

# PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

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

(21) Číslo dokumentu:

## 2019-216

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.:

*C07J 41/00* (2006.01)  
*C07J 43/00* (2006.01)  
*A61K 31/58* (2006.01)  
*A61P 25/08* (2006.01)  
*A61P 25/18* (2006.01)  
*A61P 25/22* (2006.01)  
*A61P 25/24* (2006.01)  
*A61P 25/28* (2006.01)

(19)  
ČESKÁ  
REPUBLIKA



ÚŘAD  
PRŮMYSLOVÉHO  
VLASTNICTVÍ

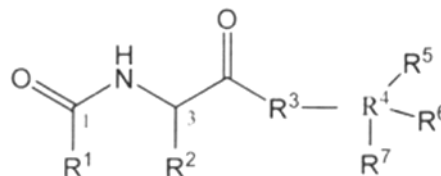
(22) Přihlášeno: **05.04.2019**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **14.10.2020**  
(Věstník č. 42/2020)

(71) Přihlašovatel:  
Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, v. v.  
i., Praha 6, Dejvice, CZ  
Fyziologický ústav AV ČR, v.v.i., Praha 4, Krč, CZ

(72) Původce:  
RNDr. Eva Kudová, Ph.D., Praha 4, CZ  
RNDr. Hana Chodounská, CSc., Praha 6, CZ  
prof. MUDr. Pavel Mareš, DrSc., Praha 10,  
Kolovraty, CZ  
RNDr. Karel Valeš, Ph.D., Praha 5, Zbraslav, CZ

(74) Zástupce:  
RNDr. Ladislava Součková, CSc., Flemingovo  
náměstí 542/2, 160 00 Praha 6, Dejvice



(54) Název přihlášky vynálezu:  
**3α5β-Neuroaktivní steroidy pro léčbu  
epilepsie a záchvatových onemocnění**

(57) Anotace:  
3α5β-steroidní sloučeniny vzorce (I), které vykazují významný antikonvulzivní účinek. Při dávkách 1,5 a 10 mg/kg, bylo v modelu epilepsie u potkanů popsáno významné potlačení konvulzivní aktivity v mozku i záchvatů indukovaných elektrickou stimulací 6 Hz. V modelu pentylenetetrazolem indukovaných záchvatů u potkanů došlo v dávce 10 mg/kg k úplné blokaci záchvatů u mládřat a významnému snížení incidence a latence generalizovaných tonicko-klonických záchvatů u dospělých jedinců. V 6Hz-modelu epilepsie dávka 10 mg/kg téměř úplně blokovala výskyt záchvatů po stimulaci 60 mA. Nárokované řešení umožňuje vytvoření nového, bezpečného a vysoce účinného léčivého přípravku pro léčbu epilepsie.

### 3 $\alpha$ 5 $\beta$ -Neuroaktivní steroidy pro léčbu epilepsie a záchvatových onemocnění

#### Oblast techniky

5

Předkládaný vynález je z oboru farmacie a farmakologie. Předmětem je soubor sloučenin s prokázaným antikonvulzivním účinkem v animálních modelech epileptických záchvatů, chránících tak tkáň centrálního nervového systému (CNS).

10

#### Dosavadní stav techniky

Neurosteroidy patří do rodiny látek syntetizovaných z cholesterolu *de novo* v mozku. Jejich základní charakteristikou je schopnost přímo ovlivňovat řadu transmembránových neurotransmiterových receptorů. Ze strukturního hlediska patří mezi důležité faktory vztahu mezi chemickou strukturou a biologickou aktivitou geometrie mezi kruhem A a B (stereochemie v poloze C-5), typ substituentu v poloze C-3 uspořádání postranního řetězce na C-17. Dalším důležitým strukturním faktorem je lipofilicita molekuly (J. Med. Chem. 2015, 58, 5950), kterou je možno synteticky modifikovat. Mezi nejvíce prozkoumané neurosteroidy patří allopregnanolon (20-oxo-5 $\alpha$ -pregnan-3 $\alpha$ -ol, ALLO), dehydroepiandrosteron (17-oxo-androst-5-en-3 $\beta$ -ol, DHEA), pregnenolon (20-oxo-pregn-5-en-3 $\beta$ -ol, PREG) a progesteron (pregn-4-ene-3,20-dione, PROG). Syntetické analogy endogenních neurosteroidů jsou tzv. neuroaktivní steroidy. Neuroaktivní steroidy představují molekuly s terapeuticky zajímavými vlastnostmi. Jsou to povětšinou allosterické modulátory receptorů  $\gamma$ -aminobutyrové kyseliny (GABA<sub>A</sub>) a N-methyl-D-asparagové kyseliny (NMDA), tedy receptory zodpovědné za excitačně-inhibiční rovnováhu CNS. Neurosteroidy i jejich syntetické analogy (neuroaktivní steroidy) mají řadu funkcí v centrální nervové soustavě i periférii od vývoje až po řízení komplexního chování. Současné studie ukazují, že jejich účinek může postrádat psychotomimetické i kognitivní vedlejší účinky (J. Neurosci. 2016, 36, 2161). Neuroaktivní steroidy mají nesporný terapeutický potenciál prokázaný při experimentech *in vitro* i *in vivo*. Neuroprotektivní účinek neurosteroidů či neuroaktivních steroidů je pravděpodobně zprostředkován na negenomové úrovni, ale zahrnuje i regulaci exprese proapoptotických a antiapoptotických faktorů, zapojení signalizačních kaskád v buňce, neurotransmisí, či oxidativní a zánětlivé procesy (Front. Endocrinol. 2011, 2, 50).

Bylo také prokázano, že neuroaktivní steroidy mají antikonvulzivní vlastnosti v animálních modelech. Aplikace ALLO a PROG měla signifikantní účinek v animálních modelech epileptických záchvatů, vyvolaných aplikací pentylentetrazolu (Brain Res. 2000, 881, 98), pilokarpinu (Neuropharmacology 1996, 35, 1049), NMDA (J. Pharmacol. Exp. Ther. 1997, 282, 543) a kyseliny kainové (Psychoneuro-endocrinology 2000, 25, 407). Jelikož ALLO působí potenciačně na GABA<sub>A</sub> receptory, jeho podání v animálních modelech epilepsie vede ke snížení četnosti záchvatů, mortality a buněčné smrti (Pol. J. Pharmacol. 1997, 49, 411). Ganaxolon, syntetický derivát ALLO, dokonce zabránil vzniku záchvatů u hlodavců (Epilepsia 2010, 51, 84.). Některé syntetické steroidy, jako je ganaxolon, alfaxalon, alfadolon, hydroxydion a minaxolon, vstoupily do klinických studií jako potenciální sedativa a anestetika. Zatím nejvíce úspěšným syntetickým steroidem je ganaxolon, C-3 methylovaný derivát ALLO, vyvinutý firmou Marinus Pharmaceutical. Jedná se o CNS selektivní pozitivní allosterický modulátor GABA<sub>A</sub> receptorů s prokázaným antiepileptickým účinkem v mnoha animálních modelech. V klinických studiích byl dobře tolerován dospělými i dětmi.

Epilepsie je charakterizována více než 25 syndromy a četnými typy záchvatů, které se mohou lišit jak v závažnosti, tak odpovědi na léčbu (Mental Health Clinician 2017, 7, 235). Vzhledem k různorodosti symptomatiky epilepsie, osoby s touto diagnózou mohou být zatíženy i psychiatrickými symptomy, například kognitivními a behaviorálními změnami chování, které často komplikují vlastní léčbu epilepsie (Expert Opin. Drug Saf. 2011, 10, 913). Mezi běžné psychické komorbidity spojené s epilepsií patří deprese, úzkost, poruchy pozornosti a psychózy v

prevalenci od 20% do 30% (Expert Opin. Drug Saf. 2011, 10, 913). Deprese představují jednu z nejčastějších psychiatrických komorbidit u pacientů s epilepsií s prevalencí od 20% do 55%, avšak u některých populací může prevalence dosahovat až 80% (Expert Opin. Drug Saf. 2011, 10, 913). Podle řady autorů jsou úzkostné poruchy hned po depresivní poruše druhou nejčastější psychiatrickou komorbiditou u pacientů s epilepsií, jiní uvádějí dokonce častější výskyt poruch úzkostných. Jelikož bylo opakovaně prokázáno, že existuje signifikantní vztah mezi výskytem úzkostných poruch a kvalitou života pacientů s epilepsií, vhodná terapie úzkostí a úzkostných poruch v epileptologické praxi, by tedy měla být jednou z priorit péče o tyto jedince. Tento přístup byl již experimentálně ověřen i pro neurosteroidy. Existuje několik animálních a lidských studií, které naznačují, že PROG, DHEA i PREG se podílejí na mechanismu účinku antidepresiv (Neuroscience 2011, 191, 55)

Neuroprotektivní účinek steroidních derivátů se substituentem schopným tvořit ion v poloze C-3 nárokují patenty US 8575376, EP 2435463 a US 15/506318. Tyto dokumenty nárokují pregnanové deriváty (polární acetylový substituent v poloze C-20), respektive androstanové deriváty (nepolární substituent v poloze C-17) substituované v poloze C-3 ionizovatelným substituentem. Neuroprotektivní účinek těchto nabitých derivátů je přímo spjat se specifickou kombinací strukturálních rysů v poloze C-3 (3 $\alpha$ -nabitý substituent) a C-5 $\beta$ , a se schopností těchto látek inhibovat ionotropní glutamátové NMDA receptory. V dosud uveřejněných člancích a patentové literatuře bylo zároveň vždy uváděno, že inhibice NMDA receptorů, potažmo neuroprotektivní účinek, jsou podmíněny nabitým C-3 substituentem a nenabitá analoga postrádají biologický efekt na modulaci NMDA receptorů (J. Pharmacol. Exp. Ther. 2000, 293, 747; Mol. Pharmacol. 1997, 52, 1113). Deriváty nárokované ve zde předkládané přihlášce vynálezu mají cyklický či acyklický C-3 substituent, který náboj nese.

Současná odborná a patentová literatura (US 9,527,881; J. Med. Chem. 2009, 52, 6012) uvádí neuroprotektivní účinek C-3 substituovaných steroidních analogů PROG nesoucí prolinový či acyklický substituent sNH<sub>2</sub> skupinou. Tyto látky jsou zdánlivě strukturálně podobné látkám nárokováným ve zde přikládané přihlášce. Konkrétně např. 3 $\beta$ -L-proline-progesterone-HCl (PI-33) výše uvedeného patentu. Tyto látky jsou popsány jakožto steroidní analogy pro léčbu a prevenci neurodegenerace u pacientů po poranění centrální nervové soustavy. Látka PI-33 byla resyntetizována a testována i v modelu pentylentetrazolu-indukovaných křečí. Po podání 25denním zvířatům v dávce 1 a 10 mg/kg však nezměnila výskyt generalizovaných tonicko-klonických záchvatů. Naopak, všechna zvířata ve skupině pro 1 i 10 mg/kg tento typ záchvatu vykazala. Z výše uvedeného vyplývá, že antikonvulzivní účinek látek nesoucí cyklický či acyklický substituent s NH či NH<sub>2</sub> skupinou nelze obecně predikovat a že substituce či modifikace na C-3, 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.

Neuroprotektivní účinek steroidních derivátů nárokuje také přihláška US 20170246188 A1 (Method of treating organophosphate intoxication) s předpokládaným antikonvulzivním účinkem. Nároky této přihlášky lze považovat za spekulativní, neboť nárokované neurosteroidní látky jsou definovány jako pregnany, androstany, 19-norandrostany a norpregnany substituované skupinami obecného vzorce, který nedefinuje žádný typ ani pozici substituentu na steroidním skeletu. Takto definovaný obecný vzorec pokrývá obecně stovky až tisíce endogenních či syntetických látek. Jako příklad můžeme jmenovat žlučové kyseliny, které jsou složkou žluči a hrají významnou roli při trávení lipidů, v metabolismu cholesterolu a jeho odstraňování z organismu nebo endogenní glukokortikoidní hormon tetrahydrokortikosteron. Výše uvedené náhodně jmenované látky sice splňují definici obecného vzorce, nicméně odborník v oboru je jednoznačně schopen předem odhadnout, že tyto látky jsou v léčbě intoxikace organofosfátové intoxikace s následky definovanými jakožto tzv. symptomy cholinergní krize neúčinné. V rámci syntézy námi nárokováných látek byl připraven i (S)-5-oxopyrrolidin-2-karboxylátový analog allopregnanolonu (3 $\alpha$ 5 $\alpha$ ), jako látka strukturálně podobná nárokováným látkám z přihlášky US 20170246188 A1, potažmo uváděnému ganaxalonu, splňující i strukturální kritéria nárokované v

této přihlášce. Její účinek byl testován v modelu pentylentetrazolu-indukovaných křečí u laboratorních potkanů. Bylo zjištěno, že allopregnanolon (S)-5-oxopyrrolidin-2-karboxylát vykazuje velmi slabou antikonvulsivní účinnost v obou věkových skupinách u 12ti i 25denních potkanů proti generalizovaným tonicko-klonickým křečím, vyvolaným podkožní aplikací pentylentetrazolu (PTZ) v enormní dávce 100 mg/kg. Tyto výsledky opět jednoznačně ukazují, že nelze obecně predikovat terapeutická účinek neurosteroidů a že substituce či modifikace na C-3, případně D-kruhu v kombinaci s velikostí a složením substituentu v poloze C-3 je vždy zcela unikátní, není možné ji předem předvídat a strukturu navrhnout aditivním přístupem.

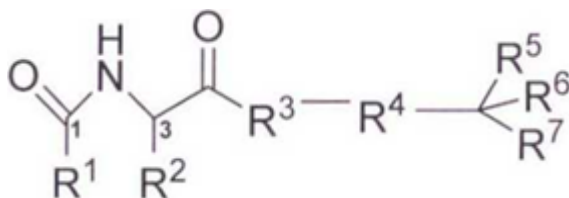
U sloučenin podle předkládaného vynálezu byla překvapivě zjištěna výrazně zvýšená účinnost u jedinců v P12, tedy v období, které odpovídá novorozeneckému a časné kojeneckému období u dětí. Předkládané sloučeniny lze tedy hodnotit jako mající specifickou účinnost pro epilepsie a epileptické syndromy s věkovou vazbou. Epilepsie a epileptické syndromy během vývoje vykazují výrazně odlišné biologické parametry v porovnání se situací u dospělých. Zvýšenou záchvatovou pohotovost a tím i snadnější vznik epileptických záchvatů způsobuje fakt, že od narození až nejméně do prepubertálního období probíhá rozsáhlý postnatální vývoj mozku. U raných vývojových stádií nejsou plně vyvinuty a stabilizovány přirozené inhibiční mechanismy a probíhá intenzivní vývoj neuronálních sítí se změnami neuromodulátorů a neurotransmiterů. Epilepsie se v raných vývojových stádiích na rozdíl od epilepsie u dospělých rozvíjí na neurobiologickém substrátu měnícího se, vyvíjejícího mozku. V pediatrické epileptologii se vyskytují specifické epileptické syndromy s věkovou vazbou, které se objevují pouze v dětství a adolescenci. V dětství i mládí se ovšem lze rovněž setkat i se stejnými typy epilepsií jako v dospělosti (syndromy bez věkové vazby). Výsledkem je daleko širší spektrum možných epilepsií v dětství než v dospělosti.

Správné diagnostika má v epilepsii klíčový význam pro vhodně zvolenou farmakoterapii. Řada věkově vázaných epilepsií není senzitivní vůči klinicky používaným léčivům, čímž je zdůrazněna medicínská potřeba vývoje věkově specifických antiepileptik, které představují specifickou farmakologickou kategorii. Typ epilepsie je často rovněž determinující pro prognózu onemocnění i celkový vývoj dítěte. Existují syndromy vysloveně benigní, které jen málo ovlivňují behaviorální projevy a neuropsychologické parametry. Na druhé straně se v časném dětství vyskytují závažné syndromy spojené obvykle s encefalopatií, které jsou právem označovány za katastrofické, protože devastují vývoj jedince, vedou ke kognitivnímu deficitu až zvratu v psychomotorickém vývoji a je u nich velmi malá šance na úplnou kompenzaci. Právě věkově specifická účinnost zde předkládaných látek umožňuje jejich využití v těchto specifických diagnózách, včetně vzácných chorob. Využití předkládaných látek bude zvláště důležité v případech současného výskytu psychiatrických a neurovývojových syndromů a komorbidit během vývoje i dospělosti. Zde předkládané sloučeniny vykazují slibné výsledky už v animálních modelech psychiatrických diagnóz, neboť obdobné stavy vykazují i mláďata laboratorního potkana.

U známých neuroaktivních steroidů se strukturou relativně blízkou zde předkládaným sloučeninám nebyla věkově specifická účinnost dosud pozorována. Z toho je možné vyvodit, že nárokováné sloučeniny jsou svým farmakologickým profilem specifické a unikátní. Jejich biologické účinky nelze dovodit na základě veřejně publikovaných znalostí. Zde uvedené údaje jsou výsledkem originální vědecké a vynálezecké činnosti.

#### Podstata vynálezu

Předmětem vynálezu jsou sloučeniny obecného vzorce I,



(I)

kde

5

$R^1$  je methyl a potom  $R^2$  jsou buď dva vodíkové atomy, nebo jeden vodíkový atom spolu s  $C_1$ - $C_4$  alkylem s přímým nebo rozvětveným uhlíkovým řetězcem,

nebo

10

$R^1$  a  $R^2$  dohromady tvoří skupinu  $-(CH_2)_n-$ , kde  $n=2$  nebo  $3$ , která s původními uhlíkovými atomy  $1$  a  $3$  v obecném vzorci  $I$  vytváří pěti nebo šesti členný cyklus,

$R^3$  je skupina  $-O-(CH_2)_n-O_m-$ , kde  $n = 0-2$  a  $m = 0$  nebo  $1$ ,

15

$R^4$  je  $3\alpha,5\beta$ -androstan  $3,11,17,17$ -tetrayl,

$R^5$  je vodíkový atom nebo hydroxylová skupina,

20

$R^6$  je atom vodíku a potom  $R^7$  je zvolen ze skupiny, zahrnující atom vodíku, acetylovou skupinu, kyano skupinu,  $C_1$ - $C_2$  kyanoalkylovou skupinu, 1,1-difluoroethylovou skupinu a přímý nebo větvený  $C_1$ - $C_4$  alkyl,

25

nebo  $R^6$  a  $R^7$  společně představují strukturu, zvolenou ze skupiny, zahrnující  $C_1$ - $C_2$  alkyliden, kyanomethylenovou skupinu, atom kyslíku, dva atomy fluoru.

Definice skupin jsou použity tak, jak jsou obecně chápány odborníky v oboru.

30

Alkyl je radikál lineárního nebo rozvětveného  $C_1$  až  $C_4$ , s výhodou  $C_1$  až  $C_3$ , nejvýhodněji  $C_1$  až  $C_2$  nasyceného alifatického uhlovodíkového řetězce, vytvořený odštěpením jednoho vodíkového atomu. Alkylen je rovný, rozvětvený nebo cyklický, s výhodou rovný nebo rozvětvený, dvojvazný alifatický uhlovodíkový řetězec.

Acetylovou skupinou se rozumí skupina  $-CO-CH_3$ .

35

Kyanovou skupinou se rozumí skupina  $-C\equiv N$ .

Kyanoalkylovou skupinou se rozumí skupina, sestávající z alkylové skupiny podle výše uvedené definice, na niž je za odštěpení jednoho vodíkového atomu navázána skupina  $-C\equiv N$ .

40

Kyanomethylenovou skupinou se rozumí skupina  $\equiv CH-C\equiv N$ .

1,1-Difluoroethylovou skupinou se rozumí skupina  $-CF_2-CH_3$ .

45

$C_1$ - $C_2$  Alkyliden je dvojvazný alifatický uhlovodíkový řetězec, obsahující dvojnou vazbu ( $=CH_2$  nebo  $=CH-CH_3$ ).

Výraz „hydroxyl“ označuje skupinu  $-OH$ .

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

50

- (3R,5R,8R,9S,10S,13S,14S,17S)-17-Acetyl-10,13-dimethylhexadecahydro-1H-cyklopenta[a]fenantren-3-yl (S)-5-oxopyrrolidin-2-karboxylát (1),
- 5 (3R,5R,8R,9S,10S,13S,14S,17S)-17-Acetyl-10,13-dimethylhexadecahydro-1H-cyklopenta[a]fenantren-3-yl (R)-6-oxopiperidin-2-karboxylát (2),
- (3R,5R,8R,9S,10S,13S,14S,17S)-17-Kyano-10,13-dimethylhexadecahydro-1H-cyklopenta[a]fenantren-3-yl (R)-5-oxopyrrolidin-2-karboxylát (3),
- 10 (3R,5R,8R,9S,10S,13S,14S,17S)-17-Acetyl-11-hydroxy-10,13-dimethylhexadecahydro-1H-cyklopenta[a]fenantren-3-yl (S)-5-oxopyrrolidin-2-karboxylát (4),
- (3R,5R,8R,9S,10S,13S,14S)-10,13-Dimethylhexadecahydro-1H-cyklopenta[a]fenantren-3-yl (S)-5-oxopyrrolidin-2-karboxylát (5),
- 15 (3R,5R,8R,9S,10S,13S,14S)-10,13-Dimethyl-17-oxohexadecahydro-1H-cyklopenta[a]fenantren-3-yl (R)-5-oxopyrrolidin-2-karboxylát (6),
- (3R,5R,8R,9S,10S,13S,14S)-10,13-Dimethylhexadecahydro-1H-cyklopenta[a]fenantren-3-yl (R)-6-oxopiperidin-2-karboxylát (7),
- 20 (3R,5R,8R,9S,10S,13S,14S,17S)-17-Kyano-10,13-dimethylhexadecahydro-1H-cyklopenta[a]fenantren-3-yl (R)-6-oxopiperidin-2-karboxylát (8),
- 25 (3R,5R,8R,9S,10S,13S,14S,17S)-17-Acetyl-10,13-dimethylhexadecahydro-1H-cyklopenta[a]fenantren-3-yl acetylglycinát (9),
- (3R,5R,8R,9S,10S,13S,14S,17S)-17-acetyl-10,13-dimethylhexadecahydro-1H-cyklopenta[a]fenantren-3-yl acetylleucinát (10),
- 30 (3R,5R,8R,9S,10S,13S,14S,17S)-10,13,17-Trimethylhexadecahydro-1H-cyklopenta[a]fenantren-3-yl (S)-5-oxopyrrolidine-2-karboxylát (II).
- (3R,5R,8R,9S,10S,13S,14S,Z)-17-Ethyliden-10,13-dimethylhexadecahydro-1H-cyklopenta[a]fenantren-3-yl (R)-5-oxopyrrolidin-2-karboxylát (12),
- 35 2-(((3R,5R,8R,9S,10S,13S,14S)-10,13-Dimethylhexadecahydro-1H-cyklopenta[a]fenantren-3-yl)oxy)ethyl (R)-5-oxopyrrolidine-2-karboxylát (13).
- 40 2-(((3R,5R,8R,9S,10S,13S,14S)-10,13-Dimethylhexadecahydro-1H-cyklopenta[a]fenantren-3-yl)oxy)ethyl (S)-6-oxopiperidin-2-karboxylát (14),
- 2-((3R,5R,8R,9S,10S,13S,14S,17S)-17-Acetyl-10,13-dimethylhexadecahydro-1H-cyklopenta[a]fenantren-3-yl)ethyl (R)-5-oxopyrrolidin-2-karboxylát (16),
- 45 2-((3R,5R,8R,9S,10S,13S,14S,17S)-17-Acetyl-10,13-dimethylhexadecahydro-1H-cyklopenta[a]fenantren-3-yl)ethyl (R)-6-oxopiperidine-2-karboxylát (17).

50 Dalším předmětem vynálezu jsou sloučeniny obecného vzorce I a jemu odpovídající výše uvedené konkrétní sloučeniny, pro použití jako léčiva.

55 Význakem vynálezu je použití sloučenin obecného vzorce I a jemu odpovídajících výše uvedených konkrétních sloučenin pro léčení epilepsie či jiných onemocnění spojených s křečmi, jako jsou například záchvaty spojené s hypoxií; záchvaty spojené s traumatickým poškozením mozku; záchvaty spojené s intoxikací; patologické změny způsobené hyperexcitací.

Význakem vynálezu je použití sloučenin obecného vzorce I a jemu odpovídajících výše uvedených konkrétních sloučenin pro léčení stavů, které mohou doprovázet epilepsii, jako jsou afektivní poruchy, deprese, post-traumatické stresové poruchy (PTSD) a nemoci související se stresem, anxieta, schizofrenie a psychotické poruchy, související ischemické poškození CNS, neurodegenerativní změny a poruchy, roztroušená skleróza.

Předmětem vynálezu je rovněž použití sloučenin obecného vzorce I a jemu odpovídajících výše uvedených konkrétních sloučenin pro výrobu veterinárního nebo humánního farmaceutického přípravku pro léčení epilepsie a komorbidit s ní spojených či jiných onemocnění spojených s křečemi, jako jsou například záchvaty spojené s hypoxií; záchvaty spojené s traumatickým poškozením mozku; záchvaty spojené s intoxikací; patologické změny způsobené hyperexcitací.

Předmětem vynálezu je rovněž farmaceutický prostředek pro humánní i veterinární použití, vyznačující se tím, že obsahuje jako aktivní složku sloučeninu obecného vzorce I a/nebo odpovídající výše uvedeným konkrétním sloučeninám.

Předmětem vynálezu je dále výše zmíněný farmaceutický prostředek pro použití k léčení epilepsie a komorbidit s ní spojených či jiných onemocnění spojených s křečemi, jako jsou například záchvaty spojené s hypoxií; záchvaty spojené s traumatickým poškozením mozku; záchvaty spojené s intoxikací; patologické změny způsobené hyperexcitací.

Předmětem vynálezu je dále výše zmíněný farmaceutický prostředek pro použití k léčení stavů, které mohou doprovázet epilepsii, jako jsou afektivní poruchy, deprese, post-traumatické stresové poruchy (PTSD) a nemoci související se stresem, anxieta, schizofrenie a psychotické poruchy, související ischemické poškození CNS, neurodegenerativní změny a poruchy, roztroušená skleróza.

Předmětem vynálezu je také použití sloučenin podle obecného vzorce I pro výrobu 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 vůči onemocněním spojených s křečemi.

### Objasnění výkresů

**Obr. 1.** Antikonvulzivní účinek látek z Příkladu 1, z Příkladu 2 a z Příkladu 3 v modelu PTZ-vyvolaných křečí u ryby dánío pruhované (*Danio rerio*). Antikonvulzivní efekt látek byl studován v dávkách 1, 3 a 5 mg/kg pro látky (A) látka z Příkladu 1, (B) látka z Příkladu 2 a (C) látka z Příkladu 3. Jednotlivé grafy ukazují účinek látek na spontánní lokomoční aktivitu (levý graf), rychlost plavání (prostřední graf), počet otoček při otáčení (specifické nepředvídatelné pohyby, pravý graf).

**Obr. 2.** Antikonvulzivní účinek látek z Příkladu 1, z Příkladu 2 a z Příkladu 3 v modelu PTZ-vyvolaných křečí u ryby dánío pruhované (*Danio rerio*). Antikonvulzivní efekt látek byl studován v dávkách 1, 3 a 5 mg/kg pro látky (A) látka z Příkladu 1, (B) látka z Příkladu 2 a (C) látka z Příkladu 3. Jednotlivé grafy ukazují efekt látek na přirozené chování zebřičky pruhované ve tmě a při osvětlení (tzv. dark/light test).

**Obr. 3.** Antikonvulzivní účinek látky z Příkladu I v modelu PTZ-vyvolaných křečí u 15 a 25denních jedinců laboratorního potkana. Byly použity dávky 1,5 a 10 mg/kg *i.p.* Grafy znázorňují (A) výskyt (osa y; v %) generalizovaných záchvatů kompletních s tonickou fází (GTCS) a nekompletních bez tonické fáze (GCS); (B) latenci (osa y; s) do začátku generalizovaných záchvatů; (C) tíži záchvatů. Na ose x jsou uvedeny dávky. Tíže záchvatů byla stanovena tak, že každému zvířeti bylo přiřazeno skóre (1-5) podle nejzávažnějšího epileptického

projevu. Skóre: 0 - bez projevu; 1 - myoklonické záškuby; 2 - epileptické automatismy; 3 - minimální, klonický záchvat; 4 - nekompletní generalizovaný záchvat (GCS); 5 - kompletní generalizovaný tonicko-klonický záchvat (GTCS). Zkratky: P12 – 12denní zvířata; P25 – 25denní zvířata; \* - signifikantní rozdíl vůči kontrole; 0 nebo 1 – podání látky kompletně zablokovalo vznik záchvatu u všech zvířat, nebo vyjma 1 zvířete.

**Obr. 4.** Antikonvulzivní účinek látky z Příkladu 2 v modelu PTZ-vyvolaných křečí u 15 a 25denních zvířat jedinců laboratorního potkana. Byly použity dávky 1,5 a 10 mg/kg *i.p.* Grafy znázorňují (A) výskyt (osa y; v %) generalizovaných záchvatů kompletních s tonickou fází (GTCS) a nekompletních bez tonické fáze (GCS); (B) latenci (osa y; s) do začátku generalizovaných záchvatů; (C) tíži záchvatů. Na ose x jsou uvedeny dávky. Tíže záchvatů byla stanovena tak, že každému zvířeti bylo přiřazeno skóre (1-5) podle nejzávažnějšího epileptického projevu. Skóre: 0 - bez projevu; 1 - myoklonické záškuby; 2 - epileptické automatismy; 3 - minimální, klonický záchvat; 4 - nekompletní generalizovaný záchvat (GCS); 5 - kompletní generalizovaný tonicko-klonický záchvat (GTCS). Zkratky: P12 – 12denní zvířata; P25 – 25denní zvířata; \* - signifikantní rozdíl vůči kontrole; 0 nebo 1 – podání látky kompletně zablokovalo vznik záchvatu u všech zvířat, nebo vyjma 1 zvířete; nt - netestováno.

**Obr. 5.** Antikonvulzivní účinek látky z Příkladu 3 v modelu PTZ-vyvolaných křečí u 15 a 25denních zvířat jedinců laboratorního potkana. Byly použity dávky 1, 5 a 10 mg/kg *i.p.* Grafy znázorňují (A) výskyt (osa y; v %) generalizovaných záchvatů kompletních s tonickou fází (GTCS) a nekompletních bez tonické fáze (GCS); (B) latenci (osa y; s) do začátku generalizovaných záchvatů; (C) tíži záchvatů. Na ose x jsou uvedeny dávky. Tíže záchvatů byla stanovena tak, že každému zvířeti bylo přiřazeno skóre (1-5) podle nejzávažnějšího epileptického projevu. Skóre: 0 - bez projevu; 1 - myoklonické záškuby; 2 - epileptické automatismy; 3 - minimální, klonický záchvat; 4 - nekompletní generalizovaný záchvat (GCS); 5 - kompletní generalizovaný tonicko-klonický záchvat (GTCS). Zkratky: P12 – 12denní zvířata; P25 – 25denní zvířata; \* - signifikantní rozdíl vůči kontrole; 0 nebo 1 – podání látky kompletně zablokovalo vznik záchvatu u všech zvířat, nebo vyjma 1 zvířete; nt - netestováno.

**Obr. 6.** Antikonvulzivní účinek látky z Příkladu 1 v modelu záchvatů vyvolaných elektrickou stimulací 6 Hz u dospělých zvířat (60denní) laboratorního potkana. Steroidní derivát byl aplikován 20 minut před aplikací PTZ (100 mg/kg, *s.c.*) a byly použity dávky 1,5 a 10 mg/kg *i.p.* Grafy znázorňují (A) výskyt (osa y; v %) generalizovaných záchvatů kompletních s tonickou fází (GTCS) a nekompletních bez tonické fáze (GCS); (B) výskyt (osa y; v %) minimálních klonických záchvatů (C) latenci (osa y; s) do začátku generalizovaných záchvatů; (D) latenci (osa y; s) do začátku minimálních klonických záchvatů; (E) tíži záchvatů. Na ose x jsou uvedeny dávky. Tíže záchvatů byla stanovena tak, že každému zvířeti bylo přiřazeno skóre (1-5) podle nejzávažnějšího epileptického projevu. Skóre: 0 - bez projevu; 1 - myoklonické záškuby; 2 - epileptické automatismy; 3 - minimální, klonický záchvat; 4 - nekompletní generalizovaný záchvat (GCS); 5 - kompletní generalizovaný tonicko-klonický záchvat (GTCS). Zkratky: P12 – 12denní zvířata; P25 – 25denní zvířata; \* - signifikantní rozdíl vůči kontrole; 1 nebo 2 – podání látky kompletně zablokovalo vznik záchvatu u všech zvířat vyjma 1 nebo 2; nt - netestováno.

**Obr. 7.** Antikonvulzivní účinek látky z Příkladu 1 v modelu záchvatů vyvolaných elektrickou stimulací 6 Hz u 15 a 25denních zvířat (samci laboratorního potkana). Na ose x jsou uvedeny intenzity stimulace potřebné pro vyvolání záchvatu (60 a 80 mA u 15-ti denních a 40 a 60 mA u 25denních zvířat). Osy y zobrazují (A) výskyt záchvatů v %, (B) trvání záchvatů v sekundách; (C) tíži záchvatů. Tíže záchvatů byla stanovena tak, že každému zvířeti bylo přiřazeno skóre (1-5) podle nejzávažnějšího epileptického projevu. Skóre: 0 - bez projevu; 1 - myoklonické záškuby; 2 - epileptické automatismy; 3 - minimální, klonický záchvat; 4 - nekompletní generalizovaný záchvat (GCS); 5 - kompletní generalizovaný tonicko-klonický záchvat (GTCS). Zkratky: P15 – 15denní zvířata; P25 – 25denní zvířata; \* - signifikantní rozdíl vůči kontrole.

**Obr. 8.** Antikonvulzivní účinek látky z Příkladu 1 v modelu záchvatů vyvolaných elektrickou



stimulací 6 Hz u dospělých jedinců (P60) (samci laboratorního potkana), který je zobrazen formou box plots (medián s 25-75 %) a odchylkami, reprezentujícími maximální a minimální hodnoty (osa y). Osa x zobrazuje dávky v mg/kg. Symboly v jednotlivých boxech ukazují individuální hodnoty pro jednotlivá zvířata.

5

**Obr. 9.** Histologické poškození, resp. neuroprotektivní vliv látky z Příkladu 1 v dávce 1 mg/kg po provedení NMDA léze infúzí excitotoxického NMDA ( $25 \text{ mmol.l}^{-1}$ ) do dorzálního hippocampu u samců laboratorního potkana. Snímky v panelu (A) zobrazují řezy kontrolních zdravých zvířat, v panelu (B) skupinu zvířat, kterým byly provedeny NMDA léze hipokampu a aplikován (2-hydroxypropyl)- $\beta$ -cyklodextrin (CDX) a v panelu (C) řezy mozku zvířat, kterým byly provedeny NMDA léze hipokampu a 5 minut po provedení NMDA léze aplikována látka z Příkladu 1 v dávce 1 mg/kg.

## 15 Příklady uskutečnění vynálezu

Seznam zkratk:

20	CHCl <sub>3</sub>	chloroform
	CDX	(2-hydroxypropyl)- $\beta$ -cyclodextrin
	DCM	dichlormethan
	DMAP	4-dimethylaminopyridin (IUPAC: <i>N,N</i> -Dimethylpyridin-4-amin)
	DMF	dimethylformamid (IUPAC: <i>N,N</i> -Dimethylformamid)
	DMSO	dimethylsulfoxid
25	EDCI	hydrochlorid 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimidu (EDCI)
	ESI	ionizace elektrosprejem
	HPLC	vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (angl. high-performance liquid chromatography)
	HRMS	hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením
30	IČ	infračervená spektroskopie
	MS	hmotnostní spektroskopie
	NMDA	N-methyl-D-asparagová kyselina
	NMR	nukleární magnetická rezonance
35	PBS	fyzilogický roztok pufrovaný fosfátem (angl. (phosphate buffered saline))

## Syntetické postupy

Reakce, pro které bylo nutné vyloučení vodného prostředí, byly vždy prováděny ve vyžehané aparatuře a pod argonovou atmosférou. Vzorke pro analýzu byly sušeny několik hodin nad oxidem fosforečným při 50 °C a tlaku 100 Pa. Rozpouštědla byla odpařována na vakuové odparce při tlaku 0,25 kPa a teplotě 50 °C. K tenkovrstvé chromatografii (TLC) byly použity desky potažené vrstvou silikagelu (ICN Biochemicals). Pro preparativní sloupcovou chromatografii byl použit silikagel Fluka (60  $\mu\text{m}$ ). Body tání byly měřeny na bodotávku Hund Wetzlar H 600 (Helmut Hund, Německo) a nejsou korigovány. Optická rotace byla měřena polarimetrem Autopol IV (Rudolf Research Analytical, Flanders, USA) při 589,3 nm a teplotě 22 °C. Hodnoty  $[\alpha]_D$  jsou uvedeny v  $[10^{-1} \cdot \text{deg} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{g}^{-1}]$ , koncentrace *c* jako  $[\text{g} \cdot 100 \text{ ml}^{-1}]$ . Infračervená spektra byla měřena na spektrometru Nicolet 6700 (Thermo Scientific, USA), kdy vzorek byl rozpuštěn v chloroformu. NMR spektra byla měřena při 24 °C na spektrometrech Bruker AVANCE III™ 400 MHz. NMR spektra jsou korigována na tetramethylsilan jako vnitřní standard a jsou vypsána v stupnici ppm (části z milionu), interakční konstanty *J* jsou udány v Hz. Multiplicity signálů jsou označeny následovně: s - singlet, d - dublet, t - triplet, q - kvartet, dt - dublet tripletu, qd - kvartet dubletu, m - multiplet. Hmotnostní spektra byla měřena na spektrometru LTQ Advantage Thermo s ESI nebo EI ionizací (10 eV) a to v pozitivním nebo negativním módu.

55

## Obecné postupy

## Obecný postup A

5

Suchý dimethylformamid (DME, 10 ml) byl přidán pod inertní atmosférou ke směsi 3-hydroxy steroidu (1,0 mmol), 4-dimethylaminopyridinu (DM AR, 0,25 mmol), hydrochloridu V-(3-dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylkarbodiimidu (EDCI, 2,7 mmol) a hydroxybenzotriazolu (HOBT, 2,2 mmol), která byla sušena za sníženého tlaku (0,1 hPA) 1 hodinu při teplotě místnosti. Poté  
10 byl přikapán roztok příslušné karboxylové kyseliny (1,5 mmol) v suchém DME (5 ml). Reakční směs byla míchána při teplotě místnosti přes noc. Po odpaření rozpouštědla byl odparek čistěn chromatografií na sloupci silikagelu.

## Obecný postup B

15

Suchý dichlormethan (DCM, 2 ml) byl přidán pod inertní atmosférou ke směsi 3-hydroxy steroidu (1,0 mmol), 4-dimethylaminopyridinu (DMAP, 0,25 mmol) a příslušné karboxylové kyseliny (1,5 mmol). Tato směs byla sušena za sníženého tlaku (0,1 hPA) 1 hodinu při teplotě místnosti. Poté byl pomalu přikapán roztok hydrochloridu 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimidu (EDCI, 2,7 mmol) v suchém DCM (5 ml).  
20

Reakční směs byla míchána při teplotě místnosti přes noc, následně nalita do vody, promyta 5% (obj./obj.) vodným roztokem kyseliny chlorovodíkové, vodným roztokem hydrogenuhličitanu sodného a solankou. Po usušení nad bezvodým Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a odpaření rozpouštědel byl odparek  
25 čistěn chromatografií na sloupci silikagelu.

Příklad 1: (3R,5R,8R,9S,10S,13S,14S,17S)-17-Acetyl-10,13-dimethylhexadekahydro-1H-cyklopenta[a]fenantren-3-yl (S)-5-oxopyrrolidin-2-karboxylát (1)

30 V nadpisu uvedená sloučenina 1 byla připravena dle Obecného postupu A (DMF) z 20-oxo-5β-pregnan-3α-olu (318 mg, 1,0 mmol) za použití *L*-pyroglutamové kyseliny (194 mg, 1,5 mmol). Chromatografií na silikagelu (5% obj./obj. aceton v CHCE) byla získána výsledná sloučenina 1 (370 mg, 89% výtěžek): bt 167–168 °C (chloroform, diethyl ether), [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> +105,6 (c 0,3, CHCl<sub>3</sub>):  
35 <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 0,60 (3H, s, H-18); 0,94 (3H, s, H-19); 2,11 (3H, s, H-21); 4,16-4,24 (1H, m, H-C2'); 4,80 (1H tt, *J* = 11,4; 4,8 Hz; H-3); 5,86 (1H, s, N-H). <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 209,7; 177,6; 171,5; 75,9; 64,0; 56,8; 55,6; 44,5; 41,9; 40,6; 39,3; 35,9; 35,1; 34,7; 32,2; 31,7; 29,3; 26,9; 26,7; 26,4; 25,1; 24,6; 23,4; 23,1; 21,0; 13,6. IČ spektrum (CHCl<sub>3</sub>): 1734, 1702 (C = O), 1230 (C-O). MS: ESI *m/z* 452,3 (100 %, M+Na). HR-MS (ESI) *m/z*: pro C<sub>26</sub>H<sub>39</sub>NO<sub>4</sub>Na [M+Na] vypočteno, 452,27713; nalezeno, 452,26742. Pro C<sub>26</sub>H<sub>39</sub>NO<sub>4</sub> (429,6)  
40 vypočteno: 72,69 %, C; 9,15 %, H; 3,26 %, N. Nalezeno: 72,29 %, C; 9,15 %, H; 3,11 %, N.

Příklad 2: (3R,5R,8R,9S,10S,13S,14S,17S)-17-Acetyl-10,13-dimethylhexadekahydro-1H-cyklopenta[a]fenantren-3-yl (R)-6-oxopiperidin-2-karboxylát (2)

45 V nadpisu uvedená sloučenina 2 byla připravena dle Obecného postupu B (DCM) z 20-oxo-5β-pregnan-3α-olu (318 mg, 1,0 mmol) za použití 6-oxo-2-piperidinkarboxylové kyseliny (213 mg, 1,5 mmol). Chromatografií na silikagelu (3% aceton/chloroform, obj./obj.) byla získána výsledná sloučenina 2 (142 mg, 32% výtěžek): bt 139–141 °C (aceton/*n*-heptan), [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> +103,2 (c 0,3, CHCl<sub>3</sub>). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 0,60 (3H, s, H-18); 0,94 (3H, s, H-19); 4,05 (1H, m, H-C2');  
50 4,81 (1H, m, H-3); 6,14 (1H, s, N-H). <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 209,7; 171,4; 170,5; 76,1; 64,0; 56,8; 55,1; 44,5; 42,0; 41,0; 39,3; 35,9; 35,0; 34,7; 32,2; 31,7; 31,2; 27,0; 26,7; 26,4; 25,6; 24,6; 23,4; 23,1; 21,0; 19,7; 13,6. IČ spektrum (CHCl<sub>3</sub>): 3402 (NH); 1734, 1698, 1663 (C = O). MS: ESI *m/z* 466,3 (100 %, M+Na). HR-MS (ESI) *m/z*: pro C<sub>27</sub>H<sub>41</sub>NO<sub>4</sub>Na [M+Na] vypočteno, 466,29278; nalezeno, 466,29283.

55

Příklad 3: (3R,5S,8R,9S,10S,13S,14S,17S)-17-Kyano-10,13-dimethylhexadekahydro-1H-cyklopenta[a]fenantren-3-yl (R)-5-oxopyrrolidin-2-karboxylát (3)

V nadpisu uvedená sloučenina **3** byla připravena dle Obecného postupu B (DCM) z 3 $\alpha$ -hydroxy-5 $\beta$ -androstan-17 $\beta$ -karbonitrilu (250 mg, 0,83 mmol), za použití *L*-pyroglutamové kyseliny (139 mg, 1,07 mmol). Chromatografii na silikagelu (20% obj./obj. aceton v CHCl<sub>3</sub>) byla získána výsledná sloučenina **3** (180 mg, 53% výtěžek): bt 188-189 °C (chloroform/diethyl eter), [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>20</sup> +75,5 (c 0,2, CHCl<sub>3</sub>). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  0,91 (3H, s, H-18); 0,96 (3H, s, H-19); 4,25 (1H, ddd, *J* = 8,8; 5,1; 0,7 Hz; H-C2'); 4,80 (1H tt, *J* = 11,3; 4,8 Hz; H-3); 5,92 (1H, s, N-H). <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  177,7; 171,5; 121,4; 75,8; 55,6; 54,5; 44,7; 41,8; 40,5; 40,5; 37,4; 36,3; 35,1; 34,8; 32,2; 29,3; 26,8; 26,8; 26,6; 26,4; 25,0; 24,7; 23,3; 20,6; 14,8. IČ spektrum (CHCl<sub>3</sub>): 2237 (CN). 1735, 1705 (C = O), 1229 (C-O). MS: ESI m/z 435,3 (100 %. M+Na). HR-MS (ESI) ni/z: pro C<sub>25</sub>H<sub>36</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>Na [M+Na] vypočteno, 435,26181; nalezeno, 435,26135. Pro C<sub>25</sub>H<sub>36</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (412,6) vypočteno: 72,78 %, C; 8,80 %, H; 6,79 %, N. Nalezeno: 72,39 %, C; 8,64 %, H; 6,33 %, N.

Příklad 4: (3R,5R,8S,9S,10S,11R,13S,14S,17S)-17-Acetyl-11-hydroxy-10,13-dimethylhexadekahydro-1H-cyklopenta[a]fenantren-3-yl (S)-5-oxopyrrolidin-2-karboxylát (4)

V nadpisu uvedená sloučenina **4** byla připravena dle Obecného postupu A (DMF) z 20-oxo-5 $\beta$ -pregnan-3 $\alpha$ ,11 $\alpha$ -diolu (334 mg, 1,0 mmol), za použití *L*-pyroglutamové kyseliny (193 mg, 1,5 mmol). Chromatografii na silikagelu (30% obj./obj. aceton v CHCl<sub>3</sub>) byla získána výsledná sloučenina **4** (213 mg, 48% výtěžek): bt 183-185 °C (chloroform/diethyl ether), [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>20</sup> +86,4 (c 0,2, CHCl<sub>3</sub>). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  0,62 (3H, s, H-18); 1,06 (3H, s, H-19); 2,13 (1H, s, H-21); 3,91 (1H, s, H-11); 4,20 (1H, ddd, *J* = 8,7; 5,2; 0,7 Hz; H-C2'); 4,85 (1H, tt, *J* = 10,9; 5,1 Hz; H-3); 5,83 (1H, s, N-H). <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  209,1; 177,7; 171,5; 76,3; 69,1; 63,5; 55,7; 55,6; 50,8; 47,3; 44,3; 43,5; 38,0; 35,9; 34,8; 32,7; 31,6; 29,3; 27,6; 27,4; 26,3; 25,0; 24,5; 23,7; 23,1; 14,6. IČ spektrum (CHCl<sub>3</sub>): 1734, 1702 (C = O). MS: ESI m/z 468,3 (100 %, M+Na). HR-MS (ESI) m/z: pro C<sub>26</sub>H<sub>39</sub>NO<sub>5</sub>Na [M+Na] vypočteno, 468,27219; nalezeno, 468,27204. Pro C<sub>26</sub>H<sub>39</sub>NO<sub>5</sub> (445,6) vypočteno: 70,08 %. C; 8,82 %, H; 3,14 %, N. Nalezeno: 69,91 %, C; 8,68 %, H; 2,87 %, N.

Příklad 5: (3R,5R,8S,9S,10S,13S,14S)-10,13-Dimethylhexadekahydro-1H-cyklopenta[a]fenantren-3-yl (S)-5-oxopyrrolidin-2-karboxylát (5)

V nadpisu uvedená sloučenina **5** byla připravena dle Obecného postupu A (DMF) z 3 $\alpha$ -hydroxy-5 $\beta$ -androstranu (300 mg, 0,94 mmol) za použití *L*-pyroglutamové kyseliny (190 mg, 1,9 mmol). Chromatografii na silikagelu (5% obj./obj. aceton v CHCl<sub>3</sub>) byla získána výsledná sloučenina **5** (210 mg, 58% výtěžek): bt 136-137 °C (chloroform/diethyl eter), [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>20</sup> +29,5 (c 0,2, CHCl<sub>3</sub>). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  0,69 (3H, s, H-18); 0,94 (3H, s, H-19); 4,16-4,24 (1H, m, H-C2'); 4,79 (1H tt, *J* = 11,3; 4,8 Hz; H-3); 5,89 (1H, s, N-H). <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  177,5; 171,4; 76,0; 55,5; 54,5; 41,9; 40,9; 40,7; 40,5; 39,0; 36,2; 35,0; 34,7; 32,1; 29,2; 27,0; 26,7; 26,5; 25,5; 24,9; 23,3; 20,8; 20,6; 17,5. IČ spektrum (CHCl<sub>3</sub>): 1734, 1704 (C = O). MS: ESI m/z 386,3 (100 %, M-H). HR-MS (ESI) m/z: pro C<sub>24</sub>H<sub>36</sub>NO<sub>3</sub> [M-H] vypočteno, 386,27007; nalezeno, 386,26962. Pro C<sub>24</sub>H<sub>37</sub>NO<sub>3</sub> (387,3) vypočteno: 74,38%, C; 9,62%, H; 3,61%N. Nalezeno: 74,20%, C; 9,61%, H; 3,26%, N.

Příklad 6: (3R,5R,8R,9S,10S,13S,14S)-10,13-Dimethyl-17-oxohexadekahydro-1H-cyklopenta[a]fenantren-3-yl (R)-5-oxopyrrolidin-2-karboxylát (6)

V nadpisu uvedená sloučenina **6** byla připravena dle Obecného postupu A (DMF) z 17-oxo-5 $\beta$ -androstan-3 $\alpha$ -olu (290 mg, 1,0 mmol), za použití *L*-pyroglutamové kyseliny (194 mg, 1,5 mmol). Chromatografii na silikagelu (5% obj./obj. aceton/chloroform) byla získána výsledná sloučenina **6** (197 mg, 49% výtěžek): bt 114-116 °C (aceton/w-heptan), [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>20</sup> +98,5 (c 0,2, CHCl<sub>3</sub>). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  0,86 (3H, s, H-18); 0,97 (3H, s, H-19); 4,20 (1H, m, H-C2'); 4,80

(1H, m, H-3); 5,91 (1H, s, N-H). <sup>13</sup>C NMR(101 MHz, CHCl<sub>3</sub>): δ 221,3; 177,7; 171,5; 75,8; 55,6; 51,6; 47,9; 41,9; 40,9; 36,1; 35,5; 35,0; 34,9; 32,2; 31,8; 29,3; 26,8; 26,6; 25,4; 25,0; 23,3; 21,9; 20,3; 13,9. IČ spektrum (CHCl<sub>3</sub>): 3439 (NH); 1703, 1706(C = O); 1060 (C–O). MS: ESI m/z 424,2 (100 %, M+Na). HR-MS (ESI) m/z: pro C<sub>24</sub>H<sub>35</sub>NO<sub>4</sub>Na [M+Na] vypočteno, 424,24583; nalezeno, 424,24548. Pro C<sub>24</sub>H<sub>35</sub>NO<sub>4</sub> (401,2) vypočteno: 71,79 %, C; 8,79 %, H; 3,49 %, N. Nalezeno: 71,40 %, C; 8,93 %, H, 3,32 %, N.

**Příklad 7:** (3R,5R,8R,9S,10S,13S,14S)-10,13-Dimethylhexadekahydro-1H-cyklopenta[a]fenantren-3-yl (R)-6-oxopiperidin-2-karboxylát (7)

V nadpisu uvedená sloučenina 7 byla připravena dle Obecného postupu A (DMF) z 5β-androstan-3α-olu (276 mg, 1,0 mmol), za použití 6-oxo-piperidinkarboxylové kyseliny (213 mg, 1,5 mmol). Chromatografií na silikagelu (5% obj./obj. aceton/chloroform) byla získána výsledná sloučenina 7 (189 mg, 47% výtěžek): bt 109-111 °C (diethyl ether), [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> +18,3 (c 0,3, CHCl<sub>3</sub>). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 0,68 (3H, s, 11-18); 0,94 (3H, s, H-19); 4,04 (1H, m, H-C2'); 4,81 (1H, m, H-3); 6,13 (1H, s, NH). <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CHCl<sub>3</sub>): δ 171,4; 170,6; 76,3; 55,1; 54,7; 42,0; 41,1; 40,9; 40,6; 39,1; 36,3; 35,2; 34,9; 32,3; 31,2; 27,1; 26,8; 26,7; 25,7; 25,6; 25,6; 23,4; 21,0; 20,7; 19,7; 17,6. IČ spektrum (CHCl<sub>3</sub>): 3402 (NH); 1734, 1665 (C = O); 1062 (C–O). MS: ESI m/z 424,3 (100%, M+Na). HR-MS (ESI) m/z: pro C<sub>25</sub>H<sub>39</sub>NO<sub>3</sub>Na [M+Na] vypočteno, 424,28222; nalezeno, 424,28258. Pro C<sub>25</sub>H<sub>39</sub>NO<sub>3</sub> (401,3) vypočteno: 74,77 %, C; 9,79 %, H; 3,49 %, N. Nalezeno: 74,97 %, C; 9,92 %, H; 3,43 %, N.

**Příklad 8:** (3R,5R,8R,9S,10S,13S,14S,17S)-17-Kyano-10,13-dimethylhexadekahydro-1H-cyklopenta[a]fenantren-3-yl (R)-6-oxopiperidin-2-karboxylát (8)

V nadpisu uvedená sloučenina 8 byla připravena dle Obecného postupu A (DMF) z 3α-hydroxy-5β-androstan-17β-karbonitrilu (112 mg, 0,37 mmol), za použití 6-oxo-piperidinkarboxylové kyseliny (80 mg, 0,56 mmol). Chromatografií na silikagelu (3% obj./obj. aceton/chloroform) byla získána výsledná sloučenina 8 (76 mg, 48% výtěžek): bt 69–71 °C (ethyl acetát/w-heptan), [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> +65,4 (c 0,3, CHCl<sub>3</sub>). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 0,91 (3H, s, H-19); 0,95 (3H, s, H-18); 2,29 (1H, t, J = 8,8 Hz; H-17); 4,04 (1H, m, H-C2'); 4,81 (1H, m, H-3); 6,12 (1H, s, N-H). <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CHCl<sub>3</sub>): δ 171,4; 170,5; 121,4; 75,9; 55,1; 54,5; 44,7; 41,8; 40,5; 40,5; 37,4; 36,3; 35,0; 34,8; 32,2; 31,2; 26,8; 26,8; 26,7; 26,4; 25,6; 24,7; 23,3; 20,7; 19,7; 14,5. IČ spektrum (CHCl<sub>3</sub>): 3403 (NH); 2237 (CN); 1734, 1664, 1418 (C = O); 1062 (C–O). MS: ESI m/z 449,3 (100 %, M+Na). HR-MS (ESI) m/z: pro C<sub>26</sub>H<sub>38</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>Na [M+Na] vypočteno, 449,27746; nalezeno, 449,27789. Pro C<sub>26</sub>H<sub>38</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (426,6) vypočteno: 73,20 %, C; 8,98 %, H; 6,57 %, N. Nalezeno: 73,22 %, C; 9,29 %, H; 6,25 %, N.

**Příklad 9:** (3R,5R,8R,9S,10S,13S,14S,17S)-17-Acetyl-10,13-dimethylhexadekahydro-1H-cyklopenta[a]fenantren-3-yl acetylglycinát (9)

V nadpisu uvedená sloučenina 9 byla připravena dle Obecného postupu A (DMF) z 20-oxo-5β-pregnan-3α-olu (318 mg, 1,0 mmol) za použití N-acetylglycinu (176 mg, 1,5 mmol). Chromatografií na silikagelu (3% aceton/chloroform, obj./obj.) byla získána výsledná sloučenina 9 (338 mg, 81% výtěžek): bt 111-113 °C (ethyl acetát/w-heptan), [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> +92,0 (c 0,3, CHCl<sub>3</sub>). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 0,60 (3H, s, H-18); 0,93 (3H, s, H-19); 2,04 (3H, s, H-C5'); 2,11 (3H, s, 11-21); 2,53 (1H, t, J = 8,8 Hz; H-17); 4,00 (2H, d, J = 5,0 Hz; H-C5'); 4,80 (1H, m, H-3); 6,00 (1H, m, N-H). <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CHCl<sub>3</sub>): δ 209,7; 170,2; 169,7; 75,9; 63,9; 56,8; 44,4; 41,9; 41,8; 40,6; 39,3; 35,9; 35,1; 34,8; 32,3; 31,7; 27,0; 26,7; 26,4; 24,6; 23,4; 23,2; 23,0; 21,0; 13,6. IČ spektrum (CHCl<sub>3</sub>): 3463, 1516 (NH); 1734, 1697, 1676 (C = O); 1192, 1063 (C–O). MS: ESI m/z 440,3 (100 %, M+Na). HR-MS (ESI) m/z: pro C<sub>25</sub>H<sub>39</sub>NO<sub>4</sub>Na [M+Na] vypočteno, 440,27713; nalezeno, 440,27753. Pro C<sub>25</sub>H<sub>39</sub>NO<sub>4</sub> (417,6) vypočteno: 71,91 %, C; 9,41 %, H; 3,35 %, N. Nalezeno: 72,03 %, C; 9,36 %, H; 3,39 %, N.

**Příklad 10:** (3R,5R,8R,9S,10S,13S,14S,17S)-17-acetyl-10,13-dimethylhexadekahydro-1H-

## cyklopenta[a]fenantren-3-yl acetylleucinát (10)

V nadpisu uvedená sloučenina 10 byla připravena dle Obecného postupu A (DMF) z 20-oxo-5 $\beta$ -pregnan-3 $\alpha$ -olu (318 mg, 1,0 mmol) za použití *N*-acetyl-*L*-leucinu (260 mg, 1,5 mmol). Chromatografií na silikagelu (15% EtOAc v petroletheru, obj./obj.) byla získána směs diastereomerů. Následnou UPEC chromatografií (20% aceton/hexan, obj./obj.) byla získán C3'-R/S diastereomer jako výsledná sloučenina 10 (155 mg, 33% výtěžek) olejové konzistence:  $[\alpha]_D^{20} +93,3$  (c 0,3, CHCl<sub>3</sub>). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  0,60 (3H, s, H-18); 0,93 (3H, s, 11-19); 0,95 (6H, dd,  $J = 6,3; 4,5$  Hz; H-C5' a C6'); 2,02 (3H, s, H-acetyl-*L*-leucinát); 2,11 (3H, s, H-21); 2,55 (1H, t,  $J = 8,8$  Hz; H-17); 4,58 (1H, m, H-C2'); 4,76 (1H, m, H-3); 5,83 (1H, 1H, NH). <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CHCE): 8 209,8; 173,0; 169,9; 75,6; 64,0; 56,8; 51,1; 44,5; 42,0; 40,6; 39,3; 35,9; 35,1; 34,8; 32,2; 31,7; 27,0; 26,7; 26,5; 25,0; 24,6; 23,4; 23,4; 23,0; 23,0; 22,3; 21,0. IČ spektrum (CHCl<sub>3</sub>): 3436 (NH); 2959, 2872 (CH<sub>3</sub>); 1727, 1697 (C = O); 1193, 1021 (C–O). MS: ESI m/z 496,3 (100 %, M+Na). HR-MS (ESI) m/z: pro C<sub>29</sub>H<sub>48</sub>NO<sub>4</sub> [M+H] vypočteno, 474,35779; nalezeno, 474,35753. Pro C<sub>29</sub>H<sub>47</sub>NO<sub>4</sub> (473,7) vypočteno: 73,53 %, C; 10,00 %, H; 2,96 %, N. Nalezeno: 73,37 %, C; 10,35 %, H; 2,69 %, N.

## Příklad 11: (3R,5R,8S,9S,10S,13R,14S,17S)-10,13,17-Trimethylhexadecahydro-1H-cyklopenta[a]fenantren-3-yl (S)-5-oxopyrrolidine-2-karboxylát (11)

V nadpisu uvedená sloučenina 11 byla připravena podle Obecného postupu A z 17 $\beta$ -methyl-5 $\beta$ -androstan-3 $\alpha$ -olu (102 mg, 0,35 mmol) za použití *L*-pyroglutamové kyseliny (112 mg, 0,525 mmol). Chromatografií na silikagelu (aceton/chloroform, 1:50 až 1:6) bylo získána výsledná sloučenina 11 (124 mg, 60% výtěžek) jako bílá amorfní látka: bt 157-158 °C (aceton/w-heptan).  $[\alpha]_D^{20} +31,0$  (c 0,3, CHCl<sub>3</sub>). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  0,52 (3H, s, H-18); 0,82 (3H, d,  $J = 6,8$  Hz; 17-Me); 0,94 (3H, s, 11-19); 4,19 (dd,  $J = 8,6; 5,2$  Hz; H-C2'); 4,78 (1H, tt,  $J = 11,4; 4,8$  Hz; H-3); 6,19 (1H, s, N-H). <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  177,9; 171,6; 76,1; 55,9; 55,7; 45,3; 42,3; 42,2; 40,9; 37,8; 36,2; 35,2; 34,8; 32,3; 30,4; 29,4; 27,2; 26,7; 26,6; 25,0; 24,8; 23,5; 20,7; 13,9; 12,2. IČ spektrum (CHCl<sub>3</sub>): 3206, 3118 (NH), 2951, 2867 (CH<sub>2</sub>), 1736 (C = O), 1716 (C = O), 1448 (CH<sub>2</sub>), 1203, 1022 (C–O). MS; ESI m/z 424,3 (100 %, M+Na), 402,3 (24 %, M+H). HR-MS (ESI) m/z: pro C<sub>25</sub>H<sub>39</sub>NO<sub>3</sub>Na [M+Na] vypočteno, 424,2823, nalezeno, 424,2822; pro C<sub>25</sub>H<sub>40</sub>NO<sub>3</sub> [M+H] vypočteno, 402,3003, nalezeno, 402,3003. Pro C<sub>25</sub>H<sub>39</sub>NO<sub>3</sub> (401,6) vypočteno: 74,77 %, C; 9,79 %, H; 3,49 %, N. Nalezeno: 74,77 %, C; 9,94 % H; 2,94 %, N.

## Příklad 12: (3R,5R,8R,9S,10S,13S,14S,Z)-17-Ethyliden-10,13-dimethylhexadecahydro-1H-cyklopenta[a]fenantren-3-yl (R)-5-oxopyrrolidin-2-karboxylát (12)

V nadpisu uvedená sloučenina 12 byla připravena dle Obecného postupu A (DMF) z 5 $\beta$ -pregnan-17-ethyliden-3 $\alpha$ -olu (302 mg, 1,0 mmol), za použití *L*-pyroglutamové kyseliny (194 mg, 1,5 mmol). Produkt byl předčištěn sloupcovou chromatografií na silikagelu (8% aceton/chloroform, obj./obj.). V nadpisu uvedená sloučenina 12 (190 mg, 46% výtěžek) byla získána HPLC chromatografií v následujícím uspořádání: vysokotlaká pumpa (model 361, Gilson), Inject Valve Rheodyne, preparativní ELSD detektor (Gilson) spojený s PC (software Trilution EC, Gilson). Průtok 17 ml/min, aceton/hexan 20/80, eluční čas 48 min. Kolona Luna 5  $\mu$ m Si(2); Axia Packed 250x21,2 mm. Nástřik: 1 ml dichlormethanu: bt 155-157 °C (aceton/hexan),  $[\alpha]_D^{20} +57,1$  (c 0,3, CHCl<sub>3</sub>): <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  0,86 (3H, s, H-18); 0,95 (3H, s, 11-19); 4,20 (1H, ddd,  $J = 8,7; 5,4; 0,7$  Hz; H-C2'); 4,79 (1H, tt,  $J = 11,4; 4,8$  Hz; H-3); 5,11 (1H, qt,  $J = 7,1; 2,0$  Hz; 11-20); 5,86 (1H, s, N-H). <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  177,6; 171,6; 150,4; 113,4; 76,1; 56,4; 55,6; 44,6; 42,0; 40,7; 37,5; 35,5; 35,0; 34,8; 32,3; 31,6; 29,3; 27,1; 26,7; 26,3; 25,0; 24,5; 23,4; 21,2; 17,0; 13,3. IČ spektrum (CHCl<sub>3</sub>): 3438, 1706 (oxopyrrolidin); 1734 (C = O); 1244, 1022 (C–O); 1678, 828 (C=C). MS: ESI m/z 827,6 (100 %, 2M). 414,3 (65 %, M+H). HR-MS (ESI) m/z: pro C<sub>26</sub>H<sub>40</sub>NO<sub>3</sub> [M+H] vypočteno, 414,30027; nalezeno, 414,29987. Pro C<sub>26</sub>H<sub>39</sub>NO<sub>3</sub> (413,6) vypočteno: 75,50 %; C; 9,50 %; H; 3,39 %; N. Nalezeno: 75,24 %, C; 9,51 %, H; 3,02 %, N.

## Příklad 13: 2-(((3R,5R,8S,9S,10S,13S,14S)-10,13-Dimethylhexadecahydro-1H-

## cyclopenta[a]fenantren-3-yl)oxy)ethyl (R)-5-oxopyrrolidine-2-carboxylate (13)

V nadpisu uvedená sloučenina 13 byla připravena dle Obecného postupu A (DMF) z 3-(5 $\beta$ -androstano-3 $\alpha$ -yl)oxy)ethan-1-olu (320 mg, 1,0 mmol), za použití *L*-pyroglutamové kyseliny (194 mg, 1,5 mmol). Produkt byl předčištěn sloupcovou chromatografií na silikagelu (8% aceton/chloroform, obj./obj.). V nadpisu uvedená sloučenina 13 (180 mg, 42% výtěžek) byla získána UPEC chromatografií v následujícím uspořádání: vysokotlaká pumpa (model 361, Gilson), Inject Valve Rheodyne, preparativní EESD detektor (Gilson) spojený s PC (software Trilution EC, Gilson). Průtok 17 ml/min, aceton/hexan 20/80, eluční čas 45 min. Kolona Euna 5  $\mu$ m Si(2): Axia Packed 250x21,2 mm. Nástřik: 1 ml dichlormethanu: bt 110-111 °C (aceton/hexan),  $[\alpha]_D^{20}$  +11,4 (c 0,3, CHCl<sub>3</sub>). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  0,67 (3H, s, 11-18); 0,92 (3H, s, 11-19); 3,28 (1H, tt,  $J$  = 11,1; 4,6 Hz, H-3); 3,48 (1H,  $J$  = 7,0 Hz; H-C2'); 3,64-3,74 (2H, m, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O-ster); 4,18-4,42 (2H, m, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O-ster); 5,92 (1H, s, N-H). <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  177,6; 172,1; 79,9; 65,7; 65,3; 55,4; 54,7; 42,3; 41,1; 40,8; 40,6; 39,2; 36,4; 35,6; 35,2; 33,3; 29,2; 27,4; 27,3; 26,9; 25,7; 25,0; 23,6; 21,0; 20,7; 17,6. IČ spektrum (CHCl<sub>3</sub>): 3437, 1705 (oxopyrrolidin); 1744 (C = O); 1240, 1033 (C–O). MS: ESI m/z 454,3 (87 %, M+Na), 432,3 (58 %, M+H). HR-MS (ESI) m/z: pro C<sub>26</sub>H<sub>42</sub>NO<sub>4</sub> [M+H] vypočteno, 432,31084; nalezeno, 432,3 1049. Pro C<sub>20</sub>H<sub>41</sub>NO<sub>4</sub> (431,6) vypočteno: 72,35 %, C; 9,58 %, H; 3,25 %, N. Nalezeno: 71,99 %, C; 9,93 %, H; 3,13 %, N.

## Příklad 14: 2-(((3R,5R,8S,9S,10S,13S,14S)-10,13-Dimethylhexadecahydro-1H-cyklopenta[a]fenantren-3-yl)oxy)ethyl (S)-6-oxopiperidin-2-karboxylát (14)

V nadpisu uvedená sloučenina 14 byla připravena dle Obecného postupu A (DMF) z 3-(5 $\beta$ -androstano-3 $\alpha$ -yl)oxy)ethan-1-olu (320 mg, 1,0 mmol), za použití 6-oxo-2-piperidinkarboxylové kyseliny (214 mg, 1,5 mmol). Produkt byl předčištěn sloupcovou chromatografií na silikagelu (5% aceton/chloroform, obj./obj.). V nadpisu uvedená sloučenina 14 (170 mg, 38% výtěžek) byla získána HPLC chromatografií v následujícím uspořádání: vysokotlaká pumpa (model 361, Gilson), Inject Valve Rheodyne, preparativní ELSD detektor (Gilson) spojený s PC (software Trilution EC, Gilson). Průtok 17 ml/min, aceton/hexan 20/80, eluční čas 42 min. Kolona Luna 5  $\mu$ m Si(2); Axia Packed 250x21,2 mm. Nástřik: 1 ml dichlormethanu: bt 117-119 °C (aceton/hexan),  $[\alpha]_D^{20}$  +8,1 (c 0,3, CHCl<sub>3</sub>). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  0,68 (3H, s, H-18); 0,92 (3H, s, 11-19); 3,27 (1H, tt,  $J$  = 11,1; 4,6 Hz; 11-3); 3,69 (2H, ddd,  $J$  = 5,5; 4,2; 1,3 Hz; OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O-ster); 4,12 (1H, ddd,  $J$  = 8,3; 5,1; 1,6 Hz; H-C2'); 4,25-4,36 (2H, m, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O-ster); 6,11 (1H, s, N-H). <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  171,0; 170,9; 79,6; 65,3; 65,1; 54,6; 54,4; 42,0; 40,8; 40,5; 40,3; 38,9; 36,0; 35,2; 34,8; 33,0; 30,9; 27,1; 26,9; 26,6; 25,4; 25,3; 23,2; 20,7; 20,4; 19,4; 17,3. IČ spektrum (CHCl<sub>3</sub>): 3400, 1666 (oxopiperidin); 1743 (C = O); 1294, 1244 (C–O). MS: ESI m/z 468,3 (100 %, M+Na), 446,3 (88 %, M+H). HR-MS (ESI) m/z: pro C<sub>27</sub>H<sub>44</sub>NO<sub>4</sub> [M+H] vypočteno, 446,32649; nalezeno, 446,32614. Pro C<sup>27</sup>H<sup>43</sup>NO<sup>4</sup> (445,6) vypočteno: 72,77 %, C; 9,73 %, H; 3,14 %, N. Nalezeno: 72,63 %, C; 9,65 %, H; 3,03 %, N.

## Příklad 15: 1-((3R,5R,8R,9S,10S,13S,14S,17S)-3-(2-Hydroxyethyl)-10,13-dimethylhexadecahydro-1H-cyklopenta[a]fenantren-17-yl)ethan-1-ol (15)

Roztok 20-oxo-5 $\beta$ -pregnan-3 $\alpha$ -octové kyseliny (5,9 g, 16,0 mmol) v THF (20 ml) byl po kapkách přidán k refluxujícímu roztoku LiAlH<sub>4</sub> (1,4 g, 36,8 mmol) v THE (580 ml). Po 2 hodinách refluxu byla reakční směs ochlazena na 0 °C a byl přidán nasycený vodný roztok Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Oddělený filtrát byl zakoncentrován a následně naředěn ethyl acetátem. Organická složka byla promyta vodným roztokem kyseliny chlorovodíkové (10% obj./obj.; 3 x 40 ml), vodou (3 x 40 ml) a nasyceným roztokem NaHCO<sub>3</sub> (3 x 40 ml). Rozpouštědla sušena nad bezvodným Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a následně odpařena. Sloupcovou chromatografií na silikagelu (4% EtOAc v petroleum etheru, obj./obj.) byla získána látka 1-((3R,5R,8R,9S,10S,13S,14S,17S)-3-(2-hydroxyethyl)-10,13-dimethylhexadecahydro-1H-cyklopenta[a]fenantren-17-yl)ethan-1-ol (3,1 g, 54% výtěžek) jako směs 20R a 20S-izomerů, která byla použita v dalším reakčním kroku. Vodný roztok NaOCl (5,5%, 30 ml) byl přidán k roztoku výše uvedené látky (3 g, 8,6 mmol) v kyselině octové (75 ml).

Po hodině míchání při teplotě místnosti byl přidán isopropanol (45 ml) a reakční směs byla míchána dalších 30 minut. Reakční směs byla zředěna vodou a extrahována chloroformem (3 x 30 ml). Spojené organické fáze byly promyty solankou, sušeny na bezvodým Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a rozpouštědla odpařena. Odparek byl předčištěn pomocí sloupcové chromatografie (3-5% acetone/hexan). V nadpisu uvedená sloučenina 15 (850 mg, 25% výtěžek) byla získána HPLC chromatografií v následujícím uspořádání: vysokotlaká pumpa (model 361, Gilson), Inject Valve Rheodyne, preparativní ELSD detektor (Gilson) spojený s PC (software Trilution LC, Gilson). Průtok 10 ml/min, aceton/hexan 20/80, eluční čas 36 min. Kolona Luna 5 μm Si(2); Axia Packed 250x21,2 mm. Nástřík: 3 ml dichlormethanu. V nadpisu uvedená sloučenina byla použita do dalšího reakčního kroku. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 0,59 (3H, s, H-18); 0,92 (3H, s, H-19); 2,11 (3H, s, H-21); 2,53 (1H, t, *J* = 9,0 Hz; H-17); 3,66 (2H, t, *J* = 6,9 Hz; OCH<sub>2</sub>CH-ster). <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 209,6; 63,8; 61,7; 56,7; 44,2; 39,9; 39,2; 37,3; 35,6; 35,3; 34,6; 31,4; 31,1; 30,4; 29,5; 27,0; 26,2; 24,6; 24,3; 24,0; 22,7; 20,8; 13,3.

15 Příklad 16: 2-((3R,5R,8R,9S,10S, 13S,14S,17S)-17-Acetyl-10,13-dimethylhexadekahydro-1H-cyklopenta[a]fenantren-3-yl)ethyl (R)-5-oxopyrrolidin-2-karboxylát (16)

V nadpisu uvedená sloučenina 16 byla připravena dle Obecného postupu A (DMF) z 20-oxo-5β-pregnan-3α-ethanolu (347 mg, 1 mmol), za použití *L*-pyroglutamové kyseliny (194 mg, 1,5 mmol). Produkt byl předčištěn sloupcovou chromatografií na silikagelu (8% aceton/chloroform, obj./obj.). V nadpisu uvedená sloučenina 16 (200 mg, 44% výtěžek) byla získána HPLC chromatografií v následujícím uspořádání: vysokotlaká pumpa (model 361, Gilson), Inject Valve Rheodyne, preparativní ELSD detektor (Gilson) spojený s PC (software Trilution EC, Gilson). Průtok 10 ml/min, aceton/hexan 40/80, eluční čas 42 min. Kolona Luna 5 μm Si(2); Axia Packed 250x21,2 mm. Nástřík: 3 ml dichlormethanu: nízkotající látka, [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> +66,3 (c 0,3, CHCl<sub>3</sub>). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 0,59 (3H, s, H-18); 0,93 (3H, s, H-19); 2,11 (3H, s, H-21); 4,18 (2H, t, *J* = 6,9 Hz; OCH<sub>2</sub>CH-ster); 4,26-4,21 (1H, m, H-C2'); 5,90 (1 H, s, N-H). <sup>13</sup>CNMR(101 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 209,8; 177,6; 172,1; 65,1; 64,1; 57,0; 55,5; 44,5; 40,2; 39,5; 37,6; 35,9; 35,6; 31,7; 31,3; 30,5; 30,2; 29,3; 27,2; 26,5; 25,0; 25,0; 24,7; 24,6; 24,3; 23,0; 21,1; 13,6. IČ spektrum (CHCl<sub>3</sub>): 3438, 1739, 1702 (oxopyrrolidin); 2924, 2864 (CH<sub>2</sub>). MS: ESI m/z 480,3 (100 %, M+Na), 458,3 (12 %, M+H). HR-MS (ESI) m/z: pro C<sub>28</sub>H<sub>44</sub>NO<sub>4</sub> [M+H] vypočteno, 458,32649; nalezeno, 458,32611. Pro C<sub>28</sub>H<sub>43</sub>NO<sub>4</sub> (457,7) vypočteno: 73,49 %, C; 9,47 %, H; 3,06 %, N. Nalezeno: 73,08 %, C; 9,43 %, H; 2,79 %, N.

35 Příklad 17: 2-((3R,5R,8R,9S,10S,13S,14S,17S)-17-Acetyl-10,13-dimethylhexadekahydro-1H-cyklopenta[a]fenantren-3-yl)ethyl (R)-6-oxopiperidine-2-karboxylát (17)

V nadpisu uvedená sloučenina 17 byla připravena dle Obecného postupu A (DMF) z 20-oxo-5β-pregnan-3α-ethanolu (347 mg, 1 mmol), za použití 6-oxo-2-piperidinkarboxylové kyseliny (214 mg, 1,5 mmol). Produkt byl předčištěn sloupcovou chromatografií na silikagelu (5% aceton/chloroform, obj./obj.). V nadpisu uvedená sloučenina 17 (175 mg, 37% výtěžek) byla získána HPLC chromatografií v následujícím uspořádání: vysokotlaká pumpa (model 361, Gilson), Inject Valve Rheodyne, preparativní ELSD detektor (Gilson) spojený s PC (software Trilution LC, Gilson). Průtok 12 ml/min, aceton/hexan 40/60, eluční čas 37 min. Kolona Luna 5 μm Si(2); Axia Packed 250x21,2 mm. Nástřík: 1 ml dichlormethanu: bt olej, [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> +61,5 (c 0,2, CHCl<sub>3</sub>). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 0,59 (3H, s, H-18), 0,93 (3H, s, H-19), 2,11 (3H, s, H-21), 4,10-4,03 (2H, m, OCH<sub>2</sub>CH-ster), 4,30-4,11 (1H, m, H-C2'), 6,11 (1H, s, N-H). <sup>13</sup>CNMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 209,8; 171,3; 171,2; 164,4; 65,2; 64,1; 57,0; 55,0; 44,5; 40,2; 39,5; 37,5; 35,9; 35,6; 31,7; 31,3; 31,2; 30,5; 30,2; 27,9; 27,2; 26,5; 25,6; 24,6; 24,3; 23,0; 21,1; 19,7; 13,6. IČ spektrum (CHCl<sub>3</sub>): 3102 (oxopiperidin); 1739, 1697 (C = O); 1265, 1011 (C–O). MS: ESI m/z 494,3 (100 %, M+Na). HR-MS (ESI) m/z: pro C<sub>29</sub>H<sub>45</sub>NO<sub>4</sub>Na [M+Na] vypočteno, 494,32408; nalezeno, 494,32371.

Experimenty *in vivo*

55

Dospělí jedinci (kmen AB) rybky danio pruhované (*Danio rerio*) byly chovány při 28-29 °C ve světelném cyklu 14 hodin světla/10 hodin tmy (zapnutí světla v 7 hod., vypnutí světla v 21 hodin) v zařízení ZeClinics (Barcelona, Španělsko). Veškeré manipulace se zvířaty a péče o ně byly prováděny v souladu s legislativou CEA-OH/9421/2 vládního nařízení Katalánska. Embrya získaná pářením byla chována v médiu E3 za kontrolované teploty 28,5 °C až do dne 7 po oplození - (dpf), kdy byly provedeny experimenty.

Antikonvulzivní účinek látek byl hodnocen ve dvou modelech epileptických záchvatů u laboratorních hlodavců (PTZ model a 6Hz model) s použitím tří věkových skupin samců laboratorních potkanů kmene Wistar. Byla použita dvanáctidenní (P12 – pro PTZ model) nebo patnáctidenní (P15 – pro Hz model) a dvaceti pětidenní (P25) mláďata a rovněž dospělá zvířata (P60). Den porodu byl stanoven jako P0. Experimenty hodnotící prokognitivní účinek byly provedeny s dospělými samci laboratorního potkana kmene Wistar a Long-Evans (3 měsíce, 300–400 g). Všechna zvířata pocházela z chovného zařízení Fyziologického ústavu AV ČR (oprávnění 1396/2014-MZE-17214). Zvířata byla chována ve standartních podmínkách (21 + 1 °C, vlhkost 50-60 %, světelný cyklus 12/12) se stálým přístupem k vodě a potravě. Veškeré manipulace se zvířaty byly provedeny v souladu postupy <https://www.nc3rs.org.uk/arrive-guidelines> a v souladu se zákonem č. 246/1992 Sb. a mezinárodními zákony a předpisy (EU Directive 2010/63/EU for animal experiments).

Vzhledem k zákonem danému etickému požadavku na redukci počtu laboratorních zvířat použitých v pokusech byla jako modelová molekula ke studiu antikonvulzivních a neuroprotektivních vlastností v animálních modelech hlodavců vybrána z Příkladu 1.

Antikonvulzivní účinky steroidních derivátů v modelu akvarijní ryby dánío pruhované (*Danio rerio*)

Primárně byl studován antikonvulzivní účinek nárokovaných látek na nervový systém v embryonálním testu s organismem akvarijní ryby dánío pruhované (*Danio rerio*). Tento test je moderní alternativou k testům na dospělých zvířatech, mající srovnatelnou vypovídací hodnotu. *Danio rerio* je velmi všestranný organismus, který vykazuje řadu fyziologických podobností se savci včetně člověka (Expert Opin. Drug Metab. Toxicol. 2009, 5, 393). Antikonvulzivní účinek steroidních derivátů byl studován na jedincích o stáří 7 dpf („days post fertilization“ - dny po oplození). Steroidní deriváty byly testovány ve 3 koncentracích (1, 3 a 5  $\mu\text{mol.l}^{-1}$ ). Jako negativní kontrola byl použit 1% (obj./obj.) roztok DMSO. Epileptiformní aktivita byla vyvolána aplikací pentylentetrazolu (PTZ) v dávce 5  $\text{mmol.l}^{-1}$ . Topiramát, klinicky používané léčivo pro tuto indikaci, byl použit jako komparátor. Výsledky byly analyzovány softwarem GraphPad Prism a statistická významnost byla stanovena testem One-way ANOVA s následným srovnáním s použitím Turkeyho testu. Spontánní pohyby dánío pruhovaného a jeho reakce na impulsy světla a tmy byly nahrávány na zařízení DanioVision a analyzovány pomocí softwaru EthoVision XT 12 (Noldus Information Technologies, Wageningen, Holandsko). Tento systém obsahuje kameru umístěnou nad nádržkou s cirkulující vodou a s teplotním senzorem nastaveným na 28 °C. Jednotlivé rybky jsou umístěny v 48-jamkové destičce, což umožňuje softwarem specificky kontrolovat a modifikovat podmínky experimentu (např. stimulaci světlem a tmou). Před každým experimentem byla zvířata ponechána 10 minut ve tmě pro aklimatizaci a teprve poté byla vystavena sérii impulzů světla a tmy. Protokol experimentu se skládá z několika fází: (a) 15 minut s osvětlením destičky; (b) série 5 krátkých záblesků světla, které indukují epileptické záchvaty; (c) 25 minut střídání světla a tmy po 5 minutách (tzv. dark/light test). Z každé fáze experimentu se dají získat odlišná experimentální data. V první fázi experimentu se získají informace o spontánním lokomočním pohybu zvířete. Druhá část experimentu umožňuje analyzovat změny chování na světelný stimul vyvolávající epileptiformní aktivitu a vyhodnotit její základní charakteristiky: rychlost plavání a rychlost otáčení (specifické nepředvídatelné pohyby). Poslední část experimentu umožňuje vyhodnotit anomálie či odchylky od přirozeného chování dánío pruhovaného (pohyb ve tmě vs přirozený klidový stav při osvětlení). Tyto údaje charakterizují případný sedativní účinek testovaných látek.



Antikonvulzivní efekt látek byl studován v dávkách 1, 3 a 5 mg/kg pro látky uvedené v Příkladu 1, Příkladu 2 a v Příkladu 3. Výsledky (viz Obr. 1 a Obr. 2) ukazují, že všechny látky významně snížily epileptiformní lokomoční aktivitu způsobenou aplikací PTZ ve všech třech hodnocených parametrech - spontánní lokomoční aktivitě, rychlosti plavání a rychlosti otáčení. Všechny látky také snížily epileptiformní lokomoční aktivitu ve fázi dark/light testu, aniž by způsobily sedaci.

Antikonvulsivní účinky steroidních derivátů 11 laboratorních potkanů

Antikonvulzivní účinek byl studován na dvou věkových skupinách mláďat laboratorního potkana kmene Wistar, 12 či 15denních a 25denních, a na dospělých jedincích (P60). Důvodem dvou věkových skupin mláďat potkanů byla jednak existence novorozeneckých záchvatů (dětských epileptických encefalopatií), které jsou ve většině případů rezistentní k současné farmakoterapii – k tomuto účelu jsme testovali mladší skupinu, kde vývoj mozku odpovídá vývoji mozku u lidských kojenců. Zvířata 25denní pak odpovídají dětem školního věku. Byly použity dva modely: konvulsivní generalizované tonicko-klonické záchvaty vyvolané podkožní aplikací pentylentetrazolu (PTZ) v dávce 100 mg/kg a záchvaty vyvolané transkorneální elektrickou stimulací o frekvenci 6 Hz trvající 3 s. Pulsy jsou bifázické a mají trvání 1 ms, stimulator firmy Ugo Basile generuje pulzy s konstantní intenzitou proudu. Křeče vyvolané PTZ představují model lidských generalizovaných tonicko-klonických záchvatů (GTCS), záchvaty vyvolané 6Hz stimulací jsou obecně považovány za model temporálních (psychomotorických, komplexních parciálních) záchvatů. Výsledky jsou prezentovány jako průměr+SEM. Rozdíly v latencích a tíži záchvatů byly stanoveny testem ANOVA s následným srovnáním s použitím Holm-Sidak testu. Incidence byly porovnány s použitím Fischerova testu. Hodnota  $p$  byla stanovena  $< 0.5$ .

Účinnost steroidních derivátů v modelu záchvatů vyvolaných PTZ u laboratorních potkanů

Antikonvulzivní efekt látek byl studován na dvou věkových skupinách mláďat laboratorního potkana kmene Wistar – 12denních a 25denních. Steroidní deriváty byly aplikovány v dávkách 1, 5, a 10 mg/kg *i.p.*, 20 minut před aplikací PTZ (100 mg/kg, *s.c.*).

Antikonvulzivní účinek látky z Příkladu 1 je zobrazen na Obr. 3. U 12denních mláďat byla dávkou 1 mg/kg potlačena tonická fáze záchvatu, dávka 5 mg/kg významně snížila výskyt záchvatů a dávka 10 mg/kg je zcela potlačila. Latence generalizovaných záchvatů byly významně prodlouženy dávkami 1 a 5 mg/kg, index závažnosti záchvatů (tj. tíže záchvatů) klesal v závislosti na dávce. U 25denních mláďat dávky 5 a 10 mg/kg významně snížily výskyt generalizovaných tonicko-klonických v dávce 10 mg/kg záchvatů bez specifického ovlivnění jednotlivých fází. Latence záchvatů po dávce 1 mg/kg se významně nezměnily, po obou vyšších dávkách se však záchvaty vyskytly jen u jednoho zvířete. Index závažnosti záchvatů kopíroval výskyt záchvatů. Antikonvulzivní účinek látky z Příkladu 2 je zobrazen na Obr. 4. Látka v Příkladu 2 v dávkách 5 a 10 mg/kg významně potlačila výskyt generalizovaných záchvatů i tíži epileptických projevů u obou věkových skupin. Antikonvulzivní účinek látky z Příkladu 3 je zobrazen na Obr. 5. Látka z Příkladu 3 v dávkách 5 a 10 mg/kg potlačila výskyt generalizovaných záchvatů u 25denních mláďat. U 12denních zvířat byla účinná dávka 5 mg/kg.

Antikonvulzivní účinek látky z Příkladu 1 u dospělých zvířat je zobrazen na Obr. 6. U dospělých zvířat látka z Příkladu 1 v dávce 10 mg/kg významně snižovala výskyt kompletních generalizovaných záchvatů s tonickou fází (GTCS) bez ovlivnění výskytu minimálních, převážně klonických záchvatů. Latence generalizovaných záchvatů byla významně snížena dávkou 5 mg/kg, po které měla záchvat pouze dvě z osmi zvířat a v případě dávky 10 mg/kg dokonce jen jedno zvíře. Tíže záchvatů byla významně snížena po obou dávkách, 5 i 10 mg/kg.

Účinnost steroidních derivátů v modelu záchvatů vyvolaných elektrickou stimulací 6 Hz u laboratorních potkanů

Pro tento test byla použita mláďata 15denní, protože ta již mají rozlepená víčka a není nutné je chirurgicky rozevírat. Jako druhá skupina byla použita zvířata 25denní. Citlivost dvou uvedených věkových skupin na tuto stimulaci je různá, proto jsme použili u 15denních mláďat intenzity proudu 40, 60 a 80 mA, zatímco u 25denních mláďat to byly intenzity 20, 40 a 60 mA. Mezi jednotlivými stimulacemi jsme dodržovali 20ti minutový odstup, 10 minut před každou stimulací byly obě oči znecitlivěny kapkou mesocainu. Steroidní deriváty byly podány v dávce 10 mg/kg, *i.p.* 20 min před první stimulací. Antikonvulzivní účinek látky z Příkladu 1 u 15 a 25denních zvířat je zobrazen na Obr. 7. U 15denních zvířat látka v testované dávce signifikantně potlačovala záchvaty vyvolané stimulací o intenzitě 60 ale ne 80 Hz. Podání PPG však významně zkrátilo trvání záchvatů u obou intenzit. Intenzita záchvatů nebyla ovlivněna. Starší věková skupina ukázala tendenci k nižšímu výskytu záchvatů, které po obou účinných intenzitách stimulace trvaly signifikantně kratší dobu a měly nižší intenzitu.

Antikonvulzivní účinek látky z Příkladu 1 u dospělých zvířat je zobrazen na Obr. 8. U dospělých potkanů látka ovlivnila práh pro vyvolání křečí v 6Hz modelu epileptických záchvatů pouze nesignifikantně. Tendence ke zvýšení prahu se objevila po podání nejvyšší testované dávky 10 mg/kg *i.p.* Nicméně, tyto výsledky spolu s výsledky získanými ve stejném modelu na mláďatech jednoznačně prokazují vyšší účinnost a širší spektrum antikonvulzivní účinnosti v pediatrických modelech.

#### Účinnost látky z Příkladu 1 v modelech afektivních poruch (komorbidit epilepsie)

Behaviorální modely afektivních poruch jsou založeny na vystavení stresové situaci. Provedeny byly dva behaviorální testy: test ve zvýšeném křížovém bludišti (PPM, *Nat. Protoc.* 2007, 2, 322) a v modelu „novelty suppressed feeding“ (NSF, *Interdiscip. Toxicol.* 2017, 10, 40).

V testu LPM byla testovaná sloučenina aplikována v dávkách 1,3 a 10 mg/kg, *i.p.* 30 minut před samotným testováním v bludišti. Během 10 minut pobytu v bludišti byly sledovanými parametry čas strávený v otevřených ramenech, v uzavřených ramenech a v centrální platformě. Aplikace látky z Příkladu 1 v dávce 10 mg/kg vedla ke snížení všech sledovaných parametrů anxiety. Test EPM průkazně doložil anxiolytické vlastnosti látky z Příkladu 1.

V testu NSF byla sloučenina z Příkladu 1 byla aplikována *i.p.* 30 min před samotným měřením v dávkách 0,1; 0,3; 1; 3 a 10 mg/kg. Výsledky ukázaly signifikantní pokles latence do zahájení příjmu krmiva u dávky 0,3 mg/kg, tedy anxiolytické vlastnosti. U dávek 1 a 3 mg/kg byl zaznamenán trend ke snížení doby latence příjmu krmivá.

Účinnost látky z Příkladu 1 v modelech schizofrenii podobného chování a prokognitivního účinku

Schizofrenii podobné chování bylo vyvoláno *i.p.* aplikací dizocilpinu (MK-801) v dávce 0,1 mg/kg. Vliv látky z Příkladu 1 byl testován v behaviorálním testu „pasivní vyhýbání“ (passive avoidance) (*Psychopharmacology* (Berl). 2016, 233, 2077). Jedná se úlohu, která slouží ke studiu paměti a schopnosti učení.

Látka z Příkladu 1 byla aplikována 30 min *i.p.* před úlohou v dávkách 0,1; 1 a 3 mg/kg. Výsledky ukazují, že aplikace látky z Příkladu 1 intaktním zvířatům nenarušuje paměť hodinu po aplikaci averzivního podnětu. Vliv na snížení latence vstupu byl zaznamenán u latence měřené 24 h po asociaci již u dávky 0,1 mg/kg. Aplikace dizocilpinu vedla k poškození paměti, měřenému jako latence vstupu po 1 i 24 h po aplikaci averzivního stimulu. Aplikace látky z Příkladu 1 v dávce 0,1 mg/kg zabránila poškození paměti měřeno 1 h po averzivním stimulu. V ostatních dávkách a delším časovém odstupu byl pozorován obdobný trend. Aplikace látky z Příkladu 1 tedy vykazuje prokognitivní vliv, a to spíše u krátkodobé paměti.

55

## Neuroprotektivní účinnost látky z Příkladu 1 v modelu excitotoxického poškození CNS

Neuroprotektivní vliv látky z Příkladu 1 byl testován v modelu bilaterální excitotoxické léze dorzálního hipokampu. Postup byl prováděn podle literatury (Neuropharmacology 2011, 61, 61).  
 5 Tento model simuluje nadměrnou stimulaci NMDA receptorů, která se objevuje u řady patofyziologických stavů, což vede k toku vápníku do nitra neuronu a následně k apoptóze až nekróze. Klinicky se tento stav projevuje neurodegenerací a poškozením CNS.

Potkani byli náhodně rozděleni do tří skupin. Kontrolní zvířata zahrnovala operovaná zvířata,  
 10 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 5 minut po provedení NMDA léze aplikován PPG v dávce 1 mg/kg *i.p.* NMDA léze byla indukována infúzí excitotoxického NMDA (25 mmol.l<sup>-1</sup>, objem 1 µl) do dorzálního hippocampu. kontrolní zvířata dostala sterilní PBS (10 mmol.l<sup>-1</sup>). Látka z Příkladu 1 (1 mg/kg) nebo vehikulum  
 15 bylo podáno 5 minut po ukončení infuze NMDA. Za 24 h po indukci excitotoxického poškození hipokampu byla provedena transcardiální perfúze. Mozková tkáň byla následně postfixována přes noc ve 4% PFA a následně v 10%, 20%, 30% (obj./obj.) sacharóze (ke kryoprotekci) pro histologickou evaluaci. Histologické poškození, resp. neuroprotektivní vliv látky z Příkladu 1 byl  
 20 hodnocen pomocí obarvení degenerujících neuronů látkou Fluoro Jade B (Merck Millipore, katalogové číslo AG310-30MG), vyhodnocené oblasti zahrnuly: hipokampus - DG, hilus, CA3, CA1. Výsledky na Obr. 9 ukazují signifikantní snížení poškození dorsálního hipokampu po aplikaci látky z Příkladu 1. Tyto výsledky jasně dokládají neuroprotektivní účinek látky z Příkladu 1.

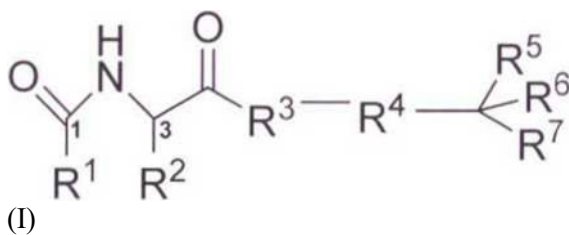
25

Průmyslová využitelnost

Sloučeniny podle předloženého vynálezu budou využitelné pro léčení onemocnění centrálního  
 30 nervového systému, zejména epilepsie a záchvatových stavů u dětí. Kromě toho mohou být použity i k ovlivnění přidružených komorbidit. Jedná se například o deprese, úzkost, schizofrenii podobné chování, neurovývojové poruchy, afektivní poruchy a stresové poruchy. Nárokové látky lze v terapii použít samostatně, ale i jako adjuvantní léčbu k léčivům, která jsou v současné době schválena k terapii.

## PATENTOVÉ NÁROKY

1. sloučeniny obecného vzorce I,



kde

10 R<sup>1</sup> je methyl a potom R<sup>2</sup> jsou dva vodíkové atomy, nebo vodíkový atom a C<sub>1</sub>- C<sub>4</sub> alkyl s přímým nebo rozvětveným uhlíkovým řetězcem,

nebo

15 R<sup>1</sup> a R<sup>2</sup> dohromady tvoří skupinu -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-, kde n=2 nebo 3, který s původními uhlíkovými atomy 1 a 3 v obecném vzorci 1 vytváří pěti nebo šesti členný cyklus,

R<sup>3</sup> je skupina -O-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-O<sub>m</sub>-, kde n = 0-2 a m = 0 nebo 1,

20 R<sup>4</sup> je 3α5β-androstan 3,11,17,17-tetrayl,

R<sup>5</sup> je vodíkový atom nebo hydroxylová skupina,

25 R<sup>6</sup> je atom vodíku a potom R je zvolen ze skupiny, zahrnující atom vodíku, acetylovou skupinu, kyano skupinu, C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub> kyanoalkylovou skupinu, 1,1-difluoroethylovou skupinu a přímý nebo větvený C<sub>1</sub>- C<sub>4</sub> alkyl,

30 nebo R<sup>6</sup> a R<sup>7</sup> společně představují strukturu, zvolenou ze skupiny zahrnující C<sub>1</sub>- C<sub>2</sub> alkyliden, kyanomethylenovou skupinu, atom kyslíku, dva atomy fluoru.

Sloučeniny obecného vzorce I podle nároku 1, zvolené ze skupiny, zahrnující:

35 (3R,5R,8R,9S,10S,13S,14S,17S)-17-Acetyl-10,13-dimethylhexadekahydro-1H-cyklopenta[a]fenantren-3-yl (S)-5-oxopyrrolidin-2-karboxylát (1),

(3R,5R,8R,9S,10S,13S,14S,17S)-17-Acetyl-10,13-dimethylhexadekahydro-1H-cyklopenta[a]fenantren-3-yl (R)-6-oxopiperidin-2-karboxylát (2),

40 (3R,5R,8R,9S,10S,13S,14S,17S)-17-Kyano-10,13-dimethylhexadekahydro-1H-cyklopenta[a]fenantren-3-yl (R)-5-oxopyrrolidin-2-karboxylát (3),

(3R,5R,8R,9S,10S,13S,14S,17S)-17-Acetyl-11-hydroxy-10,13-dimethylhexadekahydro-1H-cyklopenta[a]fenantren-3-yl (S)-5-oxopyrrolidin-2-karboxylát (4),

45 (3R,5R,8R,9S,10S,13S,14S)-10,13-Dimethylhexadekahydro-1H-cyklopenta[a]fenantren-3-yl (S)-5-oxopyrrolidin-2-karboxylát (5),

50 (3R,5R,8R,9S,10S,13S,14S)-10,13-Dimethyl-17-oxohexadekahydro-1H-cyklopenta[a]fenantren-3-yl (R)-5-oxopyrrolidin-2-karboxylát (6),

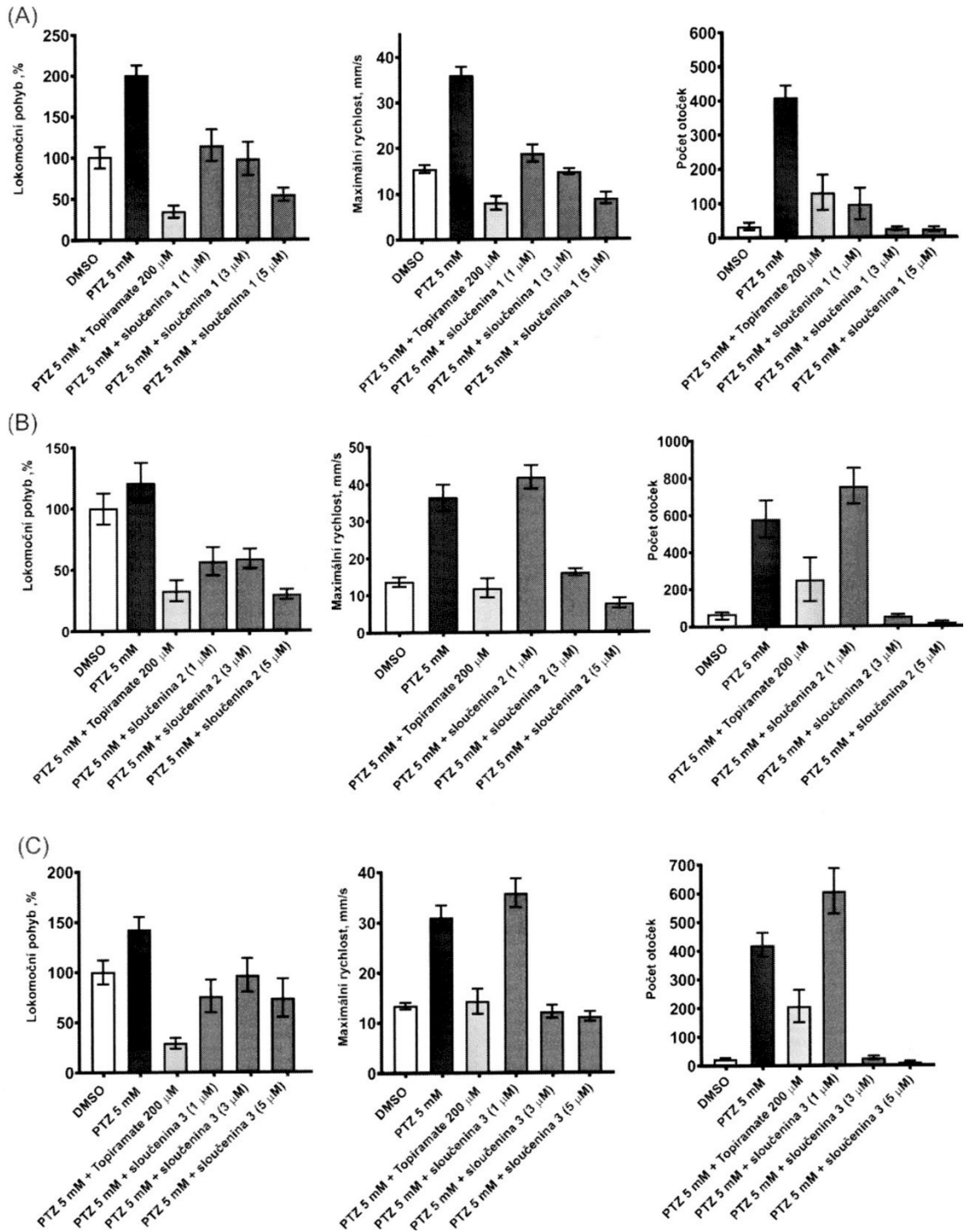
- (3R,5R,8R,9S,10S,13S,14S)-10,13-Dimethylhexadecahydro-1H-cyklopenta[a]fenantren-3-yl (R)-6-oxopiperidin-2-karboxylát (7),
- 5 (3R,5R,8R,9S,10S,13S,14S,17S)-17-Kyano-10,13-dimethylhexadecahydro-1H-cyklopenta[a]fenantren-3-yl (R)-6-oxopiperidin-2-karboxylát (8),
- (3R,5R,8R,9S,10S,13S,14S,17S)-17-Acetyl-10,13-dimethylhexadecahydro-1H-cyklopenta[a]fenantren-3-yl acetylglycinát (9),
- 10 (3R,5R,8R,9S,10S,13S,14S,17S)-17-acetyl-10,13-dimethylhexadecahydro-1H-cyklopenta[a]fenantren-3-yl acetylleucinát (10),
- (3R,5R,8R,9S,10S,13S,14S,17S)-10,13,17-Trimethylhexadecahydro-1H-cyklopenta[a]fenantren-3-yl (S)-5-oxopyrrolidine-2-karboxylát (II).
- 15 (3R,5R,8R,9S,10S,13S,14S,Z)-17-Ethyliden-10,13-dimethylhexadecahydro-1H-cyklopenta[a]fenantren-3-yl (R)-5-oxopyrrolidin-2-karboxylát (12),
- 2-(((3R,5R,8R,9S,10S,13S,14S)-10,13-Dimethylhexadecahydro-1H-cyklopenta[a]fenantren-3-yl)oxy)ethyl (R)-5-oxopyrrolidine-2-karboxylát (13).
- 20 2-(((3R,5R,8R,9S,10S,13S,14S)-10,13-Dimethylhexadecahydro-1H-cyklopenta[a]fenantren-3-yl)oxy)ethyl (S)-6-oxopiperidin-2-karboxylát (14),
- 25 2-(((3R,5R,8R,9S,10S,13S,14S,17S)-17-Acetyl-10,13-dimethylhexadecahydro-1H-cyklopenta[a]fenantren-3-yl)ethyl (R)-5-oxopyrrolidin-2-karboxylát (16),
- 2-(((3R,5R,8R,9S,10S,13S,14S,17S)-17-Acetyl-10,13-dimethylhexadecahydro-1H-cyklopenta[a]fenantren-3-yl)ethyl (R)-6-oxopiperidine-2-karboxylát (17).
- 30
2. Sloučeniny obecného vzorce I podle nároku 1 a konkrétní sloučeniny podle nároku 2, pro použití jako léčiva.
3. Sloučeniny obecného vzorce I podle nároku 1 a konkrétní sloučeniny podle nároku 2 pro použití k léčení epilepsie či onemocnění spojených s křečemi, jako jsou například záchvaty spojené s hypoxií; záchvaty spojené s traumatickým poškozením mozku; záchvaty spojené s intoxikací; patologické změny způsobené hyperexcitací.
- 35
4. Sloučeniny obecného vzorce I podle nároku 1 a konkrétní sloučeniny podle nároku 2, pro použití k léčení stavů, které mohou doprovázet epilepsii, jako jsou afektivní poruchy, deprese, post-traumatické stresové poruchy (PTSD) a nemoci související se stresem, anxieta, schizofrenie a psychotické poruchy, související ischemické poškození CNS, neurodegenerativní změny a poruchy, roztroušená skleróza.
- 40
5. Sloučeniny obecného vzorce I podle nároku 1 a konkrétní sloučeniny podle nároku 2, pro použití k výrobě veterinárního nebo humánního farmaceutického přípravku k léčení epilepsie či onemocnění spojených s křečemi, jako jsou například záchvaty spojené s hypoxií; záchvaty spojené s traumatickým poškozením mozku; záchvaty spojené s intoxikací; patologické změny způsobené hyperexcitací.
- 45
6. Farmaceutický prostředek pro humánní i veterinární použití, **vyznačující se tím**, že obsahuje jako aktivní složku sloučeninu obecného vzorce I podle nároku 1 a/nebo sloučeninu podle nároku 2.
- 50
7. Farmaceutický prostředek podle nároku 6 pro použití k léčení epilepsie či onemocnění
- 55

spojených s křečemi, jako jsou například záchvaty spojené s hypoxií; záchvaty spojené s traumatickým poškozením mozku; záchvaty spojené s intoxikací; patologické změny způsobené hyperexcitací.

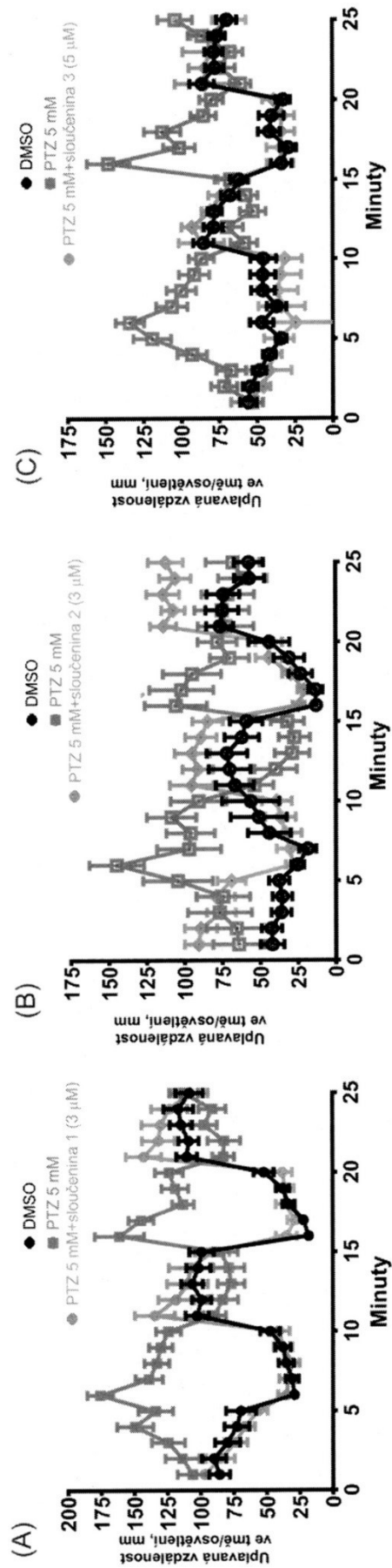
- 5 8. Farmaceutický prostředek podle nároku 6 pro použití k léčení stavů, které mohou doprovázet epilepsii, jako jsou afektivní poruchy, deprese, post-traumatické stresové poruchy (PTSD) a nemoci související se stresem, anxieta, schizofrenie a psychotické poruchy, související ischemické poškození CNS, neurodegenerativní změny a poruchy, roztroušená skleróza.
- 10 9. Použití sloučenin podle obecného vzorce I podle nároku 1 pro výrobu 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 vůči onemocněním spojených s křečemi.

15

9 výkresů

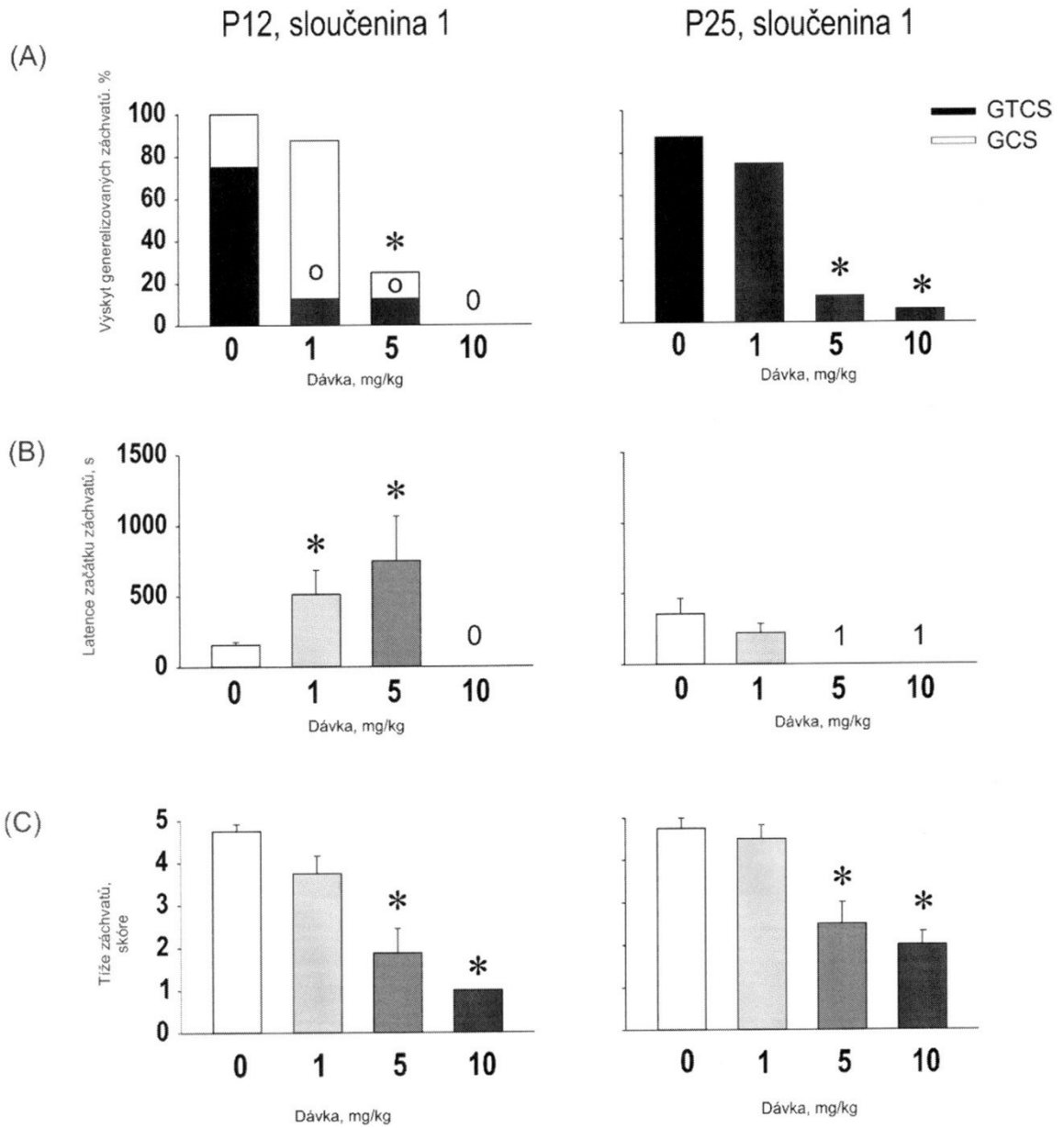


Obr. 1

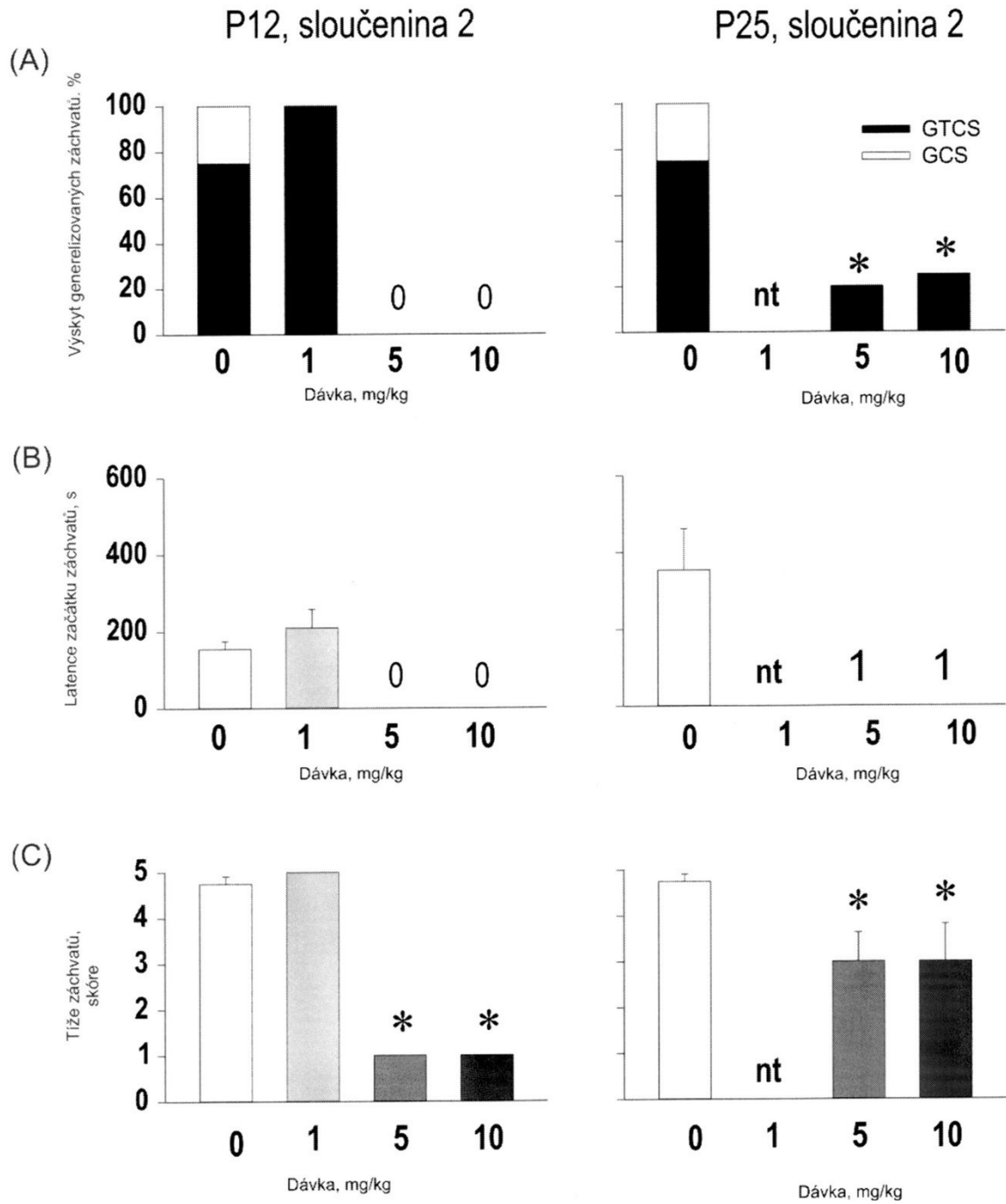


Obr. 2

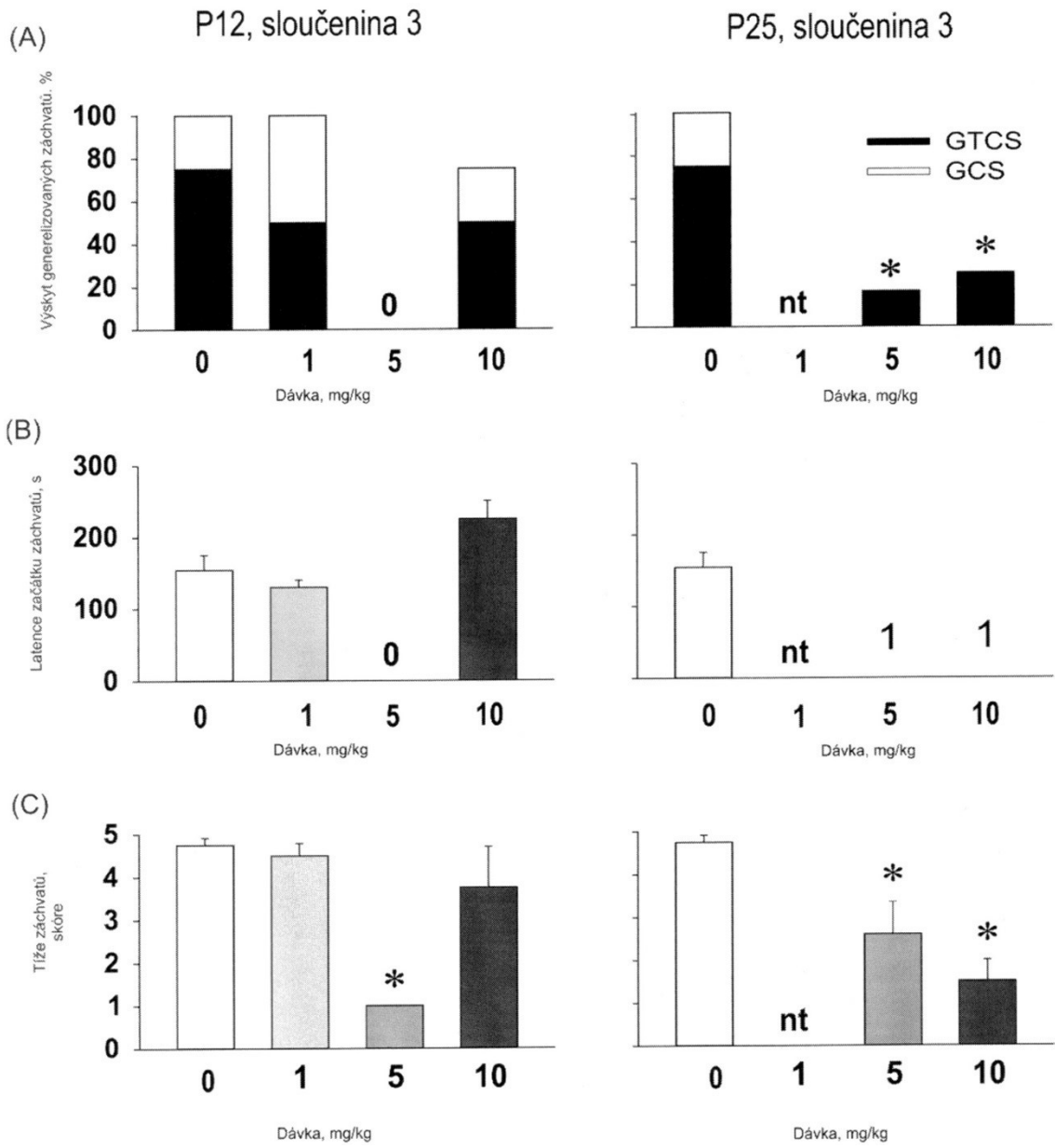




Obr. 3

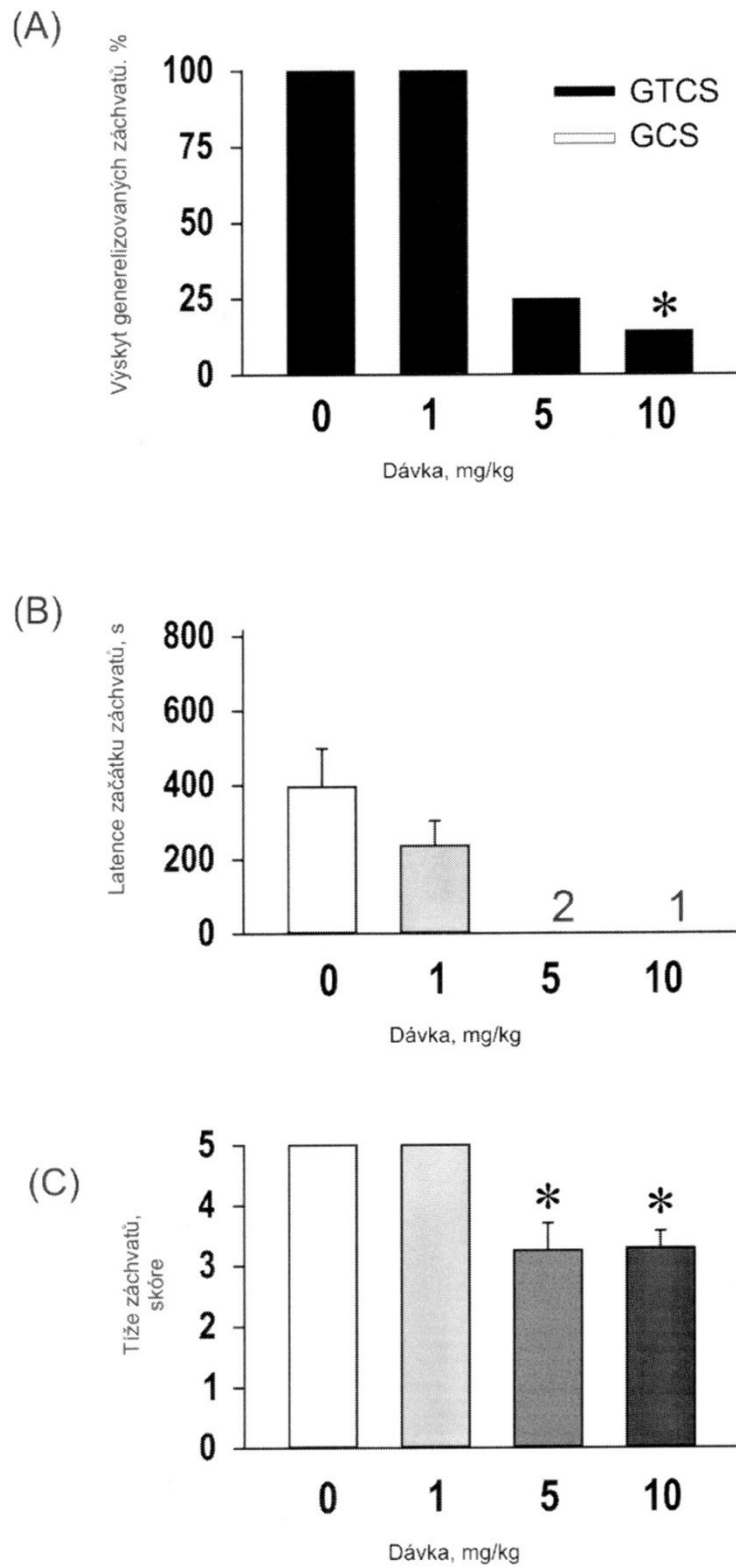


Obr. 4

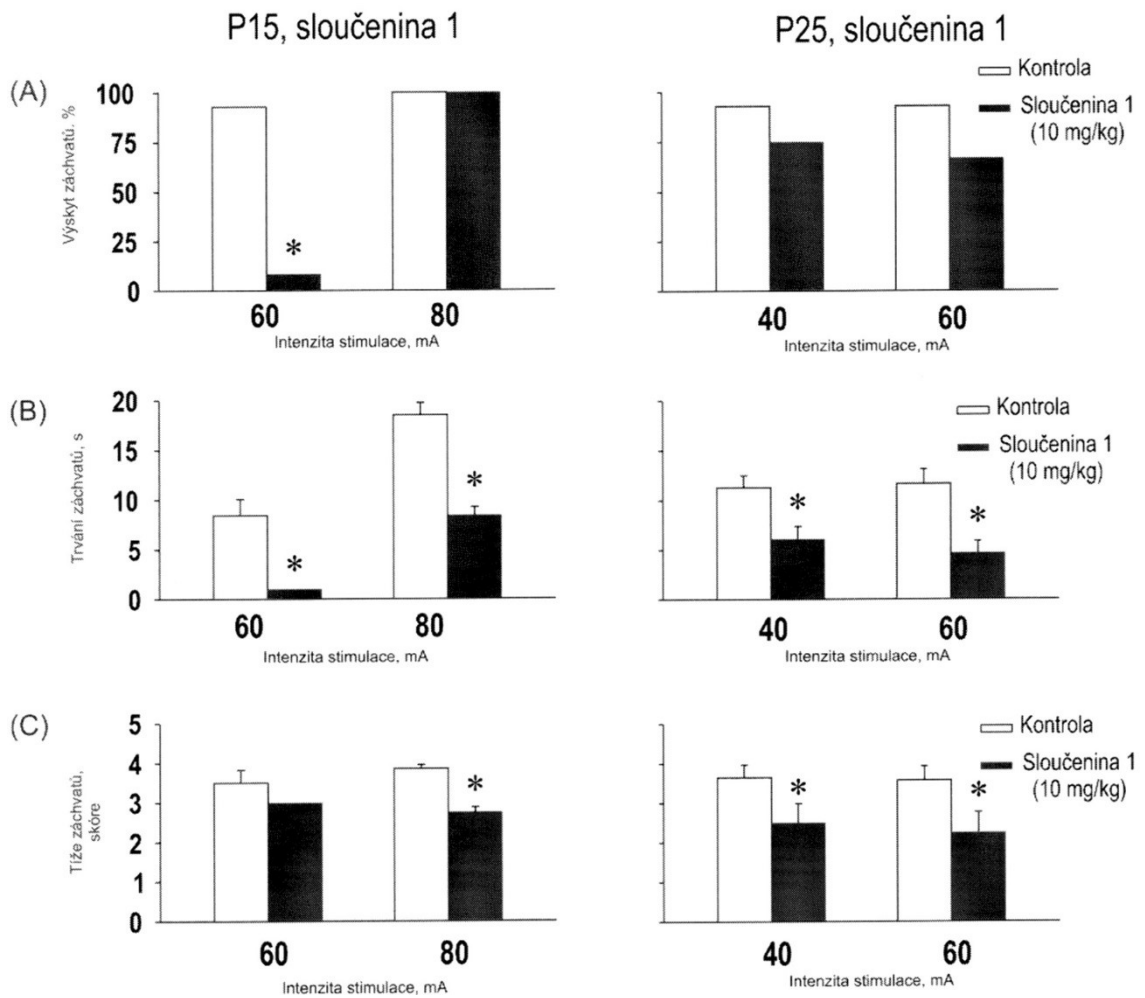


Obr. 5

P60, sloučenina 1

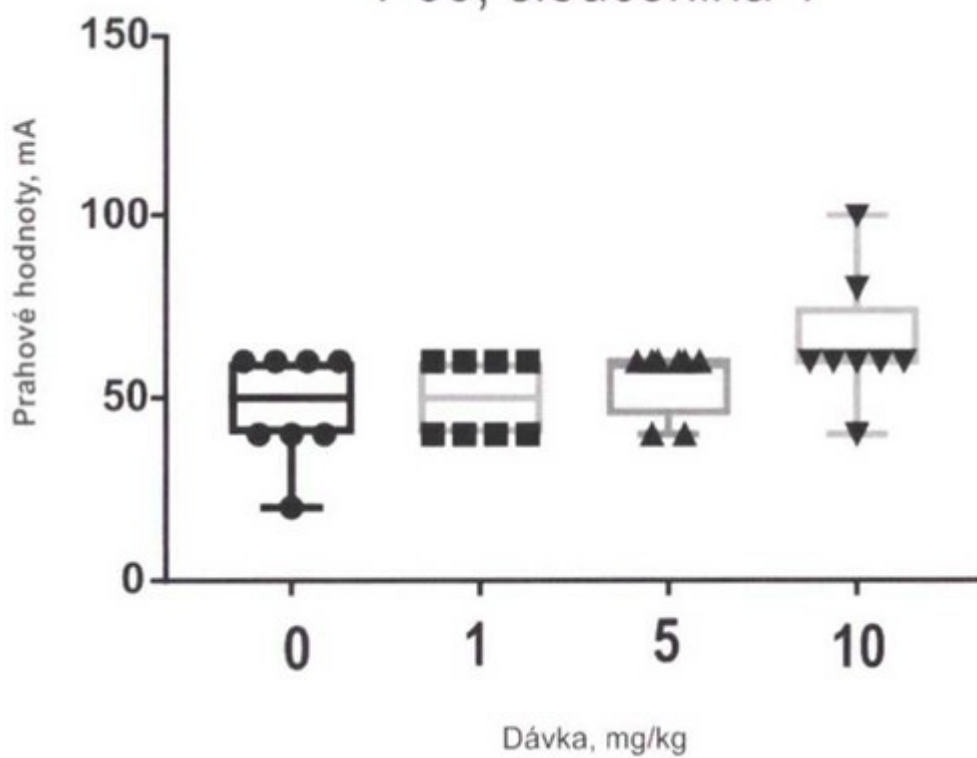


Obr. 6

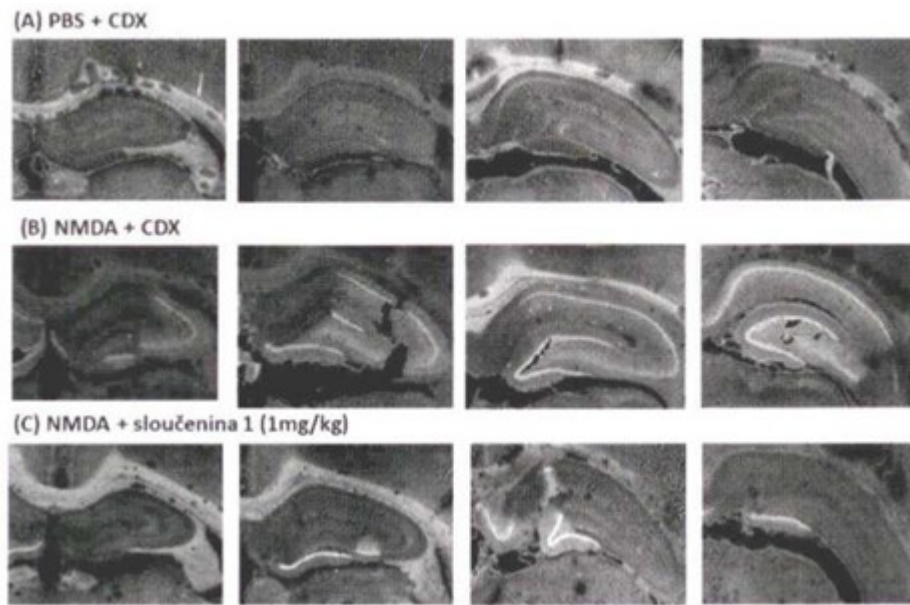


Obr. 7

### P60, sloučenina 1



Obr. 8



Obr. 9