,76 (1H, m, H-3), 5,11 (3H, m, OCH₂Ph a NH). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ 172,59 (C-1'), 171,63 (C-5'), 155,34 (NHCO), 135,80 (C-1, benzyl), 128,55 (2 x C-3, benzyl), 128,24 (C-4, benzyl), 128,18 (2 x C-2, benzyl), 79,88 (O^tBu), 75,85 (C-3), 66,45 (OCH₂Ph), 54,50, 53,05, 41,95, 40,93, 40,73, 40,48, 38,98, 36,18, 35,06, 34,73, 32,15, 30,32, 28,32, 28,0, 27,0, 26,70, 26,55, 25,51, 23,32 (3 x C, O^tBu), 20,86, 20,59, 17,50. IČ (CHCl₃): 3092, 3068 (CH, benzyl);
15 1730 (C=O, ester); 1713 (C=O, amid); 1499 (NH, amid); 1260, 1235 (OCN, ester); 1165 (O^tBu). MS (ESI) *m/z*: 618,2 (100%, M + Na), 619,2 (40%, M + Na + 1). HR-MS (ESI) *m/z*: Pro C₃₆H₅₃NO₆Na [M+Na] vypočteno: 618,3765; nalezeno: 618,3763. Pro C₃₆H₅₃NO₆ (595,2) vypočteno: 72,57 % C, 8,97 % H, 2,35 % N; nalezeno: 72,52 % C, 9,12 % H, 2,11 % N.

20

Příklad 104: (4*S*)-4-Amino-5-(((3*R*,5*R*,8*S*,9*S*,10*S*,13*S*,14*S*)-10,13-dimethylhexadekahydro-1*H*-cyklopenta[*a*]fenantren-3-yl)oxy)-5-oxopentanová kyselina (130)

Látka 130 byla připravena z látky 129 (361 mg, 0,61 mmol) analogicky dle přípravy látky 106.
25 Bylo získáno 186 mg (80 %) produktu 130: t.t. 167 - 168 °C. $[\alpha]_D^{20} +24,4$ (*c* 0,16, CHCl₃). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃ + 3 kapky MeOD): δ 0,61 (3H, s, H-18), 0,88 (3H, s, H-19), 2,40 (2H, t, *J* = 6,3, H-3'), 3,69 (1H, dd, *J*₁ = 8,1, *J*₂ = 3,4, H-2'), 4,75 (1H, m, H-3).
30 ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ 177,51 (COOH), 171,32 (COO), 76,61 (C-3), 54,40, 53,24, 41,83, 40,79, 40,65, 40,31, 38,83, 36,04, 34,85, 34,59, 33,10, 31,94, 27,37, 26,87, 26,57, 26,38, 25,36, 23,14, 20,72, 20,42, 17,32. IČ (CHCl₃): 2646, 2179, 1609 (NH₃⁺): 1748 (C=O, ester); 1570 (COOH). MS (ESI) *m/z*: 406,3 (100%, M + 1), 428,3 (99%, M + Na). HR-MS (ESI) *m/z*: Pro C₂₄H₄₀NO₄ [M+1] vypočteno: 406,2951, nalezeno: 406,2951.

35

Metodou použitou pro přípravu látky 8 byly připraveny další sloučeniny uvedené v Tabulce 1:

Tabulka 1

Látka	Hodnota teploty tání (°C)	Hodnota optické rotace [α] _D (20 °C)	¹ H-NMR signály: H-18; H-19; H-3	MS (<i>m/z</i>), Molekulární ion minus pyridinium (<i>m/z</i> = 80,1), relativní intenzita píku
Pyridinium (3 <i>R</i> ,5 <i>R</i> ,8 <i>R</i> ,9 <i>S</i> ,10 <i>S</i> ,13 <i>S</i> ,14 <i>S</i>)-10,13- -dimethyl-17- -methylenhexadekahydro-1H- cyklopenta[<i>a</i>]fenantren-3-yl-sulfát (116)	155 - 157	+41,6	0,73; 0,91; 4,44	311,3; 100 %
Pyridinium (3 <i>R</i> ,5 <i>R</i> ,8 <i>S</i> ,9 <i>S</i> ,10 <i>S</i> ,13 <i>R</i> ,14 <i>S</i> ,17 <i>S</i>)- -10,13,17-trimethylhexadekahydro- -1H-cyklopenta[<i>a</i>]fenantren-3-yl- -sulfát (117)	174 - 175	-21,6	0,51; 0,91; 4,46	369,2; 100 %
Pyridinium (3 <i>R</i> ,5 <i>R</i> ,8 <i>S</i> ,9 <i>S</i> ,10 <i>S</i> ,13 <i>S</i> ,14 <i>R</i> ,17 <i>R</i>)- -10,17-dimethylhexadekahydro-1H- -cyklopenta[<i>a</i>]fenantren-3-yl-sulfát (118)	152 - 155	-0,5	není; 0,85; 4,46 0,75 (17α-Me)	355,2; 100 %
Pyridinium (3 <i>R</i> ,5 <i>R</i> ,8 <i>S</i> ,9 <i>S</i> ,10 <i>S</i> ,13 <i>R</i> ,14 <i>R</i> ,17 <i>S</i>)- -10,17-dimethylhexadekahydro-1H- -cyklopenta[<i>a</i>]fenantren-3-yl-sulfát (119)	155 - 158	+26,9	není; 0,85; 4,45 0,90 (17β-Me)	355,2; 100 %
Pyridinium (3 <i>R</i> ,5 <i>R</i> ,8 <i>S</i> ,9 <i>S</i> ,10 <i>S</i> ,13 <i>R</i> ,14 <i>S</i> ,17 <i>S</i>)-17- -ethyl-10,13-dimethylhexadekahydro- -1H-cyklopenta[<i>a</i>]fenantren-3-yl- -sulfát (120)	182 - 184	+61,5	0,53; 0,86; 4,47	383,1; 100 %
Pyridinium (3 <i>R</i> ,5 <i>R</i> ,8 <i>R</i> ,9 <i>S</i> ,10 <i>S</i> ,13 <i>S</i> ,14 <i>S</i> ,17 <i>R</i>)- -10,13-dimethyl-17-(prop-1-en-2- -yl)hexadekahydro-1H- -cyklopenta[<i>a</i>]fenantren-3-yl-sulfát (121)	169 - 172	+42,0	0,52; 0,90; 4,45	395,2; 100 %
Pyridinium (3 <i>R</i> ,5 <i>R</i> ,8 <i>R</i> ,9 <i>S</i> ,10 <i>S</i> ,13 <i>R</i> ,14 <i>S</i> ,17 <i>R</i>)-17- -isopropyl-10,13- -dimethylhexadekahydro-1H- -cyklopenta[<i>a</i>]fenantren-3-yl-sulfát (122)	190 - 194	+26,2	0,62; 0,82; 4,46	397,2; 100 %

Pyridinium (3 <i>R</i> ,5 <i>R</i> ,8 <i>R</i> ,9 <i>S</i> ,10 <i>S</i> ,13 <i>R</i> ,14 <i>S</i> ,17 <i>R</i>)-17- -(<i>R</i>)-sek-butyl)-10,13- -dimethylhexadecahydro-1 <i>H</i> - -cyklopenta[<i>a</i>]fenantren-3-yl-sulfát (123)	186 - 188	+13,8	0,62; 0,81; 4,46	411,4; 100 %
Pyridinium (3 <i>S</i> ,3 <i>aS</i> ,5 <i>bR</i> ,7 <i>aR</i> ,9 <i>R</i> ,11 <i>aS</i> ,11 <i>bS</i> ,13 <i>aR</i>)-3,11 <i>a</i> -dimethylhexadecahydro- -1 <i>H</i> ,3 <i>H</i> -nafto[2',1':4,5]indeno[1,7 <i>a</i> - c]furan-9-yl-sulfát (124)	118 - 121	+30,5	3,37 a 3,63; 0,84; 4,47	397,1; 100 %
Pyridinium (2 <i>R</i> ,4 <i>aS</i> ,4 <i>bS</i> ,6 <i>aS</i> ,10 <i>bR</i> ,12 <i>aR</i>)-4 <i>a</i> ,6 <i>a</i> - -dimethyl-7- -oxooktadecahydrochrysen-2-yl-sulfát (125)	177 - 179	-13,8	0,89; 1,05; 4,45	383,3; 100 %
Pyridinium (3 <i>R</i> ,5 <i>R</i> ,8 <i>R</i> ,9 <i>R</i> ,10 <i>S</i> ,13 <i>S</i> ,14 <i>S</i>)-13- -methylhexadecahydro-1 <i>H</i> - -cyklopenta[<i>a</i>]fenantren-3-yl-sulfát (126)	192 - 194	+19,0	0,66; není; 4,42	341, 2; 100 %
Pyridinium (3 <i>R</i> ,5 <i>S</i> ,8 <i>R</i> ,9 <i>R</i> ,10 <i>S</i> ,13 <i>S</i> ,14 <i>S</i>)-10,13- -dimethylhexadecahydro-1 <i>H</i> - -cyklopenta[<i>a</i>]fenantren-3-yl-sulfát (127)	167 - 169	+8,2	0,66; 0,77; 4,74	458,3; 50 % (M + Na - -pyridinium)
Pyridinium (2 <i>S</i> ,4 <i>aR</i> ,4 <i>bR</i> ,8 <i>aS</i> ,10 <i>aS</i>)- -4 <i>a</i> - -methyltetradecahydrofenantren-2- -yl-sulfát (128)	147-149	-24,1	není; 0,86; 4,47	301,0; 100 %

Biologická aktivita měřená na buněčných kulturách

- 5 Míra inhibice aktivovaného NMDA receptoru steroidními kationickými sloučeninami byla stanovena *in vitro* elektrofyziologicky na kultivovaných HEK293 buňkách (Human Embryonic Kidney 293 cells) 24–48 hodin po transfekci DNA plazmidy, kódujícími NR1–1*a* a NR2B podjednotku NMDA receptoru. Transfekované buňky byly identifikovány pomocí fluorescence GFP (green fluorescent protein), jehož gen byl transfekován společně s geny obou receptorových podjednotek.

15 Aplikační roztoky obsahující steroid byly připraveny přidáním příslušného množství čerstvě připraveného zásobního roztoku (20 mmol.l⁻¹ steroidu rozpuštěného v DMSO) do extracelulárního roztoku s obsahem 1 mmol.l⁻¹ kyseliny glutamové a 10 μmol.l⁻¹ glycinu. Stejně množství DMSO bylo přidáno i do všech ostatních aplikačních roztoků.

20 Proudové odpovědi vyvolané extracelulární aplikací roztoku kyseliny glutamové (1 mmol.l⁻¹) byly snímány z celé buňky pomocí techniky patch-clamp, která se využívá jako nástroj pro studium přenosu nabitých částic přes modelové i reálné biologické membrány. Proudové byly měřeny při membránovém potenciálu -60 mV a +60 mV. Testované steroidní sloučeniny snížily amplitudu odpovědi indukované kyselinou glutamovou. Při použití koncentrace steroidu 10 μmol.l⁻¹ se hodnota měřeného proudu v průměru snížila o 65 – 70 %. Pro srovnání lze uvést, že inhibice endogenním neurosteroidem 5*alfa*-pregnanolon-3*beta*-yl-sulfátem v koncentraci 100 μmol.l⁻¹ má hodnotu 67 %.

25

Vliv nových sloučenin na rekombinantní NMDA receptory

HEK293 buňky (American Type Culture Collection, ATTC No. CRL1573, Rockville, MD) byly kultivovány v médiu Opti-MEM® I (Invitrogen) s přidavkem 5% fetálního telecího séra při 37 °C a transfekovány NR1-1a/NR2B/GFP plazmidy, jak bylo popsáno dříve (Neuroscience 151, 428–438, 2008). Stejná množství (0,3 µg) cDNA kódující NR1, NR2 a GFP (green fluorescent protein) (pQBI 25, Takara, Japonsko) byla smíchána s 0,9 µl Matra-A Reagent (IBA, Göttingen, Germany) a přidána ke konfluentním HEK293 buňkám, kultivovaných v 24jamkové destičce. Po trypsinizaci byly buňky resuspendovány v médiu Opti-MEM® I, obsahujícím 1% fetální telecí sérum. Do směsi byly dále přidány 20 mmol.l⁻¹ MgCl₂, 1 mmol.l⁻¹ D,L-2-amino-5-fosfonopentanové kyseliny, 3 mmol.l⁻¹ kynurenové kyseliny a buňky byly nasazeny na polylysinem potažená krycí sklíčka o průměru 25 mm. Po transfekci byly použity následující geny kódující podjednotky NMDA receptorů: NR1-1a (GenBank, přírůstkové č. U08261) a NR2B (GenBank, přírůstkové č. M91562).

Pro elektrofyziologické pokusy byly použity kultury HEK293 buněk 16 až 40 hodin po transfekci. Proudové, vzniklé při snímání z celé buňky, byly měřeny pomocí patch-clamp zesilovače (Axopatch 1D; Axon Instruments, Inc. Foster City, USA) po kompenzaci kapacity a sériového odporu (<10 MΩ) na 80–90 %. 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 mmol.l⁻¹ D-glukonové kyseliny, 15 mmol.l⁻¹ chloridu cesného, 5 mmol.l⁻¹ EGTA, 10 mmol.l⁻¹ HEPES 3 mmol.l⁻¹ chloridu hořečnatého, 0,5 mmol.l⁻¹ chloridu vápenatého a 2 mmol.l⁻¹ hořečnaté soli ATP (pH upraveno na 7,2 roztokem hydroxidu cesného). Extracelulární roztok (ECS) obsahoval 160 mmol.l⁻¹ chloridu sodného, 2,5 mmol.l⁻¹ chloridu draselného, 10 mmol.l⁻¹ HEPES, 10 mmol.l⁻¹ glukózy, 0,2 mmol.l⁻¹ EDTA a 0,7 mmol.l⁻¹ chloridu vápenatého (pH upraveno na 7,3 roztokem hydroxidu sodného). Glycin byl přidán jak do testovacího, tak do kontrolního roztoku. Roztoky se steroidem byly připraveny z čerstvě připraveného zásobního roztoku (20 mmol.l⁻¹) 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.

Proudové odpovědi vyvolané 100 µM NMDA (v případě hipokampálních neuronů) nebo 1 mmol.l⁻¹ glutamátu (v případě rekombinantních NMDA receptorů) byly měřeny při udržovaném membránovém potenciálu -60 mV. V souladu s předchozími výsledky pregnanolonsulfát snížil amplitudu NMDA-indukované odpovědi. Při použití 100 µmol.l⁻¹ pregnanolonsulfátu byl průměrný inhibiční efekt 71,3 ± 5,0 % (n = 5) odpovědi vyvolaných aktivací NMDA receptorů na hipokampálních neuronech a 67,2 ± 8,2 % (n = 5) na rekombinantních NR1/NR2B receptorech (J. Neurosci., 25, 8439–50, 2005). Syntetická analoga pregnanolon-sulfátu měla inhibiční efekt (tak aby míra inhibice byla v rozmezí 30–70 % maximální inhibice). 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 je parametr Hillova koeficientu (1,2). Hodnoty IC₅₀ jsou uvedeny v následující tabulce.

Nově syntetizované analogy (8, 18, 19, 21, 22, 34, 35, 40, 49, 50, 51, 59, 61, 62, 64, 65, 67, 68, 69, 74, 76,83, 85, 88, 93, 95, 97, 101, 106, 114, 116–124, 126, 127, 128, 130) mají stejný mechanismus působení na NMDA receptorech jako pregnanolon sulfát, liší se však svojí relativní afinitou k NMDA receptoru (viz Tabulka 2).

Tabulka 2

Testovaná látka	Relativní míra inhibice (%)	IC ₅₀ (μmol)	Koncentrace (μmol.l ⁻¹)
<i>3alfa,5beta</i> -Pregnanolon-sulfát <i>referenční sloučenina</i>	67,2 ± 8,2	55	100
Pyridinium (2 <i>R</i> ,4 <i>aS</i> ,4 <i>bS</i> ,8 <i>aR</i> ,10 <i>aR</i>)-4 <i>a</i> - -methyltetradekahydrofenantren-2-yl-sulfát (8)	78,3 ± 5,5	28,3	100
Pyridinium (2 <i>R</i> ,4 <i>aS</i> ,4 <i>bS</i> ,7 <i>S</i> ,8 <i>S</i> ,8 <i>aS</i> ,10 <i>aR</i>)-7-(methoxymethyl)- -4 <i>a</i> ,7,8-trimethyltetradekahydrofenantren-2-yl-sulfát (18)	60,5 ± 4,6	33	50
4-(((2 <i>R</i> ,4 <i>aS</i> ,4 <i>bS</i> ,7 <i>S</i> ,8 <i>aS</i> ,10 <i>aR</i>)-7-(Methoxymethyl)-4 <i>a</i> ,7,8- -trimethyltetradekahydrofenantren-2-yl)oxy)-4-oxobutanová kyselina (19)	47,4 ± 4,3	55	50
Pyridinium (2 <i>R</i> ,4 <i>aS</i> ,7 <i>S</i> ,8 <i>S</i> ,10 <i>aR</i>)-7-(methoxykarbonyl)-4 <i>a</i> ,7,8- -trimethyltetradekahydrofenantren-2-yl-sulfát (22)	40,9 ± 6,1	74,6	100
4-(((2 <i>R</i> ,4 <i>aS</i> ,4 <i>bS</i> ,7 <i>R</i> ,8 <i>aS</i> ,10 <i>aR</i>)-4 <i>a</i> ,7- -Dimethyltetradekahydrofenantren-2-yl)oxy)-4-oxobutanová kyselina (34)	27,0 ± 10	23,2	10
Pyridinium (2 <i>R</i> ,4 <i>aS</i> ,4 <i>bS</i> ,7 <i>R</i> ,8 <i>aS</i> ,10 <i>aR</i>)-4 <i>a</i> ,7- -dimethyltetradekahydrofenantren-2-yl-sulfát (35)	85,0 ± 1,2	12	50
Methyl (2 <i>S</i> ,4 <i>aS</i> ,4 <i>bS</i> ,7 <i>R</i> ,8 <i>aR</i> ,10 <i>aS</i>)-2,4 <i>b</i> -dimethyl-7- -(sulfooxy)tetradekahydrofenantren-2-karboxylát (40)	14,4 ± 1,8	224	50
Pyridinium (3 <i>R</i> ,5 <i>R</i> ,8 <i>S</i> ,9 <i>S</i> ,10 <i>S</i> ,13 <i>S</i> ,14 <i>S</i>)-10,13- -dimethylhexadekahydro-1 <i>H</i> -cyklopenta[<i>a</i>]fenantren-3-yl-sulfát (49)	49,2 ± 6,6	2,1	2
2-(((3 <i>R</i> ,5 <i>R</i> ,8 <i>S</i> ,9 <i>S</i> ,10 <i>S</i> ,13 <i>S</i> ,14 <i>S</i>)-10,13-Dimethylhexadekahydro- -1 <i>H</i> -cyklopenta[<i>a</i>]fenantren-3-yl)oxy)-2-oxoethanová kyselina (50)	64,0 ± 7,0	6,3	10
2-(((3 <i>R</i> ,5 <i>R</i> ,8 <i>S</i> ,9 <i>S</i> ,10 <i>S</i> ,13 <i>S</i> ,14 <i>S</i>)-10,13-Dimethylhexadekahydro- -1 <i>H</i> -cyklopenta[<i>a</i>]fenantren-3-yl)oxy)-2-oxopropanová kyselina (51)	42,0 ± 14,0	15,5	10
2-(((3 <i>R</i> ,5 <i>R</i> ,10 <i>S</i> ,13 <i>S</i> ,14 <i>S</i>)-10,13-Dimethylhexadekahydro-1 <i>H</i> - -cyklopenta[<i>a</i>]fenantren-3-yl)amino)-2-oxooctová kyselina (59)	32,0 ± 5,0	23,2	10
((3 <i>R</i> ,5 <i>R</i> ,8 <i>S</i> ,9 <i>S</i> ,10 <i>S</i> ,13 <i>S</i> ,14 <i>S</i>)-10,13-Dimethylhexadekahydro-1 <i>H</i> - -cyklopenta[<i>a</i>]fenantren-3-yl)amino)-3-oxopropanová kyselina (61)	40,0 ± 5,7	15,4	10
4-(((3 <i>R</i> ,5 <i>R</i> ,8 <i>S</i> ,9 <i>S</i> ,10 <i>S</i> ,13 <i>S</i> ,14 <i>S</i>)-10,13-Dimethylhexadekahydro- -1 <i>H</i> -cyklopenta[<i>a</i>]fenantren-3-yl)oxy)- <i>N,N,N</i> -trimethyl-4- -oxobutan-1-amonium chlorid (62)	34,0 ± 5,0	1,7	1
4-(((3 <i>R</i> ,5 <i>R</i> ,8 <i>R</i> ,9 <i>S</i> ,10 <i>S</i> ,13 <i>R</i> ,14 <i>S</i>)-10,13-Dimethyl- -2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15-tetradekahydro-1 <i>H</i> - -cyklopenta[<i>a</i>]fenantren-3-yl)oxy)-4-oxobutanová kyselina (64)	45,9 ± 11,7	12,9	10
3-(((3 <i>R</i> ,5 <i>R</i> ,8 <i>R</i> ,9 <i>S</i> ,10 <i>S</i> ,13 <i>R</i> ,14 <i>S</i>)-10,13-Dimethyl- -2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15-tetradekahydro-1 <i>H</i> - -cyklopenta[<i>a</i>]fenantren-3-yl)oxy)-3-oxopropanová kyselina (65)	44,0 ± 11,0	13,5	10

3-(((3 <i>R</i> ,5 <i>R</i> ,8 <i>R</i> ,10 <i>S</i> ,13 <i>S</i> ,14 <i>S</i>)-10,13-Dimethyl-17-methylenhexadecahydro-1 <i>H</i> -cyklopenta[<i>a</i>]fenantren-3-yl)oxy)-3-oxopropanová kyselina (67)	53,0 ± 10,2	18,9	20
4-(((3 <i>R</i> ,5 <i>R</i> ,8 <i>R</i> ,9 <i>S</i> ,10 <i>S</i> ,13 <i>S</i> ,14 <i>S</i>)-10,13-Dimethyl-17-methylenhexadecahydro-1 <i>H</i> -cyklopenta[<i>a</i>]fenantren-3-yl)oxy)-4-oxobutanová kyselina (68)	24,2 ± 14,3	18,8	5
4-(((3 <i>R</i> ,5 <i>R</i> ,8 <i>R</i> ,9 <i>S</i> ,10 <i>S</i> ,13 <i>S</i> ,14 <i>S</i>)-10,13-Dimethyl-17-methylenhexadecahydro-1 <i>H</i> -cyklopenta[<i>a</i>]fenantren-3-yl)oxy)-4-oxopentanová kyselina (69)	62,9 ± 5,1	11,6	20
2-(((3 <i>R</i> ,5 <i>R</i> ,8 <i>R</i> ,9 <i>S</i> ,10 <i>S</i> ,13 <i>S</i> ,14 <i>S</i>)-10,13-Dimethyl-17-oxohexadecahydro-1 <i>H</i> -cyklopenta[<i>a</i>]fenantren-3-yl)oxy)octová kyselina (74)	58,6 ± 9,3	38,7	50
2-(((3 <i>R</i> ,5 <i>R</i> ,8 <i>R</i> ,9 <i>S</i> ,10 <i>S</i> ,13 <i>S</i> ,14 <i>S</i>)-10,13-Dimethyl-17-methylenhexadecahydro-1 <i>H</i> -cyklopenta[<i>a</i>]fenantren-3-yl)oxy)- <i>N,N,N</i> -trimethyl-2-oxoethan-1-ammonium chlorid (76)	50,0 ± 10,0	51,7	50
3-(((3 <i>R</i> ,5 <i>R</i> ,8 <i>R</i> ,9 <i>S</i> ,10 <i>S</i> ,13 <i>S</i> ,14 <i>S</i> , <i>Z</i>)-17-Ethyliden-10,13-dimethylhexadecahydro-1 <i>H</i> -cyklopenta[<i>a</i>]fenantren-3-yl)oxy)-3-oxopropanová kyselina (83)	60,5 ± 10,1	20,7	30
5-(((3 <i>R</i> ,5 <i>R</i> ,8 <i>R</i> ,9 <i>S</i> ,10 <i>S</i> ,13 <i>S</i> ,14 <i>S</i> , <i>Z</i>)-17-Ethyliden-10,13-dimethylhexadecahydro-1 <i>H</i> -cyklopenta[<i>a</i>]fenantren-3-yl)oxy)-5-oxopentanová kyselina (85)	59,4 ± 7,8	38,4	50
3-(((3 <i>R</i> ,5 <i>R</i> ,8 <i>R</i> ,9 <i>S</i> ,10 <i>S</i> ,13 <i>S</i> ,14 <i>S</i> ,17 <i>R</i>)-10,13-Dimethyl-17-(prop-1-en-2-yl)hexadecahydro-1 <i>H</i> -cyklopenta[<i>a</i>]fenantren-3-yl)oxy)-3-oxopropanová kyselina (88)	46,0 ± 0,9	11,8	10
Pyridinium (3 <i>R</i> ,5 <i>R</i> ,8 <i>R</i> ,9 <i>S</i> ,10 <i>S</i> ,13 <i>S</i> ,14 <i>S</i> ,17 <i>S</i>)-17-jodo-10,13-dimethylhexadecahydro-1 <i>H</i> -cyklopenta[<i>a</i>]fenantren-3-yl-sulfát (93)	90,5 ± 2,2	0,8	5
Pyridinium (3 <i>R</i> ,5 <i>R</i> ,8 <i>R</i> ,9 <i>S</i> ,10 <i>S</i> ,13 <i>S</i> ,14 <i>S</i>)-17,17-difluor-10,13-dimethylhexadecahydro-1 <i>H</i> -cyklopenta[<i>a</i>]fenantren-3-yl-sulfát (95)	61,2 ± 5,1	7,0	10
Pyridinium (3 <i>R</i> ,5 <i>R</i> ,8 <i>R</i> ,9 <i>S</i> ,10 <i>S</i> ,13 <i>S</i> ,14 <i>S</i> ,17 <i>S</i>)-10,13-dimethylhexadecahydrospiro[cyklopenta- <i>a</i>]fenantren-17,2'-oxiran]-3-yl-sulfát (97)	78,0 ± 8,9	45	100
Pyridinium (2 <i>R</i> ,4 <i>aS</i> ,4 <i>bS</i> ,6 <i>aS</i> ,10 <i>bS</i> ,6 <i>aS</i> ,12 <i>aR</i>)-4 <i>a</i> ,6 <i>a</i> -dimethyloktadecahydrochrysen-2-yl-sulfát (101)	69,1 ± 5,9	2,3	5
(4 <i>S</i>)-4-Amino-5-(((2 <i>R</i> ,4 <i>aS</i> ,4 <i>bS</i> ,6 <i>aS</i> ,10 <i>bS</i> ,12 <i>aR</i>)-4 <i>a</i> ,6 <i>a</i> -dimethyloktadecahydrochrysen-2-yl)oxy)-5-oxopentanová kyselina (106)	48,7 ± 6,3	10,6	10
Pyridinium (3 <i>R</i> ,5 <i>R</i> ,8 <i>S</i> ,9 <i>S</i> ,10 <i>S</i> ,13 <i>R</i> ,14 <i>S</i>)-10,13-dimethyl-16-methylenhexadecahydro-1 <i>H</i> -cyklopenta[<i>a</i>]fenantren-3-yl-sulfát (114)	59,1 ± 3,8	2,1	3
Pyridinium (3 <i>R</i> ,5 <i>R</i> ,8 <i>R</i> ,9 <i>S</i> ,10 <i>S</i> ,13 <i>S</i> ,14 <i>S</i>)-10,13-dimethyl-17-methylenhexadecahydro-1 <i>H</i> -cyklopenta[<i>a</i>]fenantren-3-yl-sulfát (116)	68,3 ± 4,3	1,4	3
Pyridinium (3 <i>R</i> ,5 <i>R</i> ,8 <i>S</i> ,9 <i>S</i> ,10 <i>S</i> ,13 <i>R</i> ,14 <i>S</i> ,17 <i>S</i>)-10,13,17-trimethylhexadecahydro-1 <i>H</i> -cyklopenta[<i>a</i>]fenantren-3-yl-sulfát (117)	73,1 ± 6,7	1,1	3
Pyridinium (3 <i>R</i> ,5 <i>R</i> ,8 <i>S</i> ,9 <i>S</i> ,10 <i>S</i> ,13 <i>S</i> ,14 <i>R</i> ,17 <i>R</i>)-10,17-dimethylhexadecahydro-1 <i>H</i> -cyklopenta[<i>a</i>]fenantren-3-yl-sulfát (118)	68,0 ± 7,8	1,5	3
Pyridinium (3 <i>R</i> ,5 <i>R</i> ,8 <i>S</i> ,9 <i>S</i> ,10 <i>S</i> ,13 <i>R</i> ,14 <i>R</i> ,17 <i>S</i>)-10,17-dimethylhexadecahydro-1 <i>H</i> -cyklopenta[<i>a</i>]fenantren-3-yl-sulfát (119)	81,1 ± 2,1	0,7	3
Pyridinium (3 <i>R</i> ,5 <i>R</i> ,8 <i>S</i> ,9 <i>S</i> ,10 <i>S</i> ,13 <i>R</i> ,14 <i>S</i> ,17 <i>S</i>)-17-ethyl-10,13-dimethylhexadecahydro-1 <i>H</i> -cyklopenta[<i>a</i>]fenantren-3-yl-sulfát (120)	84,9 ± 3,6	0,5	3

Pyridinium (3R,5R,8R,9S,10S,13S,14S,17R)-10,13-dimethyl-17-(prop-1-en-2-yl)hexadekahydro-1H-cyklopenta[a]fenantren-3-yl-sulfát (121)	71,7 ± 8,0	0,4	1
Pyridinium (3R,5R,8R,9S,10S,13R,14S,17R)-17-isopropyl-10,13-dimethylhexadekahydro-1H-cyklopenta[a]fenantren-3-yl-sulfát (122)	59,6 ± 18,8	2,0	3
Pyridinium (3R,5R,8R,9S,10S,13R,14S,17R)-17-((R)-sek-butyl)-10,13-dimethylhexadekahydro-1H-cyklopenta[a]fenantren-3-yl-sulfát (123)	46,2 ± 2,3	11,7	10
Pyridinium (3S,3aS,5bR,7aR,9R,11aS,11bS,13aR)-3,11a-dimethylhexadekahydro-1H,3H-nafto[2',1':4,5]indeno[1,7a-c]furan-9-yl-sulfát (124)	69,1 ± 4,0	51	100
Pyridinium (3R,5R,8R,9R,10S,13S,14S)-13-methylhexadekahydro-1H-cyklopenta[a]fenantren-3-yl-sulfát (126)	68,3 ± 7,4	5,4	10
Pyridinium (3R,5S,8R,9R,10S,13S,14S)-10,13-dimethylhexadekahydro-1H-cyklopenta[a]fenantren-3-yl-sulfát (127)	34,0 ± 5,0	1,7	3
Pyridinium (2S,4aR,4bR,8aS,10aS)-4a-methyltetradekahydrofenantren-2-yl-sulfát (128)	58,0 ± 2,0	36,3	50
(4S)-4-Amino-5-(((3R,5R,8S,9S,10S,13S,14S)-10,13-dimethylhexadekahydro-1H-cyklopenta[a]fenantren-3-yl)oxy)-5-oxopentanová kyselina (130)	36,7 ± 7,0	1,6	1

Experimenty *in vivo*

- 5 V Experimentální části 1 byli použiti dospělí (30 až 35 g) samci laboratorní myši kmene CD-1, pocházející z chovů Velaz, ČR. Myši byly ustájeny v plastových boxech s 12hodinovým světelným cyklem (světlo od v 7:00 hodin). Myši měly volný přístup k potravě i vodě.

- 10 V Experimentální části 2 byli použiti dospělí (3 měsíce, 300 až 400 g) samci laboratorního potkana kmene Long-Evans. Zvířata pocházela z chovů Fyziologického ústavu AV ČR. Potkani byli ustájeni v průhledných plastových boxech se stejným světelným cyklem jako u myši. Zvířata měla volný přístup k potravě a vodě. Všechny experimenty probíhaly ve světelné části dne. Všechny pokusy byly prováděny v souladu se Zákonem na ochranu zvířat proti týrání.

- 15 Použité chemikálie

Amfifilní steroidní sloučeniny byly rozpuštěny v roztoku 3 g (2-hydroxypropyl)-β-cyklodextrinu (CDX, Sigma-Aldrich) a 157 mg kyseliny citronové (3-hydroxypenta-1,3,5-trikarboxylová kyselina, Sigma-Aldrich). Takto byly připraveny roztoky všech čtyř steroidů pro aplikaci dávek 0,1, 1, 10 a 100 mg/kg.

25 Účinnost studovaných látek byla srovnávána se známými NMDA antagonisty memantinem (Sigma-Aldrich) v dávce 5 mg/kg u potkanů, ketaminem (Vétoquinol) v dávce 10 mg/kg a dizocilpinem (MK-801) (Sigma-Aldrich) v dávce 0,3 mg/kg u myši. Tyto tři látky byly rozpuštěny ve fyziologickém roztoku (B Braun).

30 K anestezii potkanů při operacích byl použit isofluran (3,5%, Baxter). Pro vyvolání excitotoxických lézí dorzálního hipokampu byl aplikován 0,05 mol.l⁻¹ roztok NMDA (Sigma-Aldrich) v 0,4 mol.l⁻¹ fosfátovém pufru, připraveném smísením roztoku 356 g Na₂HPO₄ · 12 H₂O (m. hm. 358,14) v 4,2 l destilované vody a roztoku 62,4 g NaHPO₄ · 2 H₂O (m. hm. 156,01) v 0,8 l destilované vody. pH výsledného roztoku NMDA bylo upraveno na hodnotu 7,4 pomocí NaOH.

Použité přístroje

Při operacích byl použit dvouramenný stereotaktický aparát (Kopf Instruments) a mikroinfuzní
5 pumpa (TSE Systems). K anestezii byl použit odpařovač pro isofluran (A. E. Services & Supp-
lies) a inhalační maska pro potkany.

Speciální aparatury použité při behaviorálních úlohách budou spolu s postupem při experimentu
10 popsány níže.

Experimentální část 1

Jako modelový organismus byla pro tento experiment zvolena laboratorní myš. Následující experi-
15 menty byly prováděny tak, jak je popsáno ve Front Behav. Neurosci. 8, 130 (2014).

Primární behaviorální testování

Účelem primárního behaviorálního testování bylo rychlé zjištění vlivu látek na CNS dependentní
20 funkce a případných zjevných projevů toxicity. Šlo o zjednodušenou modifikaci Irwinova testu
zvolenou s ohledem na behaviorální profil antagonistů NMDA receptorů.

Myši byly testovány jednotlivě. Zvířatům byly intraperitoneálně podány studované látky, viz sou-
25 hrnná tabulka, v dávce 1 mg/kg. Kontrolní skupiny tvořili jedinci, jimž byl aplikován roztok
CDX nebo fyziologický roztok.

Vyvýšené křížové bludiště

Test ve vyvýšeném křížovém bludišti (EPM) sloužil ke zjištění vlivu látek na anxientu (úzkost)
30 zvířat. Použitá dávka byla stejná jako v předchozím experimentu. Dvě kontrolní skupiny předsta-
vovala zvířata, kterým byl aplikován fyziologický roztok, resp. roztok CDX. Srovnávací skupině
byl podán nekompetitivní antagonist NMDA receptorů ketamin (10 mg/kg). Látky byly myším
aplikovány intraperitoneálně 30 minut před testováním v EPM.

Test otevřeného pole (open field)

35 Před testem byla myši intraperitoneálně aplikována studovaná látka v dávce 0,1 až 100 mg/kg.
Jako kontroly byly použity intaktní myši a myši, kterým byl podán roztok CDX. Pro srovnání
účinků s nekompetitivním antagonistou NMDA receptorů byla dalším myším podána látka MK-
801 (0,3 mg/kg). Z experimentu byla vyhodnocena celková dráha myši v aréně jako ukazatel
40 lokomoční aktivity. Kromě toho byla posouzena dráha ušlá během jednotlivých desetiminuto-
vých úseků experimentu. Na základě těchto hodnot bylo možné zjistit časovou latenci nástupu
účinku a změny lokomační aktivity v průběhu času.

45 V tomto uspořádání se současně sledoval sedativní účinek studovaných látek v nejvyšší použité
dávce. Pro prokázání sedativního účinku, či naopak toxických a neočekávaných účinků vysokých
dávek studovaných látek byla myším aplikována příslušná látka v dávce 100 mg/kg. V průběhu
času byla sledována lokomační aktivita a případné zjevné změny jako třes, ataxie, neklid, pří-
padně sedace, nebo celková anestezie (absence reakcí na podněty, snížení svalového tonu).

50 Test nuceného plavání (forced swimming)

Tento test byl použit k sledování antidepresivního účinku látek. Zvířata plavou 6 min v akrylátov-
ném válci ve vodě o teplotě 24 °C. Vyhodnocuje se doba imobility, jejíž snížení je projevem anti-
55 depresivních vlastností farmak.

Test pasivního vyvarování se (passive avoidance)

Averzivně motivovaný paměťový test byl hodnocen na základě latence vstupu do preferované, ale s nepříjemným vjemem spojené části zařízení.

5

Experimentální část 2

V tomto experimentu byly hodnoceny neuroprotektivní účinky amfifilních steroidních sloučenin. Postup byl prováděn podle *Neuropharmacology* 61, 61–68 (2011).

10

Bilaterální excitotoxické léze dorzálního hipokampu

Potkani byli náhodně rozděleni do jedenácti skupin. Kontrolní zahrnovala kontrolně operovaná zvířata, kterým byl do hipokampu aplikován fosfátový pufr o pH 7,4. Druhou skupinu, nazvanou NMDA, tvořila zvířata, kterým byly provedeny NMDA léze hipokampu. Zvířatům ve třetí skupině byl po provedení NMDA léze aplikován klinicky používaný NMDA antagonist memantin v dávce 5 mg/kg. Ostatním skupinám byly aplikovány studované látky v dávce 1 mg/kg.

15

Aktivní alotetické vyhýbání se místu (AAPA)

20

Test byl prováděn v rotující aréně se zakázaným sektorem v podobě kruhové výseče (60°). Pokud potkan vstoupil do tohoto sektoru, byl mu do končetin udělen slabý elektrický impulz. Jestliže zvíře sektor neopustilo, impulz se každých 1200 ms opakoval.

25

Testování paměti a prostorové kognice potkanů pomocí AAPA proběhlo během čtyř sezení, což je u zdravých potkanů dostačující pro dosažení asymptotické úrovně (*Behav. Brain. Res.* 189, 139–144 (2008)). Pro zhodnocení paměti a prostorové kognice byla využita data ze čtvrtého sezení, a to počet vstupů do zakázaného sektoru a maximální doba vyhýbání se sektoru. Tato data byla off-line analyzována (programem TrackAnalysis, Biosignal Group) a následně statisticky vyhodnocena.

30

Po ukončení experimentu byla lokalizace léze orientačně histologicky verifikována.

Statistické vyhodnocení

35

Data byla vyhodnocena pomocí neparametrického testu s využitím kritéria Mann Whitney v programu GraphPad. Rozdíl byl považován za signifikantní pro $p < 0,05$, za nesignifikantní tendenci pak pro $0,05 < p < 0,075$. V grafech jsou zobrazeny průměry, chybové úsečky vyjadřují standardní chybu průměru (SEM).

40

Výsledky pokusů *in vivo*

Experimentální část 1

45

Primární behaviorální screen neodhalil žádné abnormální chování po podání studovaných látek (1 mg/kg), viz souhrnná tabulka. Reflexy všech myší i jejich rovnováha a motorická koordinace byly normální. Nebyly zaznamenány statisticky významné rozdíly mezi skupinami.

50

Míra anxiety byla hodnocena na základě počtu vstupů do otevřených ramen a celkové doby strávené v otevřených ramenech bludiště. Bylo prokázáno signifikantní zvýšení obou sledovaných parametrů po podání androstan glutamátu v dávce 1 mg/kg, a to ve srovnání s oběma kontrolními skupinami (s aplikovaným fyziologickým roztokem, resp. roztokem CDX), což prokazuje anxiolytické účinky uvedených dávek androstan glutamátu. Nejvyšších hodnot obou sledovaných parametrů ze všech testovaných skupin bylo dosaženo po podání androstan glutamátu v dávce 1 mg/kg.

55

Aplikace androstan glutamátu v dávce 10 mg/kg vyvolala signifikantní prodloužení celkové doby strávené v otevřených ramenech EPM oproti zvířatům obou kontrolních skupin, počet vstupů do otevřených ramen se však od kontrolních skupin (fyziologický roztok, CDX) signifikantně nelišil.

Mezi oběma kontrolními skupinami nebyl ani u jednoho ze sledovaných parametrů signifikantní rozdíl.

Podobně byl studován antidepresivní účinek v testu nuceného plavání. Účinnost byla hodnocena jako snížení flotace u myši po podání studovaných látek, jako referenční látka byl použit ketamin, který v souladu s literaturou prokázal antidepresivní účinek. Podobně jako v předchozím testu byl prokázán signifikantní pokles flotace a delší latence k první flotaci po podání androstan glutamátu v dávce 1 mg/kg.

Vliv studovaných látek na spontánní lokomační aktivitu zvířat byl hodnocen podle celkové dráhy ušlé v testu otevřeného pole za dobu 50 minut. Mezi celkovou dráhou myši obou kontrolních skupin (intaktní zvířata a CDX) nebyl signifikantní rozdíl.

Podání dizocilpinu (0,3 mg/kg) mělo za následek signifikantní prodloužení celkové dráhy vůči kontrolní skupině s aplikovaným roztokem CDX. Vůči intaktním zvířatům byla patrná tendence ke zvýšení ($p = 0,0653$).

Aplikace látek 67, 68, 69, 81, 84, 106, 124 a 130 v dávce 10 a 100 mg/kg vedlo k signifikantnímu snížení dráhy ve srovnání s intaktními myšmi. U nižších dávek nebyla (na rozdíl od skupiny s dizocilpinem) pozorována hyperlokomoce. Tyto výsledky nasvědčují nízkému nebezpečí indukce nežádoucích účinků typických pro NMDA antagonisty po podání výše uvedených sledovaných látek. Hodnoty dráhy ušlé v jednotlivých desetiminutových úsecích experimentu jsou v přímé spojitosti se změnami lokomoční aktivity v čase. Pro statistické porovnání těchto změn jsme použili výpočet plochy pod křivkou, který je přímým vyjádřením časového průběhu změn v ušlé dráze. Výpočet plochy pod křivkou byl proveden vždy pro každé pozorování, následně takto získaná data byla statisticky porovnána mezi jednotlivými skupinami.

Výsledky ukazují, že lokomoce intaktivních zvířat se postupně snižovala. Tento trend byl obdobný i u skupiny myši po podání CDX. V lokomoční aktivitě intaktivních zvířat a zvířat s aplikovaným CDX nebyl signifikantní rozdíl. V případě dizocilpinu (0,3 mg/kg) naproti tomu došlo k postupnému zvyšování lokomační aktivity. Na nejvyšší a poměrně neměnné úrovni se lokomace udržovala mezi 20. a 50. minutou po jeho podání. Celková lokomační aktivita po podání dizocilpinu byla signifikantně vyšší také oproti oběma kontrolním skupinám.

Aplikace látek 67, 68, 69, 81, 84, 106, 124 a 130 ve vyšší dávce 10 resp. 100 mg/kg vyvolala značný pokles lokomační aktivity. Mírný pokles lokomace byl patrný již po 10. minutě po aplikaci. Mezi 20. a 40. minutou byla lokomační aktivita minimální, zvířata projevovala známky výrazné ospalosti a celkové, sedace, účinek byl nejvýraznější u androstan glutamátu.

Mírné narušení paměti v testu pasivního vyvarování se bylo pozorováno pouze u látky 84 v použité dávce 1 mg/kg. U ostatních látek nebyl pozorován nežádoucí vliv na formování paměťové stopy, který je z literatury popsán u řady NMDA antagonistů.

Experimentální část 2

Z důvodů etického imperativu na redukci počtu laboratorních zvířat použitých v experimentu byly do další fáze vybrány pouze látky s nejvýraznějšími výsledky.

Aktivní alotetické vyhýbání se místu:

5 NMDA léze dorzálního hipokampu u potkanů indukovaly kognitivní deficit, projevující se jako signifikantní zvýšení počtu vstupů do zakázaného sektoru a signifikantní snížení maximální doby vyhýbání se sektoru při čtvrtém sezení v AAPA ve srovnání s kontrolní skupinou.

10 U potkanů, kterým byly po operaci aplikovány látky 67 a 130 v dávce 1 mg/kg, došlo k signifikantnímu snížení počtu vstupů do zakázaného sektoru při čtvrtém sezení v AAPA oproti skupině NMDA. Obě látky zároveň signifikantně zvýšily maximální čas vyhýbání se sektoru při čtvrtém sezení vzhledem k NMDA. Tyto poznatky ukazují na zmírnění kognitivního deficitu a tedy neuroprotektivní účinnost látek 67 a 130. Dále jsme zaznamenali tendenci ke zvýšení maximální doby vyhýbání a snížení počtu vstupů do zakázaného sektoru u potkanů s aplikací látek 68, 81 a 84 a klinicky používaného memantinu. Kognitivní deficit byl nejvýraznější ve skupině NMDA.
15 Naopak nejlepší výsledky testu kognitivních funkcí vykazovala kontrolně operovaná zvířata.

Tabulka 3: Schematický přehled výsledků:

Látka	Sedační vliv	Behaviorální testování	Test otevřeného pole	Test pasivního vyvarování se	NMDA léze	Test nuceného plavání
	Rychlý nástup sedace v dávce 100 mg/kg	Absence známek toxicity	Absence hyperlokomoce	Žádné narušení paměti	Zlepšení kognice v testu AAPA po NMDA lézi	Snížení flotace
67	+	+	+		++++	
68	+	+	+	+	+++	
69	+	+	+		-/+	
81	+	+	+	+	++	-
84	+	+	+	-/+	++	
106	-	+	+	+	-	-
124	-	+	+	-/+	-	-
130	+	+	+	+	+++++	+

– požadovaný vliv nepozorován,

-/+ požadovaný vliv nedostatečný,

+ požadovaný vliv pozorován

Průmyslová využitelnost

30 Sloučeniny podle předloženého vynálezu jsou průmyslově vyrobitelné a použitelné pro léčení mnoha onemocnění centrální nervové soustavy, jako jsou například následující: hypoxické a ischemické poškození CNS, mrtvice a další patologické změny způsobené hyperexcitací; neurodegenerativní změny a poruchy; afektivní poruchy, deprese, post-traumatická stresová porucha

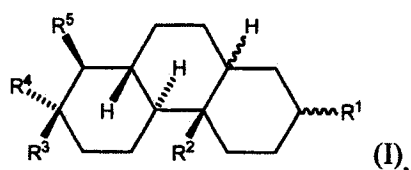
a nemoci související se stresem; schizofrenie a další psychotické poruchy; bolest, hyperalgezie, poruchy ve vnímání bolesti; závislosti; roztroušená skleróza a další autoimunitní onemocnění; epilepsie a jiné poruchy projevující se křečemi a hyperplastické změny na centrální nervové soustavě, tumory v centrální nervové soustavě včetně gliomů.

5

PATENTOVÉ NÁROKY

10

1. Amfifilní sloučeniny s tetradekahydrofenantrenovým skeletem obecného vzorce I



15

kde

R^1 je zvolen ze skupiny, zahrnující $(-OSO_3H)$, $HOOC-R^6-C(R^7)-R^8-$, nebo $R^9-R^{10}-C(R^{11})-R^{12}-$, kde

20

R^6 je C_1 až C_6 alkylen nebo C_2 až C_6 alkenylen s přímým nebo větveným řetězcem, popřípadě substituovaný jedním nebo více atomy halogenu či aminovou skupinou,

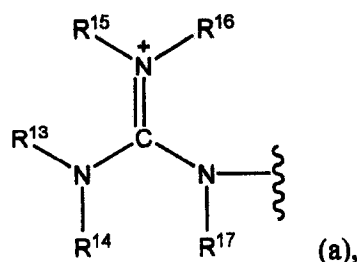
25

R^7 je tvořen atomem kyslíku, dusíku nebo síry vázaného dvojnou vazbou, nebo dvěma atomy vodíku,

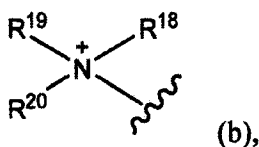
R^8 je jakýkoliv minimálně dvojjazný atom, s výhodou atom dusíku, kyslíku nebo uhlíku,

30

R^9 znamená kationickou skupinu zvolenou z guanidylové skupiny obecného vzorce a



nebo kvartérní amoniové skupiny obecného vzorce b



35

kde R^{13} až R^{20} jsou vodíkové atomy nebo C_1 až C_6 alkylové či C_2 až C_6 alkenylové skupiny s přímým nebo větveným řetězcem,

- R^{10} je C_1 až C_6 alkylen nebo C_2 až C_6 alkenylen s přímým nebo větveným řetězcem, který může být dále substituován jedním až 10 atomy halogenu, nebo aminoskupinou primární či substituovanou C_1 až C_4 alkylem s přímým nebo větveným řetězcem;
- 5 R^{11} je tvořen atomem kyslíku, dusíku nebo síry vázaného dvojnou vazbou, nebo dvěma atomy vodíku, a
- R^{12} je zvolený z atomu kyslíku, dusíku nebo uhlíku a v případě, že R^{12} je uhlík či dusík, jsou jeho další valence obsazeny vodíkem, případně vodíky, přičemž kterýkoliv z vodíkových atomů může být nahrazen C_1 až C_4 alkylem, nebo C_2 až C_4 alkenylem;
- 10 R^2 je vodíkový atom nebo methyl;
- R^3 je a) vodíkový atom, a potom
- 15 i) R^4 a R^5 jsou každý nezávisle vodíkový atom, nebo
- ii) jeden z R^4 a R^5 je vodíkový atom a druhý z nich je C_1 až C_6 alkyl či C_2 až C_6 alkenyl s přímým nebo větveným řetězcem, který může být dále substituován v případě alkylu 1 až 13 a v případě alkenylu 1 až 9 atomy halogenu, případně dvojně vázaným atomem kyslíku nebo síry, přičemž v řetězci může být jedna z methylenových skupin nahrazena atomem kyslíku nebo síry,
- 20 b) C_1 až C_6 alkyl či C_2 až C_6 alkenyl s přímým nebo větveným řetězcem, který může být dále substituován v případě alkylu 1 až 13 a v případě alkenylu 1 až 9 atomy halogenu, případně dvojně vázaným atomem kyslíku nebo síry, přičemž v řetězci může být jedna z methylenových skupin nahrazena atomem kyslíku nebo síry, a potom
- 25 R^4 a R^5 jsou nezávisle na sobě vodíkovým atomem, nebo
- 30 c) C_5 či C_6 alicyklický či aromatický substituent, přičemž uhlíkové atomy mohou být funkcionalizovány 1 až 8 atomy halogenu v případě pětičlenného cyklu, nebo 1 až 10 halogenovými atomy v případě šestičlenného cyklu; a potom
- 35 i) R^4 je vodíkový atom a R^5 je zvolen z vodíkového atomu, nebo C_1 až C_6 alkylu či C_2 až C_6 alkenylu s přímým nebo větveným řetězcem, který může být dále substituován v případě alkylu 1 až 13 a v případě alkenylu 1 až 9 atomy halogenu, případně dvojně vázaným atomem kyslíku nebo síry, přičemž v řetězci může být jedna z methylenových skupin nahrazena atomem kyslíku nebo síry, nebo
- 40 ii) R^4 a R^5 znamenají alkylenový či alkenylenový substituent $-(CH_m)_n-$, kde n je 3 až 4, m je 1 až 2, vytvářející s původními uhlíkovými atomy skeletu v poloze 7 a 8 nasycený nebo nenasycený 5 nebo 6 členný cyklus, kde vodíkové atomy použitého alkenylenového substituentu mohou být substituovány nejméně jedním atomem halogenu, nebo C_1 až C_4 alkylem, či C_2 až C_4 alkenylem s přímým nebo větveným řetězcem,
- 45 popřípadě jedna methylenová skupina v alkylenovém substituentu tvořícím cyklus může být nahrazena karbonylovou skupinou a uhlíkový atom ve vedlejší poloze cyklu substituován další methylenovou skupinou, anebo nahrazena atomem kyslíku nebo síry, přičemž pokud se jedná o atom síry, tento může být dále funkcionalizován atomem kyslíku;
- 50
- 55

nebo mohou být vodíkové atomy jedné methylenové skupiny v alkylenovém substituentu tvořícím cyklus nahrazeny skupinou $-\text{O}-\text{CH}_2-$, takže vytvoří oxiranový kruh,

- 5 d) skupina $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}(\text{CH}_3)-$, potom společně s prvním uhlíkem alkylenové skupiny tvořené R^4 a R^5 , kde R^4 a R^5 znamenají alkylenový substituent $-(\text{CH}_m)_n-$, kde n je 3, m je 2, vytváří pětičlenný nasycený, methylovaný heterocyklus;

a enantiomery sloučenin podle obecného vzorce I,

10

s výhradou, že z obecného vzorce I jsou vyloučeny sloučeniny, kde R^1 je $\text{HO}_2\text{C}-\text{R}^6\text{CR}^7-\text{R}^8-$, R^6 je $-(\text{CH}_2)_2-$, R^7 je atom kyslíku, R^8 je atom kyslíku a zároveň R^3 je methyl, R^4 a R^5 jsou společně skupina $-(\text{CH}_2)_3-$, vytvářející s původními uhlíkovými atomy tetradekahydrofenantrenového skeletu v poloze 7 a 8 nasycený pětičlenný cyklus; mající absolutní konfiguraci 3R,5S,8S,9S,10S,13S,14S.

15

2. Amfifilní sloučeniny s tetradekahydrofenantrenovým skeletem obecného vzorce I podle nároku 1, jimiž jsou:

20 pyridinium (2R,4aS,4bS,8aR,10aR)-4a-methyltetradekahydrofenantren-2-yl-sulfát (8),

pyridinium (2R,4aS,4bS,7S,8S,8aS,10aR)-7-(methoxymethyl)-4a,7,8-trimethyltetradekahydrofenantren-2-yl-sulfát (18),

25 4-(((2R,4aS,4bS,7S,8aS,10aR)-7-(methoxymethyl)-4a,7,8-trimethyltetradekahydrofenantren-2-yl)oxy)-4-oxobutanová kyselina (19),

pyridinium (2R,4aS,7S,8S,10aR)-7-(methoxykarbonyl)-4a,7,8-trimethyltetradekahydrofenantren-2-yl-sulfát (22),

30

4-(((2R,4aS,4bS,7R,8aS,10aR)-4a,7-dimethyltetradekahydrofenantren-2-yl)oxy)-4-oxobutanová kyselina (34),

pyridinium (2R,4aS,4bS,7R,8aS,10aR)-4a,7-dimethyltetradekahydrofenantren-2-yl-sulfát (35),

35

methyl (2S,4aS,4bS,7R,8aR,10aS)-2,4b-dimethyl-7-(sulfooxy)tetradekahydrofenantren-2-karboxylát (40),

40 pyridinium (3R,5R,8S,9S,10S,13S,14S)-10,13-dimethylhexadekahydro-1H-cyklopenta[a]fenantren-3-yl-sulfát (49),

2-(((3R,5R,8S,9S,10S,13S,14S)-10,13-dimethylhexadekahydro-1H-cyklopenta[a]fenantren-3-yl)oxy)-2-oxoethanová kyselina (50),

45 2-(((3R,5R,8S,9S,10S,13S,14S)-10,13-dimethylhexadekahydro-1H-cyklopenta[a]fenantren-3-yl)oxy)-2-oxopropanová kyselina (51),

2-(((3R,5R,10S,13S,14S)-10,13-dimethylhexadekahydro-1H-cyklopenta[a]fenantren-3-yl)amino)-2-oxooctová kyselina (59),

50

((3R,5R,8S,9S,10S,13S,14S)-10,13-dimethylhexadekahydro-1H-cyklopenta[a]fenantren-3-yl)amino)-3-oxopropanová kyselina (61),

55 4-(((3R,5R,8S,9S,10S,13S,14S)-10,13-dimethylhexadekahydro-1H-cyklopenta[a]fenantren-3-yl)oxy)-N,N,N-trimethyl-4-oxobutan-1-amonium chlorid (62),

- 4-(((3*R*,5*R*,8*R*,9*S*,10*S*,13*R*,14*S*)-10,13-dimethyl-2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15-tetradekahydro-1*H*-cyklopenta[*a*]fenantren-3-yl)oxy)-4-oxobutanová kyselina (64),
- 5 3-(((3*R*,5*R*,8*R*,9*S*,10*S*,13*R*,14*S*)-10,13-dimethyl-2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15-tetradekahydro-1*H*-cyklopenta[*a*]fenantren-3-yl)oxy)-3-oxopropanová kyselina (65),
- 3-(((3*R*,5*R*,8*R*,10*S*,13*S*,14*S*)-10,13-dimethyl-17-methylenhexadekahydro-1*H*-cyklopenta[*a*]fenantren-3-yl)oxy)-3-oxopropanová kyselina (67),
- 10 4-(((3*R*,5*R*,8*R*,9*S*,10*S*,13*S*,14*S*)-10,13-dimethyl-17-methylenhexahydro-1*H*-cyklopenta[*a*]fenantren-3-yl)oxy)-4-oxobutanová kyselina (68),
- 4-(((3*R*,5*R*,8*R*,9*S*,10*S*,13*S*,14*S*)-10,13-dimethyl-17-methylenhexadekahydro-1*H*-cyklopenta[*a*]fenantren-3-yl)oxy)-4-oxopentanová kyselina (69),
- 15 2-((3*R*,5*R*,8*R*,9*S*,10*S*,13*S*,14*S*)-10,13-dimethyl-17-oxohexadekahydro-1*H*-cyklopenta[*a*]fenantren-3-yl) octová kyselina (74),
- 2-(((3*R*,5*R*,8*R*,9*S*,10*S*,13*S*,14*S*)-10,13-dimethyl-17-methylenhexadekahydro-1*H*-cyklopenta[*a*]fenantren-3-yl)oxy)-*N,N,N*-trimethyl-2-oxoethan-1-ammonium chlorid (76),
- 20 3-(((3*R*,5*R*,8*R*,9*S*,10*S*,13*S*,14*S*,*Z*)-17-ethyliden-10,13-dimethylhexadekahydro-1*H*-cyklopenta[*a*]fenantren-3-yl)oxy)-3-oxopropanová kyselina (83),
- 25 5-(((3*R*,5*R*,8*R*,9*S*,10*S*,13*S*,14*S*,*Z*)-17-ethyliden-10,13-dimethylhexadekahydro-1*H*-cyklopenta[*a*]fenantren-3-yl)oxy)-5-oxopentanová kyselina (85),
- 3-(((3*R*,5*R*,8*R*,9*S*,10*S*,13*S*,14*S*,17*R*)-10,13-dimethyl-17-(prop-1-en-2-yl)hexadekahydro-1*H*-cyklopenta[*a*]fenantren-3-yl)oxy)-3-oxopropanová kyselina (88),
- 30 pyridinium (3*R*,5*R*,8*R*,9*S*,10*S*,13*S*,14*S*,17*S*)-17-jodo-10,13-dimethylhexadekahydro-1*H*-cyklopenta[*a*]fenantren-3-yl-sulfát (93),
- 35 pyridinium (3*R*,5*R*,8*R*,9*S*,10*S*,13*S*,14*S*)-17,17-difluor-10,13-dimethylhexadekahydro-1*H*-cyklopenta[*a*]fenantren-3-yl-sulfát (95),
- pyridinium (3*R*,5*R*,8*R*,9*S*,10*S*,13*S*,14*S*,17*S*)-10,13-dimethylhexadekahydrospiro[cyklopenta[*a*]fenantren-17,2'-oxiran]-3-yl-sulfát (97),
- 40 pyridinium (2*R*,4*aS*,4*bS*,6*aS*,10*bS*,6*aS*,12*aR*)-4*a*,6*a*-dimethyloktadekahydrochrysen-2-yl-sulfát (101),
- (4*S*)-4-amino-5-(((2*R*,4*aS*,4*bS*,6*aS*,10*bS*,12*aR*)-4*a*,6*a*-dimethyloktadekahydrochrysen-2-yl)oxy)-5-oxopentanová kyselina (106),
- 45 pyridinium (3*R*,5*R*,8*S*,9*S*,10*S*,13*R*,14*S*)-10,13-dimethyl-16-methylenhexadekahydro-1*H*-cyklopenta[*a*]fenantren-3-yl-sulfát (114),
- 50 pyridinium (3*R*,5*R*,8*R*,9*S*,10*S*,13*S*,14*S*)-10,13-dimethyl-17-methylenhexadekahydro-1*H*-cyklopenta[*a*]fenantren-3-yl-sulfát (116),
- pyridinium (3*R*,5*R*,8*S*,9*S*,10*S*,13*R*,14*S*,17*S*)-10,13,17-trimethylhexadekahydro-1*H*-cyklopenta[*a*]fenantren-3-yl-sulfát (117),
- 55

- pyridinium (3*R*,5*R*,8*S*,9*S*,10*S*,13*S*,14*R*,17*R*)-10,17-dimethylhexadekahydro-1*H*-cyklopenta[*a*]-fenantren-3-yl-sulfát (118),
- 5 pyridinium (3*R*,5*R*,8*S*,9*S*,10*S*,13*R*,14*R*,17*S*)-10,17-dimethylhexadekahydro-1*H*-cyklopenta[*a*]-fenantren-3-yl-sulfát (119),
- pyridinium (3*R*,5*R*,8*S*,9*S*,10*S*,13*R*,14*S*,17*S*)-17-ethyl-10,13-dimethylhexadekahydro-1*H*-cyklopenta[*a*]fenantren-3-yl-sulfát (120),
- 10 pyridinium (3*R*,5*R*,8*R*,9*S*,10*S*,13*S*,14*S*,17*R*)-10,13-dimethyl-17-(prop-1-en-2-yl)hexadekahydro-1*H*-cyklopenta[*a*]fenantren-3-yl-sulfát (121),
- pyridinium (3*R*,5*R*,8*R*,9*S*,10*S*,13*R*,14*S*,17*R*)-17-isopropyl-10,13-dimethylhexadekahydro-1*H*-cyklopenta[*a*]fenantren-3-yl-sulfát (122),
- 15 pyridinium (3*R*,5*R*,8*R*,9*S*,10*S*,13*R*,14*S*,17*R*)-17-((*R*)-sec-butyl)-10,13-dimethylhexadekahydro-1*H*-cyklopenta[*a*]fenantren-3-yl-sulfát (123),
- pyridinium (3*S*,3*aS*,5*bR*,7*aR*,9*R*,11*aS*,11*bS*,13*aR*)-3,11a-dimethylhexadekahydro-1*H*,3*H*-nafto[2',1':4,5]indeno[1,7*a-c*]furan-9-yl-sulfát (124),
- 20 pyridinium (3*R*,5*R*,8*R*,9*R*,10*S*,13*S*,14*S*)-13-methylhexadekahydro-1*H*-cyklopenta[*a*]fenantren-3-yl-sulfát (126),
- pyridinium (3*R*,5*S*,8*R*,9*R*,10*S*,13*S*,14*S*)-10,13-dimethylhexadekahydro-1*H*-cyklopenta[*a*]fenantren-3-yl-sulfát (127),
- 25 pyridinium (2*S*,4*aR*,4*bR*,8*aS*,10*aS*)-4a-methyltetradekahydrofenantren-2-yl-sulfát (128),
- 30 (4*S*)-4-amino-5-(((3*R*,5*R*,8*S*,9*S*,10*S*,13*S*,14*S*)-10,13-dimethylhexadekahydro-1*H*-cyklopenta[*a*]fenantren-3-yl)oxy)-5-oxopentanová kyselina (130).

3. Amfifilní sloučeniny s tetradekahydrofenantrenovým skeletem obecného vzorce I podle nároku 1 nebo podle nároku 2, pro použití jako léčivo.

35

4. Amfifilní sloučeniny s tetradekahydrofenantrenovým skeletem obecného vzorce I podle nároku 1 nebo podle nároku 2, pro použití pro léčení neuropsychiatrických poruch souvisejících s nerovnováhami glutamátergního neuropřenaševého systému, jako jsou ischemické poškození centrální nervové soustavy, neurodegenerativní změny a poruchy centrální nervové soustavy, afektivní poruchy, deprese, post-traumatická stresová porucha a nemoci související se stresem, 40 anxieta, schizofrenie a psychotické poruchy, bolest, závislosti, roztroušená skleróza, epilepsie, gliomy.

5. Farmaceutický prostředek pro humánní i veterinární použití, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, 45 že obsahuje jako aktivní složku amfifilní sloučeninu s tetradekahydrofenantrenovým skeletem obecného vzorce I podle nároku 1, nebo sloučeninu podle nároku 2.

50

6. Farmaceutický prostředek podle nároku 5, pro použití k léčení neuropsychiatrických poruch souvisejících s nerovnováhami glutamátergního neuropřenaševého systému, jako jsou ischemické poškození centrální nervové soustavy, neurodegenerativní změny a poruchy centrální nervové soustavy, afektivní poruchy, deprese, post-traumatická stresová porucha a nemoci související se stresem, anxieta, schizofrenie a psychotické poruchy, bolest, závislosti, roztroušená skleróza, epilepsie, gliomy.

7. Použití amfifilních sloučenin s tetradekahydrofenantrenovým skeletem obecného vzorce I podle nároku 1 nebo podle nároku 2, pro výrobu veterinárního a humánního farmaceutického přípravku pro léčení neuropsychiatrických poruch souvisejících s dysbalancemi glutamátergního neuropřenašečového systému, jako jsou ischemické poškození centrální nervové soustavy, neurodegenerativní změny a poruchy centrální nervové soustavy, afektivní poruchy, deprese, posttraumatická stresová porucha a nemoci související se stresem, anxieta, schizofrenie a psychotické poruchy, bolest, závislosti, roztroušená skleróza, epilepsie, gliomy.
8. Použití amfifilních sloučenin s tetradekahydrofenantrenovým skeletem majících obecný vzorec I podle nároku 1 nebo podle nároku 2, pro výrobu standardů neuroprotektiv, antidepressiv, anxiolytik, stabilizátorů nálad, hypnotiv, sedativ, analgetik, anestetik, antipsychotik, prokognitiv a neuroleptik, případně analytických standardů používaných v experimentálním výzkumu a analytické chemii či jako sloučenin obsažených v potravinových doplňcích či kosmetických přípravcích určených pro zlepšování reakcí jednotlivých částí organismu na zvýšený stres zejména oxidativní, nutriční a způsobený volnými radikály, případně na stárnutí.

20

Konec dokumentu
