

# PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

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

(19)  
ČESKÁ  
REPUBLICKA



ÚŘAD  
PRŮMYSLOVÉHO  
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **28.05.2009**  
(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **08.12.2010**  
(Věstník č. 49/2010)

(21) Číslo dokumentu:

**2009-348**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.:  
**C07J 5/00** (2006.01)  
**A61K 31/57** (2006.01)  
**A61P 25/00** (2006.01)

(71) Přihlašovatel:

Ústav organické chemie a biochemie, Akademie věd ČR,  
v. v. i., Praha 6, CZ  
Fyziologický ústav Akademie věd ČR, v. v. i., Praha 4,  
CZ  
Psychiatrické centrum Praha, Praha 8, CZ

(72) Původce:

Chodounská Hana RNDr. CSc., Praha 6, CZ  
Šťastná Eva Mgr. Ph.D., Přerov I - město, CZ  
Kapras Vojtěch Bc., Praha 7, CZ  
Kohout Ladislav RNDr. DrSc., Praha 6, CZ  
Borovská Jiřina Mgr., Tuklaty, CZ  
Vyklícký Ladislav MUDr. DrSc., Kamenice, CZ  
Valeš Karel RNDr. Ph.D., Praha 5 Zbraslav, CZ  
Čais Ondřej Ing., Praha 6, CZ  
Rambousek Lukáš Bc., Kopřivnice, CZ  
Stuchlík Aleš RNDr. Ph.D., Čelákovice, CZ  
Valešová Věra RNDr. Ph.D., Lysá nad Labem, CZ

(74) Zástupce:

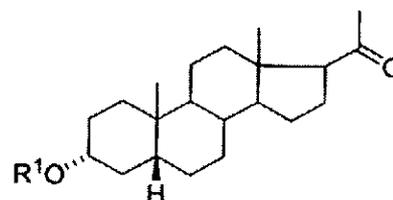
Ing. Václav Herman, Hlavní 43, Průhonice, 25243

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Steroidní anionické sloučeniny, způsob jejich výroby, jejich použití a farmaceutický přípravek je obsahující**

(57) Anotace:

Sloučeniny obecného vzorce I, v němž R<sup>1</sup> znamená jak uvedeno v popisu, způsobu výroby sloučenin obecného vzorce I, v němž R<sup>1</sup> znamená jak uvedeno v popisu, použití sloučenin obecného vzorce I pro léčení různých onemocnění CNS, pro léčení neuropsychiatrických poruch souvisejících s dysbalancemi glutamatergního neuropřenašedového systému, ischemické poškození CNS, neurodegenerativní změny a poruchy CNS, afektivní poruchy, deprese, PTSD a nemoci související se stresem, anxieta, schizofrenie a psychotické poruchy, bolest, závislosti, roztroušená skleróza, epilepsie, gliomy. Použití sloučenin obecného vzorce I pro výrobu veterinárního a humánního farmaceutického přípravku pro léčení uvedených onemocnění a rovněž použití této sloučeniny pro výrobu látek používaných v experimentálním výzkumu, analytické chemii, potravinovém doplňku či v kosmetickém přípravku.



Steroidní anionické sloučeniny, způsob jejich výroby, jejich použití a farmaceutický přípravek je obsahující

### Oblast techniky

Tento vynález se týká steroidních anionických sloučenin, způsobu jejich výroby, jejich použití a farmaceutického přípravku je obsahující. Zvláště se tento vynález týká derivátů pregnanolonu substituovaných v poloze 3alfa, které mají v této poloze anionickou skupinu. Tyto deriváty jsou užitečné pro léčení některých onemocnění centrálního nervového systému (CNS), zvláště pak pro ischemické poškození CNS, neurodegenerativní změny a poruchy, afektivní poruchy, deprese, post-traumatické stresové poruchy (PTSD) a nemoci související se stresem, anxieta, schizofrenii a psychotické poruchy, bolest, závislosti a roztroušenou sklerózu, epilepsii a gliomy.

### Dosavadní stav techniky

Glutamát je hlavním excitačním neuropřenašečem v centrálním nervovém systému savců. Během výlevu glutamátu z presynaptické terminály odpovědi post synaptického neuronu vznikají prostřednictvím ionotropních a metabotropních glutamátových receptorů. Metabotropní receptory fungují prostřednictvím vazby na G-proteiny a mobilizují vápníkové ionty z intracelulárních kompartmentů. Aktivace ionotropních receptorů vede ke zvýšení propustnosti postsynaptické membrány pro sodné, draselné a vápenaté kationty otevřením iontových kanálů, které jsou součástí receptorů.

Mezi ionotropní glutamátové receptory patří N-methyl-D-aspartátové receptory (NMDAR), AMPA a kainátové receptory. Ačkoliv současné poznatky naznačují úlohu různých podtypů rodiny glutamátových receptorů v glutamátém 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. Současné výzkumy ukazují, že kromě vápníku, i zvýšení intracelulárních hladin  $\text{Na}^+$  může vést k zániku neuronů. U neuronů v hipokampální kultuře a v retině může vést aktivace glutamátových receptorů k poškození neuronů prostřednictvím  $\text{Na}^+$  kationtů, dokonce i bez přítomnosti extracelulárního vápníku. Nicméně, toxicita vyšších hladin glutamátu je zpravidla spojována se vzestupem intracelulárních hladin  $\text{Ca}^{2+}$ . V současnosti je poměrně dobře prokázáno, že existuje přímý vztah mezi nadměrným průnikem vápníku do buněk a glutamátém

navozeným poškozením neuronů. Glutamátem vyvolané patologické zvýšení intracelulárního vápníku je připisováno déletrvajícím aktivaci ionotropních glutamátových receptorů. Zvýšení intracelulárního vápníku může spustit sestupnou neurotoxickou kaskádu, která zahrnuje odprážení mitochondriálního elektronového transportu od syntézy ATP, a nadměrnou aktivaci enzymů jako kalpain a dalších proteas, proteinkinas, syntézy NO, kalcineurinů a endonukleas. Změny v aktivitě těchto neuronů mohou vést k produkci toxických reaktivních molekul jako volných kyslíkových radikálů (oxid dusný, superoxid, peroxid vodíku), ke změnám v architektuře cytoskeletu a k aktivaci genetických signálů vedoucích k apoptóze a k poškození funkce mitochondrií (Villman a Becker, 2007).

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 (NMDA antagonistů) 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 nabízejí možnost hledat sloučeniny selektivně ovlivňující pouze určitou skupinu NMDA receptorů a tím omezit výskyt neočekávaných a nežádoucích účinků při zachování neuroprotektivního působení.

Předchozí výsledky ukázaly, že přirozeně se vyskytující  $3\alpha5\beta$  pregnanolon-sulfát *use-dependentním* způsobem ovlivňuje aktivitu NMDA receptorů. V důsledku tohoto mechanismu působení má výraznější inhibiční působení na NMDA receptorech tonicky aktivovaných glutamátem než na fáziicky aktivovaných NMDA receptorech během synaptického přenosu. Právě aktivace extrasynaptických tonicky aktivovaných NMDA receptorů je zásadní pro excitotoxické působení glutamátu (Petrovic et al., 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. Předpokládaný neuroprotektivní mechanismus účinku je tedy blokace excesivního vstupu vápníku do buňky prostřednictvím dlouho otevřených NMDA receptorů. K ostatním typům NMDA receptorů

nemají tyto sloučeniny afinitu, předpokládáme tedy, že nebudou ovlivňovat přenos signálu mezi neurony.

V posledním desetiletí se biomedicínský výzkum soustředil na studium role neurosteroidů v patofyziologii řady neuropsychiatrických chorob a zhodnocení jejich terapeutického potenciálu. Mechanismus účinku neurosteroidů je spojován s jejich aktivitou na NMDA a GABA<sub>A</sub> receptorech. Řada experimentálních studií na animálních modelech poukazuje na jejich potenciál v léčbě řady nemocí centrálního nervového systému, především neurodegenerativních chorob, roztroušené sklerózy, afektivních poruch, alkoholismu, bolesti, insomnie či schizofrenie (Morrow, 2007; Weaver, 2000).

Neurosteroidy hrají zásadní roli také v regulaci reaktivity na stres a s tím souvisejícími poruchami CNS. Hladina neurosteroidů krátkodobě po vystavení stresu stoupá, jedná se o adaptivní mechanismus. Naproti tomu experimentální modely chronického stresu a deprese u laboratorních hlodavců ukazují sníženou koncentraci neurosteroidů jak v mozku, tak v plasmě. 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.

Steroidní sloučeniny ovlivňují aktivitu a plasticitu neuronů a gliových buněk během časného vývoje, a později ve vývoji hrají důležitou trofickou a neuroprotektivní roli v dospělém nervovém systému. Steroidy jsou produkovány pohlavními žlázami a nadledvinkami, stejně tak jako v CNS. Do mozku, prodloužené míchy a periferních nervů se steroidní sloučeniny dostávají krevním řečištěm. Nicméně, některé steroidy (neurosteroidy) jsou produkovány přímo v centrální nervové soustavě. 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 interakce mezi více typy buněk. Například syntéza progesteronu Schwannovými buňkami u periferních nervů je regulována difuzními signály z neuronů.

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 poškozením buněk, před peroxidací lipidů a indukcí specifických enzymů.

Například po přetěti spinální míchy potkanů, progesteron zvyšuje počet astrocytů exprimujících *NO*-syntázu těsně nad a pod místem přetěti.

Tento steroid rovněž hraje roli v regulaci formování nových myelinových pochev. To bylo ukázáno u regenerujícího potkaního *nervus sciaticus* v kultuře sensorických neuronů a Schwannových buněk. Progesteron rovněž posiluje myelinizaci prostřednictvím aktivace genů kódujících proteiny účastnící se myelinizace.

Jak již bylo řečeno, neurosteroidy významně modulují funkci membránových receptorů pro neuropřenašeče, zejména GABA<sub>A</sub> receptorů, NMDA receptorů a sigma1 – receptorů. Tyto mechanismy jsou zodpovědné za psychofarmakologické účinky steroidů a částečně vysvětlují jejich antikonvulzivní, anxiolytické, neuroprotektivní a sedativní účinky, stejně jako jejich vliv na procesy učení a paměti. Například u pregnanolon-sulfátu bylo prokázáno, že je schopen zvrátit kognitivní deficit u zvířat 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 doklady o přímé vazbě na glukokortikoidní receptor, modulují účinek kortikoidů nepřímo prostřednictvím interakcí s proteinkinasami A, C, MAPK nebo CAMK. Navíc byl prokázán vliv pregnanolonu a pregnanolon-sulfátu na proteiny asociované s mikrotubuly a akceleraci polymerace mikrotubulů, čímž dochází k ovlivnění neuronální plasticity. Tyto nově popsané účinky neurosteroidů jsou dosud velmi málo prozkoumané, nicméně lze předpokládat jejich roli v neuroprotektivitě.

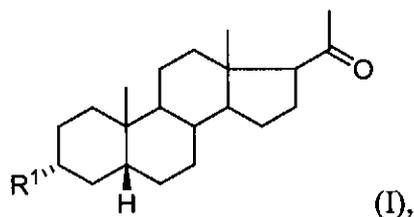
Sulfátové estery neurosteroidů hrají fyziologickou roli v regulaci receptorů excitačních i inhibičních neuropřenašečů a participují na přirozených protektivních vlastnostech tkáně centrálního nervového systému. Sulfatované estery a jejich analogy jsou nadějnými molekulami v terapii chorob centrálního nervového systému. Nicméně v nervové tkáni je enzymaticky udržován poměr mezi neurosteroidy a jejich sulfatovanými estery. Umělé podání sulfatovaných esterů v důsledku enzymové aktivity nemusí vést k zlepšení sledovaných funkcí. Námi předkládané molekuly představují metabolicky stabilnější analogy sulfatovaných esterů. Navíc vzhledem ke své struktuře snadněji procházejí přes hematoencefalickou bariéru. Sulfatované a tedy polární steroidní sloučeniny obecně nepronikají hematoencefalickou bariérou, ale bylo zjištěno že *i.v.* podaný pregnanolon-sulfát proniká přes hematoencefalickou bariéru. V transportu sulfatovaných analogů se pravděpodobně uplatňují aktivní mechanismy spojené s

transportním proteinem organických iontů (OATP), který je exprimován v buňkách mozkové tkáně.

Výhodou zde popsaných sloučenin je to, že si uchovávají podobné farmakologické i fyziologické vlastnosti jako pregnanolon-sulfát, který má terapeutický potenciál, přičemž ale nejsou odbourávány sulfatasami.

### Podstata vynálezu

Tento vynález se týká sloučenin obecného vzorce I



v němž

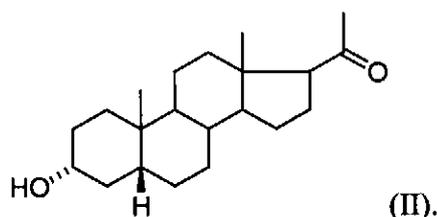
$R^1$  znamená skupinu obecného vzorce  $R^3OOC-R^2-C(R^4)-R^5-$ , kde  $R^2$  znamená alkylovou nebo alkenylovou skupinu s 1 až 18 atomy uhlíku s přímým nebo větveným uhlíkovým řetězcem, které mohou být substituovány jedním nebo více atomy halogenu, aminovou skupinou, která může být buď volná nebo chráněná odstranitelnou chránicí skupinou, alkoxykarbonylovou skupinou, aromatickou skupinou a/nebo heterocyklickou skupinou, kde heteroatom znamená atom kyslíku, síry nebo dusíku,  $R^3$  znamená buď atom vodíku nebo chránicí skupinu karboxylové skupiny, s výhodou benzylovou skupinu,  $R^4$  znamená atom kyslíku, atom dusíku nebo atom síry vázaný dvojnou vazbou nebo  $R^4$  znamená dva atomy vodíku, a  $R^5$  znamená jakýkoliv minimálně dvojnásobný atom, s výhodou atom kyslíku, atom dusíku nebo atom uhlíku, kromě toho, kdy  $R^2$  znamená skupinu  $(CH_2)_n$ , kde  $n = 0-3$ , a současně  $R^3$  znamená atom vodíku a  $R^4$  i  $R^5$  znamenají atom kyslíku.

Vynález je založen na výsledcích našich pokusů v nichž jsme zkoumali vliv pregnanolon-sulfátu na nativní a rekombinantní NMDA receptory. Ty ukázaly, že tento přirozeně se vyskytující neurosteroid inhibuje odpovědi vyvolané exogenní aplikací specifických agonistů NMDA receptorů. Ukázali jsme, že se pregnanolon-sulfát váže pouze na aktivované receptory (use-dependentní účinek), ale neváže se do iontového kanálu jako některé látky typu -  $Mg^{2+}$ , ketamin, dizocilpin nebo memantin. Rychlost vazby a mechanismus účinku pregnanolon-sulfátu má za následek vyšší inhibiční působení na receptory tonicky aktivované

glutamátem než na fázičky aktivované receptory během synaptického přenosu. Nově syntetizované analogy, kterých se týká vynález, mají stejný mechanismus působení na NMDA receptorech jako pregnanolon-sulfát.

Navíc aplikace pregnanolon-sulfátu v důsledku enzymové aktivity v CNS nevede k zlepšení sledovaných funkcí. Námi předkládané molekuly představují sulfatasami nehydrolyzovatelné analogy.

Dále se tento vynález týká způsobu výroby shora uvedených sloučenin obecného vzorce I, kde  $R^1$  znamená jak shora uvedeno. Při výrobě sloučenin uvedeného vzorce I, v němž  $R^1$  znamená jak shora uvedeno a  $R^5$  znamená atom kyslíku, se vychází ze 3alfa-hydroxy-5beta-pregnan-20-onu vzorce II



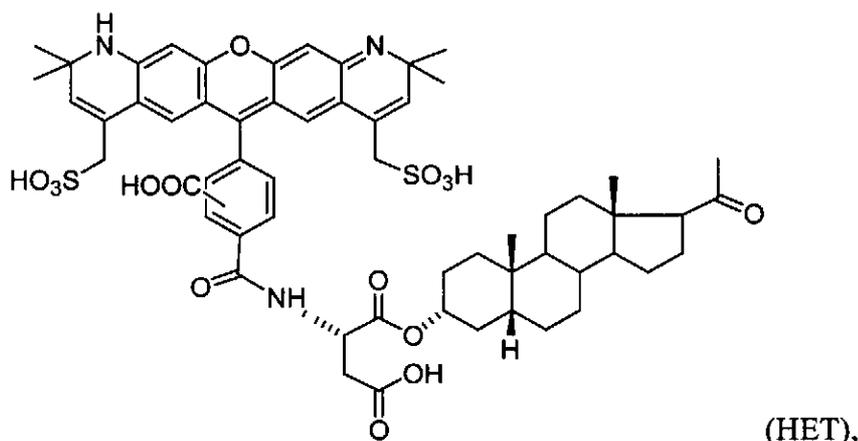
Tato sloučenina vzorce II se může převést na sloučeninu obecného vzorce I, kde  $R^1$  znamená jak shora uvedeno a  $R^4$  znamená atom kyslíku, následujícím způsobem: Příslušná dikyselina, popřípadě chráněná na aminové skupině a popřípadě chráněná na jedné karboxylové skupině, se rozpustí ve vhodném rozpouštědle, kterým se ze směsi mohou oddestilováním odstranit zbytky vody, s výhodou v benzenu nebo toluenu, nejvýhodněji v benzenu. Po odstranění vody oddestilováním části rozpouštědla se reakční směs, ke které je zabráněn přístup vody vhodným způsobem známým z oblasti techniky, ochladí na laboratorní teplotu. Pod inertní atmosférou se pomalu přidá kondenzační činidlo, s výhodou DCC, a roztok sloučeniny vzorce II ve vhodném rozpouštědle, s výhodou v aromatickém uhlovodíku, výhodněji v benzenu nebo toluenu, nejvýhodněji v benzenu za přítomnosti katalytického činidla, s výhodou DMAP. Tato reakční směs se míchá 10-48 hodin, s výhodou přes noc, za teploty od 0 do 50 °C, s výhodou za teploty místnosti. Druhý den se směs nalije do nasyceného vodného roztoku hydrogenuhličitanu, s výhodou  $\text{NaHCO}_3$  nebo  $\text{KHCO}_3$ , a produkt se extrahuje organickým rozpouštědlem, ve kterém je dobře rozpustný, například a s výhodou ethyl-acetátem, a spojené organické fáze se promývají vodou do odstranění přítomného hydrogenuhličitanu. Vysrážená  $\text{N,N}'$ -dicyklohexylmočovina se odfiltruje, filtrát se vysuší sušícím činidlem, s výhodou síranem hořečnatým

nebo síranem sodným, nejvýhodněji síranem sodným, a rozpouštědlo se odpaří, s výhodou oddestilováním ve vakuu. Získaný produkt se popřípadě přečistí, s výhodou chromatografií na sloupci silikagelu. Takto se získá sloučenina obecného vzorce I, v němž  $R^1$  znamená skupinu obecného vzorce  $R^3OOC-R^2-CO-$ , kde  $R^2$  znamená alkylovou nebo alkenylovou skupinu s 1 až 18 atomy uhlíku s přímým nebo větveným uhlíkovým řetězcem, které mohou být substituovány jedním nebo více atomy halogenu, aminovou skupinou, která je chráněná odstranitelnou skupinou, a  $R^3$  znamená chránící skupinu karboxylové skupiny, s výhodou benzylovou skupinu.

Pokud ve sloučenině vzorce I symbol  $R^3$  znamená benzylovou chránící skupinu, je nutné odstranění této chránící skupiny, které se provádí tak, že se získaná sloučenina rozpustí ve vhodném rozpouštědle, s výhodou v alkoholu, nejvýhodněji v methanolu, a k tomuto roztoku se přidá hydrogenační katalyzátor, s výhodou Pd/CaCO<sub>3</sub>. Po hydrogenaci se katalyzátor odfiltruje a rozpouštědlo se odpaří. Získá se tak produkt obecného vzorce I, v němž  $R^1$  znamená skupinu obecného vzorce  $R^3OOC-R^2-CO-$ , kde  $R^2$  znamená alkylovou nebo alkenylovou skupinu s 1 až 18 atomy uhlíku s přímým nebo větveným uhlíkovým řetězcem, které mohou být substituovány jedním nebo více atomy halogenu, aminovou skupinou, která je chráněná odstranitelnou skupinou, a  $R^3$  znamená atom vodíku.

Pokud získaná sloučenina obecného vzorce I, v němž  $R^1$  znamená skupinu obecného vzorce  $R^3OOC-R^2-CO-$ , kde  $R^2$  znamená alkylovou nebo alkenylovou skupinu s 1 až 18 atomy uhlíku s přímým nebo větveným uhlíkovým řetězcem, které mohou být substituovány jedním nebo více atomy halogenu, aminovou skupinou, která je chráněná odstranitelnou skupinou, a  $R^3$  znamená atom vodíku, obsahuje aminovou skupinu, která je chráněná odstranitelnou skupinou, provede se v následujícím stupni odblokování chránění aminové skupiny a to tak, že se tato sloučenina rozpustí v organickém rozpouštědle, s výhodou v dichlormethanu, a přidá se trifluoroctová kyselina. Tato směs se nechá reagovat 0,1 až 48 hodin, s výhodou 16 hodin, při teplotě v rozmezí od 0 °C do 50 °C, s výhodou za teploty místnosti. Po ukončení reakce se odstraní rozpouštědla, odparek se opět rozpustí v organickém rozpouštědle, s výhodou v methanolu, přidá se pyridin a směs se odpaří dosucha. Získá se tak produkt obecného vzorce I, v němž  $R^1$  znamená skupinu obecného vzorce  $R^3OOC-R^2-CO-$ , kde  $R^2$  znamená alkylovou nebo alkenylovou skupinu s 1 až 18 atomy uhlíku s přímým nebo větveným uhlíkovým řetězcem, které mohou být substituovány jedním nebo více atomy halogenu, aminovou skupinou, a  $R^3$  znamená atom vodíku.

Pokud  $R^2$  obsahuje heterocyklickou skupinu, jako je tomu například ve sloučnině vzorce HET



může být do molekuly obecného vzorce I zavedena například reakcí aktivované karboxylové skupiny s aminovým substituentem na alkylovém řetězci  $R^2$ . Karboxylová skupina může být funkcionalizována aktivační skupinou (např. hydroxybenzotriazolovou, substituovaným hydroxybenzotriazolem, HATU, TATU, s výhodou TSTU jako sukcinimidyl ester). Tento ester reaguje se sloučeninou obecného vzorce I, v němž  $R^2$  znamená alkylovou skupinu substituovanou aminovou skupinou. Opět se tak získá sloučenina obecného vzorce I, v němž  $R^2$  znamená alkylovou skupinu substituovanou aminovou skupinou s navázanou heterocyklickou skupinou (HET).

Analogickým způsobem může zručný odborník z oblasti techniky připravit obdobné sloučeniny obecného vzorce I, v němž  $R^2$  znamená jak shora uvedeno.

Thiosloučeniny a amidy mohou být připraveny analogickými postupy z látek obecného vzorce I, kde R znamená atom síry (například jak popisují Swan, Turnbull, *Tetrahedron* 22, 1966, str. 231), případně atom dusíku (například jak popisují Schmitt J., Panouse J.J., Hallot A., Pluchet H., Comoy P.: *Bull Soc. Chim. France* 1962, str. 1846).

Dalším předmětem tohoto vynálezu je použití sloučenin obecného vzorce I, kde  $R^1$  znamená jak shora uvedeno, pro výrobu léčiva pro léčení neuropsychiatrických poruch souvisejících s dysbalancemi glutamatergního neuropřenaševého systému, zvláště ischemické poškození CNS, neurodegenerativní změny a poruchy CNS, afektivní poruchy, deprese, PTSD a

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

Různé strukturální modifikace námi připravených sloučenin obecného vzorce I ukázaly pouze minimální rozdíly v biologické účinnosti, tyto nálezy potvrzují předchozí elektrofyziologické výsledky (*patch-clamp*) sledující kinetiku vazby těchto látek na NMDA receptory. Proto jsme vybrali molekulu pregnanolon-glutamátu z příkladu 9 [dále: sloučenina z příkladu 9; sloučenina obecného vzorce I, v němž  $R^1$  znamená skupinu  $-\text{CH}(\text{NH}_2)-(\text{CH}_2)_2-\text{COOH}$ ], kterou jsme podrobili podrobnému testování jednak v souvislosti s jejím neuroprotektivním působením na excitotoxickou hipokampální lézi (pomocí NMDA; sloučenina z příkladu 9), jednak testování jejího potenciálního vlivu na chování při aplikaci této sloučeniny samotné a jejího srovnání s látkou (dizocilpin), známou z odborné literatury, nekompetitivním antagonistou NMDA receptorů, který sice vykazuje neuroprotektivní účinky ve specifických uspořádáních, ale řada důkazů z literatury dokazuje jeho výrazné psychotomimetické vedlejší účinky ve zvířecích modelech.

#### Biologická aktivita na buněčných kulturách

*Primárně disociované hipokampální kultury* byly připraveny z 1-2 denních potkanů. Zvířata byla dekapitována a následně byl izolován hipokampus. Buněčná suspenze byla připravena rozvolněním pomocí trypsinu a mechanické disociace. Buňky byly nasazeny na 25mm nebo 12mm polylysinem potažená krycí sklíčka v hustotě 500 000 buněk/cm<sup>2</sup>. Neuronální kultury byly udržovány v mediu Neurobasal<sup>TM</sup>-A (Invitrogen, Carlsbad, USA) doplněného glutaminem (0,5 mM) a B-27 Serum-Free Supplement (Invitrogen) při 37 °C a 5 % CO<sub>2</sub>.

*HEK293 buňky* (American Type Culture Collection, ATTC No. CRL1573, Rockville, MD) byly kultivovány v mediu Opti-MEM® I (Invitrogen) s přidavkem 5% fetálního telecího séra při 37 °C a transfekovány NR1-1a/NR2B/GFP plasmidy, jak bylo popsáno dříve (Cais et al., 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, Německo) a přidána ke konfluentním HEK293 buňkám kultivovaným v 24-jamkové destičce. Po trypsinizaci byly buňky resuspendovány v Opti-MEM® I obsahujícím 1% fetální telecí sérum. Do směsi bylo dále přidáno 20 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM D,L-2-amino-5-fosfonopentanové kyseliny, 3 mM kynurenové kyseliny, ketamin a buňky byly nasazeny na polylysinem potažená krycí sklíčka o

průměru 25 mm. Pro transfekci byly použity následující geny kódující podjednotky NMDA receptorů: NR1-1a (GenBank accession no. U08261) a NR2B (GenBank accession no. M91562).

Pro elektrofyziologické pokusy byly použity 5-10 dní staré hipokampální kultury nebo kultury HEK293 buněk 16-40 hodin po transfekci. Proudové odpovědi 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 ( $<10 \text{ M}\Omega$ ) 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 mM D-glukonové kyseliny, 15 mM chloridu cesného, 5 mM EGTA, 10 mM HEPES, 3 mM chloridu hořečnatého, 0,5 mM chloridu vápenatého a 2 mM hořečnaté soli ATP (pH upraveno na 7,2 roztokem hydroxidu cesného). Extracelulární roztok (ECS) obsahoval 160 mM chloridu sodného, 2,5 mM chloridu draselného, 10 mM HEPES, 10 mM glukózy, 0,2 mM EDTA a 0,7 mM chloridu vápenatého (pH upraveno na 7,3 roztokem hydroxidu sodného). Glycin byl přidán jak do testovacího, tak do kontrolního roztoku. K hipokampálním kulturám byl ještě navíc přidán bicuculin (10  $\mu\text{M}$ ) a tetrodotoxin (0,5  $\mu\text{M}$ ). Roztoky se steroidem byly připraveny z čerstvě připraveného zásobního roztoku (20 mM) steroidu rozpuštěného v dimethylsulfoxidu (DMSO). Ve všech extracelulárních roztocích byla použita stejná koncentrace DMSO. Kontrolní a testovací roztoky byly aplikovány mikroprocesorem kontrolovaným systémem promývání, s rychlostí výměny roztoku v okolí buňky  $\sim 10 \text{ ms}$ .

#### Stručný popis obrázků

Obrázek 1: znázorňuje proudové odpovědi vyvolané aplikací 1 mM glutamátu a vlivu neurosteroidu z příkladu 9 aplikovaného v koncentraci 200  $\mu\text{M}$  současně s glutamátem. Snímání bylo pořízeno technikou patch-clamp z kultivovaných HEK293 buněk transfekovaných NR1/NR2B receptory. Míra inhibice vyvolaná neurosteroidem byla vypočtena podle vzorce:  $(1 - a/b) \cdot 100 (\%)$ .

Obrázek 2: Horní panel. Celková ušlá dráha jako měřítko spontánní pohybové aktivity v testu otevřeného pole se nelišila mezi kontrolními zvířaty a těmi, jimž byla aplikována samotná sloučenina z příkladu 9.

Obrázek 2: Dolní panel: Prepulzní inhibice úlekové reakce rovněž nebyla signifikantně ovlivněna aplikací samotné sloučeniny z příkladu 9.

Obr. 3. ukazuje celkovou ušlou dráhu za každé sezení v úloze AAPA, a to aplikaci dizocilpinu a sloučeniny z příkladu 9. \* značí signifikantní rozdíl oproti kontrolám ( $P < 0,05$ ).

Obr. 4. ukazuje počet vstupů do zakázané oblasti jako měřítko kognitivních funkcí za každé sezení v úloze AAPA, a to aplikaci dizocilpinu a sloučeniny z příkladu 9. \* značí signifikantní rozdíl oproti kontrolám ( $P < 0,05$ ), statistické rozdíly byly vyhodnocovány v posledním sezení, kdy je přítomná asymptotická úroveň u kontrol.

Obr. 5. ukazuje maximální dobu vyhýbání jako měřítko kognitivních funkcí za každé sezení v úloze AAPA, a to aplikaci dizocilpinu a sloučeniny z příkladu 9. \* značí signifikantní rozdíl oproti kontrolám ( $P < 0,05$ ), statistické rozdíly byly vyhodnocovány v posledním sezení, kdy je přítomna asymptotická úroveň.

Obr. 6 ukazuje vliv sloučeniny z příkladu 9 v dávce 0,01 mg/kg na počet vstupů během následného testování v úloze AAPA. # $P < 0,05$  vzhledem k samotnému NMDA, \* $P < 0,05$  vzhledem ke kontrolám, \*\*  $P < 0,01$  vzhledem ke kontrolám.

Obr. 7 ukazuje vliv sloučeniny z příkladu 9 v dávce 0,01 mg/kg na maximální čas vyhýbání během následného testování v úloze AAPA. # $P < 0,05$  vzhledem k samotnému NMDA, \* $P < 0,05$  vzhledem ke kontrolám, \*\*  $P < 0,01$  vzhledem ke kontrolám.

Obr. 8 znázorňuje vliv sloučeniny z příkladu 9 v dávce 0,1 mg/kg na počet vstupů do zakázané oblasti během následného testování v úloze AAPA. \* $P < 0,05$  vzhledem ke kontrolám.

Obr. 9 znázorňuje vliv sloučeniny z příkladu 9 v dávce 0,1 mg/kg na maximální čas vyhýbání během následného testování v úloze AAPA.

Obr. 10 znázorňuje vliv sloučeniny z příkladu 9 v dávce 10 mg/kg na celkový počet vstupů do zakázané oblasti během následného testování v úloze AAPA. # $P < 0,05$  vzhledem k samotnému NMDA, \* $P < 0,05$  vzhledem ke kontrolám.

Obr. 11 znázorňuje vliv sloučeniny z příkladu 9 v dávce 10 mg/kg na maximální čas vyhýbání ze sezení během následného testování v úloze AAPA. #P < 0,05 vzhledem k samotnému NMDA, \*P < 0,05 vzhledem ke kontrolám.

### Příklady provedení vynálezu

#### Příklad 1

Syntéza 20-oxo-5 $\beta$ -pregnan-3 $\alpha$ -yl (2S)-4-(benzyloxy)-2-[(*tert*-butoxykarbonyl)amino]-4-oxo-butanoátu

Sloučenina vzorce II (320 mg, 1 mmol), a Boc-Asp(OBzl)-OH (345 mg, 1,1 mmol) v 50 ml baňce byly rozpuštěny v čerstvě sušeném benzenu (35 ml) jehož část (6 ml) byla poté oddestilována. Po vychlazení na laboratorní teplotu byl pod argonem do směsi přidán 4-dimethylaminopyridin (4 mg) a dicyclohexylcarbodiimid (550 mg, 2,18 ekv.) v suchém benzenu (3 ml) a reakční směs byla míchána přes noc. Druhý den byla směs nalita do nasyceného vodného roztoku NaHCO<sub>3</sub> (40 ml), produkt byl extrahován EtOAc (3 x 30 ml) a spojené organické fáze byly 2x promyty vodou (po 10 ml). Vysrážená N,N'-dicyklohexylmočovina byla odfiltrována, filtrát byl sušen Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a rozpouštědla byla odpařena ve vakuu. Další podíl N,N'-dicyklohexylmočoviny byl odkrystalován z diethyletheru a odsát, filtrát s produktem byl po odpaření rozpouštědla nanesen na sloupec silikagelu (20 g) a chromatografován v soustavě PeAe-Et<sub>2</sub>O 9:1. Titulní sloučenina byla získána odpařením rozpouštědel jako nekystalizující bílá tuhá pěna (582 mg; 93 %), [ $\alpha$ ]<sub>D</sub> +82,0 (c 0,36). <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  0,60 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-18); 0,92 (s, 3H, H-19); 1,45 (s 9H, t-Bu-O); 2,12 (s 3H, H-21); 2,52 (t, 1H, J<sub>1</sub> = 8,9, H-17); 2,88 (dd, 1H, J<sub>1</sub> = 16,8; J<sub>2</sub> = 4,5, H-3b'); 3,03 (bdd, 1H, J<sub>1</sub> = 16,8; J<sub>2</sub> = 4,5, H-3a'); 4,50-4,55 (bm, 1H, CH-2'); 4,71-4,79 (m, 1H, H-3); 5,10-5,17 (m, 2H, H-benzyl); 5,48 (bd, 1H, J<sub>1</sub> = 8,6 HN); 7,32-7,37 (m, 5H, fenyl). IR (CHCl<sub>3</sub>):  $\nu$ (C=O): 1732 vs, br (aspartát), 1702 vs (-COCH<sub>3</sub>, -NHBoc);  $\nu$ (N-H): 3438 w, 1499 s (amid);  $\nu$ (C-O): 1232 s (aspartát), 1166 vs (-NHBoc);  $\delta_s$  (-CH<sub>3</sub>): 1368 s (-t-Bu);  $\nu$ (ring): 1455 m (-Bzl). Pro C<sub>37</sub>H<sub>53</sub>NO<sub>7</sub> (623,8) vypočteno: 71,24% C, 8,56%, 2,25 % N; nalezeno: 71,40 % C, 8,70 % H, 2,18 N%.

## Příklad 2

20-Oxo-5 $\beta$ -pregnan-3 $\alpha$ -yl N-(*tert*-butoxykarbonyl)-L-aspartyl 1-ester

Sloučenina získaná podle předcházejícího příkladu 1 (565 mg, 0,906 mmol) byla rozpuštěna v absolutním MeOH (7 ml) a k roztoku bylo přidáno 5% Pd/CaCO<sub>3</sub> (56 mg). Po osmihodinové hydrogenaci za intenzivního míchání a mírného přetlaku vodíku (10 mbar) byla reakce ukončena. Katalyzátor byl odfiltrován, produkt z filtrátu byl po odpaření rozpouštědla rozpuštěn v Et<sub>2</sub>O a napěněn. Takto byla získána čistá bílá pěna titulní sloučeniny (484 mg, 100 %), [ $\alpha$ ]<sub>D</sub> +87,0 (c 0,49). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta$  0,60 (s, 3H, H-18); 0,92 (s, 3H, H-19); 1,45 (s, 9H, *t*-Bu-O); 2,12 (s, 3H, H-21); 2,52 (t, 1H, J<sub>1</sub> = 8,9, H-17); 2,63-2,67 (m, 2H, H-3a',3b'); 4,45 (t, 1H, H-2'); 4,65-4,73 (m, 1H, H-3). IR (CHCl<sub>3</sub>):  $\nu$ (C=O): 1742 s,sh (aspartát, -COOH monomer), 1715 vs (-COOH dimer), 1703 vs (-COCH<sub>3</sub>, -NHBoc);  $\nu$ (N-H): 3439 m;  $\nu$ (C-N, amid) 1500 s;  $\nu$ (C-O): 1235 s, 1194 s (aspartát), 1161 s (-NHBoc);  $\delta$ <sub>s</sub> (-CH<sub>3</sub>): 1369 s (*t*-Bu-O). Pro C<sub>30</sub>H<sub>47</sub>NO<sub>7</sub> (533,7) vypočteno: 67,51 % C, 8,88 % H, 2,62 % N; nalezeno: 67,90 % C, 9,01 % H, 2,55 % N.

## Příklad 3

20-Oxo-5 $\beta$ -pregnan-3 $\alpha$ -yl L-aspartyl 1-ester

Sloučenina získaná podle předcházejícího příkladu 2 (465 mg, 0,871 mmol) byla rozpuštěna v dichlormethanu (10 ml) a za míchání byla přikapána trifluoroctová kyselina (1 ml, 13,4 mmol, 15,5 ekv.). Směs byla 2 hodiny míchána při teplotě místnosti a poté byla ponechána přes noc při 5 °C. Druhý den byla reakční směs odpařena 3x s benzenem, rozpuštěna ve směsi pyridinu (1 ml) a MeOH (1 ml), znovu odpařena, rozpuštěna v chloroformu a vytřepána s vodou. Organická fáze byla sušena bezvodým Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, rozpouštědla byla odpařena na odparce. Olejovitý odparek byl rozpuštěn v Et<sub>2</sub>O jehož odpařením byla získána bílá pěna titulní sloučeniny (370 mg, 98 %), [ $\alpha$ ]<sub>D</sub> +132 (c 0,11, MeOH-CHCl<sub>3</sub> 1:1). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 0,60 (s, 3H, H-18); 0,94 (s, 3H, H-19); 2,12 (s, 3H, H-21); 2,56 (t, 1H, J<sub>1</sub> = 8,8, H-17); 2,77 (dd, 1H, J<sub>1</sub> = 17,0; J<sub>2</sub> = 8,1, H-3b'); 2,88 (bd, 1H, J<sub>1</sub> = 17,0, H-3a'); 4,00-4,07 (bm, 1H, H-2'); 4,78-4,86 (bm, H, H-3). IR (KBr):  $\nu$ (C=O): 1746 s (aspartát), 1707 vs (-COCH<sub>3</sub>);  $\nu$ (C-O): 1215 s (aspartát);  $\nu$ (NH<sub>3</sub><sup>+</sup>): 2121 vw, br;  $\nu$ (COO<sup>-</sup>): 1616 s, br. Pro C<sub>25</sub>H<sub>39</sub>NO<sub>5</sub> (433,5) vypočteno: 69,25 % C, 9,07 % H, 3,23 % N; nalezeno: 69,01 % C, 9,23 % H, 3,05 % N.

Podle shora uvedených postupů byly ze sloučenin, které jsou uvedeny na počátku každého příkladu, připraveny příslušné titulní sloučeniny následujících příkladů 4 až 12.

#### Příklad 4

##### 20-Oxo-5 $\beta$ -pregnan-3 $\alpha$ -yl (3S)-4-(benzyloxy)-3-[(*tert*-butoxykarbonyl)amino]-4-oxobutanoát

Sloučenina vzorce II (1 mmol) a Boc-Asp(OBzl) (1,1 mmol) poskytla zpracováním podle příkladu 1 titulní sloučeninu,  $[\alpha]_D +92,5$  (c 0,24).  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ): 0,59 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ -18); 0,92 (s, 3H, H-19); 1,44 (s 9H, *t*-Bu-O); 2,11 (s 3H, H-21); 2,53 (t, 1H,  $J_1 = 8,8$ , H-17); 2,79 (dd, 1H,  $J_1 = 16,8$ ;  $J_2 = 4,6$ , H-3b'); 2,98 (bdd, 1H,  $J_1 = 16,8$ ;  $J_2 = 4,6$ , H-3a'); 4,60-4,65 (bm, 1H, CH-2'); 4,64-4,73 (m, 1H, H-3); 5,13-5,23 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ -benzyl); 5,50 (bd, 1H,  $J_1 = 8,8$  HN); 7,30-7,36 (m, 5H, fenyl). IR ( $\text{CHCl}_3$ ):  $\nu(\text{C}=\text{O})$ : 1717 vs, sh (aspartát), 1703 vs ( $-\text{COCH}_3$ , -NHBoc);  $\nu(\text{N-H})$ : 3439 w, 1499 s (amid);  $\nu(\text{C-O})$ : 1163 vs (-NHBoc);  $\delta_s$  ( $-\text{CH}_3$ ): 1380 s (*t*-Bu);  $\nu(\text{ring})$ : 1455 m (-Bzl). Pro  $\text{C}_{37}\text{H}_{53}\text{NO}_7$  (623,8) vypočteno: 71,24 % C, 8,56 % H, 2,25 % N; nalezeno: 70,91% C, 8,74 % H, 2,52 % N.

#### Příklad 5

##### 20-Oxo-5 $\beta$ -pregnan-3 $\alpha$ -yl N-(*tert*-butoxykarbonyl)-L-aspartyl 4-ester

Sloučenina z předcházejícího příkladu 4 poskytla obdobným zpracováním jako v příkladu 2 titulní sloučeninu:  $[\alpha]_D +96,3$  (c 0,20).  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  0,60 (s, 3H, H-18); 0,93 (s, 3H, H-19); 1,46 (s, 9H, *t*-Bu-O); 2,11 (s, 3H, H-21); 2,52 (t, 1H,  $J_1 = 8,9$ , H-17); 2,81 (dd, 1H,  $J_1 = 17,0$ ;  $J_2 = 5,2$  H-3b'); 3,00 (dd, 1H,  $J_1 = 16,9$ ;  $J_2 = 4,7$  H-3a'); 4,56-4,64 (m, 1H, H-2'); 4,70-4,82 (m, 1H, H-3), 5,55 (d, 1H,  $J=7,9$ , HN). IR ( $\text{CHCl}_3$ ):  $\nu(\text{C}=\text{O})$ : 1716 vs, 1703 vs ( $-\text{COCH}_3$ , -NHBoc); 3439 w, 1501 s (amid);  $\nu(\text{N-H})$ : 1232 s, 1193s (aspartát), 1160 s (-NHBoc);  $\delta_s$  ( $-\text{CH}_3$ ): 1386 s (*t*-Bu). Pro  $\text{C}_{30}\text{H}_{47}\text{NO}_7$  (533,7) vypočteno: 67,51 % C, 8,88 % H, 2,62 % N; nalezeno: 67,25 % C, 9,15 % H, 2,90 % N

## Příklad 6

20-Oxo-5 $\beta$ -pregnan-3 $\alpha$ -yl L-aspartyl 4-ester

Sloučenina z předcházejícího příkladu 5 poskytla zpracováním podle příkladu 3 titulní sloučeninu,  $[\alpha]_D +91,5$  (c 0,24; ve směsi MeOH:CHCl<sub>3</sub> 1:1). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 0,60 (s, 3H, H-18); 0,95 (s, 3H, H-19); 2,12 (s, 3H, H-21); 2,54 (m, 3H, H-17); 2,86-3,08 (bm, 2H, H-3b', H-3a'); 3,86-3,98 (bm, 1H, H-2'); 4,72-4,80 (bm, H, H-3); 8,00 (s, 1H, HN). IR (CHCl<sub>3</sub>):  $\nu$ (C=O): 1721 s (aspartát), 1702 vs (-COCH<sub>3</sub>);  $\nu$ (C-O): 1215 s (aspartát);  $\nu$ (NH<sub>3</sub><sup>+</sup>): 1621 s, br. Pro C<sub>25</sub>H<sub>39</sub>NO<sub>5</sub> (433,5) vypočteno: 69,25 % C, 9,07 % H, 3,23 % N; nalezeno: 69,25 % C, 9,15 % H, 3,54 % N.

## Příklad 7

20-Oxo-5 $\beta$ -pregnan-3 $\alpha$ -yl (2S)-5-(benzyloxy)-2-[(*tert*-butoxykarbonyl)amino]-5-oxopentanoát

Sloučenina vzorce II (1 mmol) a Boc-Glu(OBzl)-OH (1,1 mmol) poskytly reakcí podle příkladu 1 titulní sloučeninu,  $[\alpha]_D +70,9$  (c 0,35). <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  0,60 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-18); 0,93 (s, 3H, H-19); 1,44 (s 9H, *t*-Bu-O); 2,12 (s 3H, H-21); 2,52 (t, 1H, J<sub>1</sub> = 8,9, H-17); 2,88 (dd, 1H, J<sub>1</sub> = 16,8; J<sub>2</sub> = 4,5, H-3b'); 3,03 (bdd, 1H, J<sub>1</sub> = 16,8; J<sub>2</sub> = 4,5, H-3a'); 4,50-4,55 (bm, 1H, CH-2'); 4,71-4,79 (m, 1H, H-3); 5,10-5,17 (m, 2H, H-benzyl); 5,48 (bd, 1H, J<sub>1</sub> = 8,6 HN); 7,31-7,40 (m, 5H, fenyl). IR (CHCl<sub>3</sub>):  $\nu$ (C=O): 1732 vs,br (glutamát), 1702 vs (-COCH<sub>3</sub>, -NHBoc);  $\nu$ (N-H): 3438 w, 1499 s (amid);  $\nu$ (C-O): 1232 s (glutamát), 1166 vs (-NHBoc). Pro C<sub>38</sub>H<sub>55</sub>NO<sub>7</sub> (637,8) vypočteno: 71,55 % C, 8,69 % H, 2,20 % N; nalezeno: 71,87% C, 8,42 % H, 2,06 % N.

## Příklad 8

20-Oxo-5 $\beta$ -pregnan-3 $\alpha$ -yl N-(*tert*-butoxykarbonyl)-L-glutamyl 1-ester

Sloučenina z předcházejícího příkladu 7 poskytla obdobným zpracováním jako v příkladu 2 titulní sloučeninu,  $[\alpha]_D +87,0$  (c 0,49). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta$  0,60 (s, 3H, H-18); 0,92 (s, 3H, H-19); 1,45 (s, 9H, *t*-Bu-O); 2,12 (s, 3H, H-21); 2,52 (t, 1H, J<sub>1</sub> = 8,9, H-17); 2,63-2,67 (m, 2H, H-3a', 3b'); 4,45 (t, 1H, H-2'); 4,65-4,73 (m, 1H, H-3). IR (CHCl<sub>3</sub>):  $\nu$ (C=O): 1742 s, sh (glutamát, -COOH monomer), 1715 vs (-COOH dimer), 1703 vs (-COCH<sub>3</sub>, -NHBoc);  $\nu$ (N-H):

3439 m;  $\nu(\text{C-N, amid})$  1500 s;  $\nu(\text{C-O})$ : 1235 s, 1194 s (glutamát), 1161 s (-NH<sub>2</sub>Boc);  $\delta_s$  (-CH<sub>3</sub>): 1369 s (-*t*-Bu). Pro C<sub>31</sub>H<sub>49</sub>NO<sub>7</sub> (547,7) vypočteno: 67,98 % C, 9,02 % H, 2,56 % N; nalezeno: 67,75 % C 9,39 % H, 2,73 % N.

#### Příklad 9

##### 20-oxo-5 $\beta$ -pregnan-3 $\alpha$ -yl L-glutamyl 1-ester

Sloučenina z předcházejícího příkladu 8 poskytla obdobným zpracováním jako v příkladu 3 titulní sloučeninu,  $[\alpha]_D +132$  (c 0,11, MeOH:CHCl<sub>3</sub> 1:1). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 0,60 (s, 3H, H-18); 0,94 (s, 3H, H-19); 2,12 (s, 3H, H-21); 2,56 (t, 1H,  $J_1 = 8,8$ , H-17); 2,77 (dd, 1H,  $J_1 = 17,0$ ;  $J_2 = 8,1$ , H-3b'); 2,88 (bd, 1H,  $J_1 = 17,0$ , H-3a'); 4,00-4,07 (bm, 1H, H-2'); 4,78-4,86 (bm, 2H, H-3). IR (KBr):  $\nu(\text{C=O})$ : 1746 s (glutamát), 1707 vs (-COCH<sub>3</sub>);  $\nu(\text{C-O})$ : 1215 s (glutamát);  $\nu(\text{NH}_3^+)$ : 2121 vw, br;  $\nu(\text{CO}_2^-)$ : 1616 s, br. Pro C<sub>26</sub>H<sub>41</sub>NO<sub>5</sub> (447,6) vypočteno: 69,77 % C 9,23 % H, 3,11 % N; nalezeno: 69,46 % C 9,49 % H, 3,51 % N.

#### Příklad 10

##### 20-Oxo-5 $\beta$ -pregnan-3 $\alpha$ -yl (4S)-5-(benzyloxy)-4-[(*tert*-butoxykarbonyl)amino]-5-oxopentanoát

Sloučenina vzorce II (1 mmol) a Boc-Glu(OBzl) (1,1 mmol) poskytly reakcí podle příkladu 1 titulní sloučeninu,  $[\alpha]_D +64$  (c 0,28). <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  0,60 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-18); 0,93 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-19); 1,44 (s 9H, *t*-But); 2,12 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-21); 2,38-2,5 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-4); 2,56 (t, 1H,  $J_1 = 8,9$ , H-17); 4,25-4,35 (bm, 1H, H-2'); 4,68-4,74 (m, 2H, H-4); 5,10-5,17 (d, 1H,  $J=7,9$ , NH); 5,18-5,22 (m, 2H, H-benzyl); 7,28-7,40 (bm, 5H, fenyl). IR (CHCl<sub>3</sub>):  $\nu(\text{C=O})$ : 1730 vs, (ester), 1702 vs (-COCH<sub>3</sub>, -NH<sub>2</sub>Boc);  $\nu(\text{N-H})$ : 3432 m, 1496 s (amid);  $\nu(\text{C-O})$ : 1164 vs (-NH<sub>2</sub>Boc);  $\delta_s$  (-CH<sub>3</sub>): 1368 s (-*t*-Bu);  $\nu(\text{kruh})$ : 1451 m (-Bzl). Pro C<sub>38</sub>H<sub>55</sub>NO<sub>7</sub> (637,8) vypočteno: 71,55 % C, 8,69 % H, 2,20 % N; nalezeno: 71,27 % C, 8,75 % H, 2,32 % N.

## Příklad 11

20-Oxo-5 $\beta$ -pregnan-3 $\alpha$ -yl N-(terc-butoxykarbonyl)-L-glutamyl 5-ester

Sloučenina z příkladu 10 poskytla reakcí podle příkladu 2 titulní sloučeninu,  $[\alpha]_D +80,0$  (c 0,31).  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  0,63 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ -18); 0,99 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ -19); 1,45 (s, 9H, *t*-But); 2,13 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ -21); 2,52 (t, 1H,  $J_1 = 8,9$ , H-17); 2,87 (dd, 1H,  $J=10.2$ ,  $J'=3$ , 1H-3b'); 3,04 (dd, 1H,  $J=10.2$ ,  $J'=3$ , 1H-3a'); 4.47 (t, 1H, H-2'); 5,22-5,28 (m, 1H, NH); IR ( $\text{CHCl}_3$ ):  $\nu(\text{C}=\text{O})$ : 1730 s, sh (ester), 1710 vs (-NHBoc), 1700 vs (- $\text{COCH}_3$ );  $\nu(\text{N-H})$  3436 w;  $\nu(\text{C-N, amid})$  1501 s;  $\nu(\text{C-O})$  1163 s (-NHBoc),  $\delta_s$  (- $\text{CH}_3$ ). Pro  $\text{C}_{31}\text{H}_{49}\text{NO}_7$  (547,7) vypočteno: 67,98 % C 9,02 % H, 2,56 % N; nalezeno: 67,59 % C, 9,23 % H, 2,93 % N.

## Příklad 12

20-Oxo-5 $\beta$ -pregnan-3 $\alpha$ -yl L-glutamyl 5-ester

Sloučenina z předchozího příkladu 11 poskytla reakcí podle postupu uvedeného v příkladu 3 titulní sloučeninu,  $[\alpha]_D +93,7$  (c 0,26,  $\text{MeOH-CH}_3\text{OH}$  1:1).  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 0,60 (s, 3H, H-18); 0,94 (s, 3H, H-19); 2,12 (s, 3H, H-21); 2,56 (t, 1H,  $J_1 = 8,8$ , H-17); 2,50-2,60 (m, 1H, H-3a'); 3,85-3,87 (m, 1H, H-2'); 4,78-4,86 (bm, 1H, H-3); 7,35-7,40 (m, 1H, NH). IR:  $\nu(\text{C}=\text{O})$ : 1732 s (glutamát), 1703 vs (- $\text{COCH}_3$ );  $\nu(\text{C-O})$ : 1215 s (glutamát); 2100 vw, br;  $\nu(\text{COO}^-)$ : 1616 s, br. Pro  $\text{C}_{26}\text{H}_{41}\text{NO}_5$  (447,6) vypočteno: 69,77 % C, 9,23 % H, 3,13 % N; nalezeno: 69,39 % C 9,53 % H, 3,40 % N.

## Příklad 13

20-oxo-5 $\beta$ -pregnan-3 $\alpha$ -yl adipyl 1-ester

K roztoku kyseliny adipové (300 mg, 2 mmol) v 10 ml suchého THF byl přidán dicyklohexylkarbodiimid (410 mg, 2 mmol) v 10 ml suchého benzenu. Směs byla míchána 1 h pod argonem. Poté byl za míchání během 15 min přikapán roztok sloučeniny vzorce II (3 $\alpha$ -hydroxy-5 $\beta$ -pregnan-20-onu) (320 mg, 1 mmol) a dimethylaminopyridinu (10 mg, 0,08 mmol) v 10 ml suchého benzenu. Reakční směs byla míchána za laboratorní teploty 16 h. Poté byla

rozpuštědla odpařena. Chromatografií odparku na sloupci silikagelu ve směsi petrolether-ether 9:1 bylo získáno 350 mg, 78 % nekrystalizujícího hemiesteru,  $[\alpha]_D +89$  (c 0,49).  $^1\text{H-NMR}$ :  $\delta$  0,60 (s, 3H, (H-18)); 0,92 (s, 3H, H-19); 2,11 (s, 3H, H-21); 2,30 (m, 2H, W~20, H-adipát); 2,37 (m, 2H, W~20, H-adipát); 2,53 (t, 1H, J = 9, H-17); 4,73 (m, 1H, W=35, H-3). IR: 1727, 1706 (C=O); 1358 (CH<sub>3</sub>C=O); 1233, 1193, 1183 (C-O). Pro C<sub>27</sub>H<sub>42</sub>O<sub>5</sub> (446,6) vypočteno: 72,61 % C; 9,48 % H; nalezeno: 72,13 % C; 9,53 % H.

Stejným postupem jako v příkladu 13 byly připraveny sloučeniny uvedené v příkladech 14 až 16 s tím, že se místo kyseliny adipové použije v příkladu 14 kyselina pimelová (heptandiová), v příkladu 15 kyselina suberová (korková, oktandiová) a v příkladu 16 kyselina fumarová (2(E)-buten-diová).

#### Příklad 14

##### 20-Oxo-5 $\beta$ -pregnan-3 $\alpha$ -yl 6-karboxyhexanoát

Olej,  $[\alpha]_D +72,3$  (c 0,33).  $^1\text{H-NMR}$ :  $\delta$  0,60 (s, 3H, (H-18)); 0,93 (s, 3H, H-19); 2,11 (s, 3H H-21); 2,30 (m, 2H, W~20, H-pimelát); 2,37 (m, 2H, W~20, H-pimelát); 2,53 (t, 1H, J=8,8); 4,74 (m, 1H, W=35, H-3). MS: (ESI): 460 (4 %, M), 442.

#### Příklad 15

##### 20-Oxo-5 $\beta$ -pregnan-3 $\alpha$ -yl 7-karboxyheptanoát

Olej,  $^1\text{H-NMR}$ :  $\delta$  0,60 (s, 3H, (H-18)); 0,92 (s, 3H, H-19); 2,11 (s, 3H H-21); 2,30 (m, 2H, W~20, H-suberát); 2,37 (m, 2H, W~20, H-suberát); 2,54 (t, 1H, J=8,7); 4,73 (m, 1H, W=35, H-3).

#### Příklad 16

##### 20-oxo-5 $\beta$ -pregnan-3 $\alpha$ -yl (E)-3-karboxyprop-2-enoát

$^1\text{H-NMR}$ :  $\delta$  0,62 (s, 3H, H-18); 0,99 (s, 3H, H-19); 2,11 (s, 3H H-21); 2,53 (t, 1H, J=8, H-17); 4,77 (m, 1H, W=35, H-3); 6,69 (d, 2H, J=14, H-fumarát). IR: 1723, 1702 (C=O); 1358

(CH<sub>3</sub>C=O); 1181, 982 (C-O); 1645 (C=C). Pro C<sub>25</sub>H<sub>36</sub>O<sub>5</sub> (416,6) vypočteno: 72,08 % C; 8,71 % H; nalezeno: 72,05 % C; 8,86 % H.

#### Příklad 17

##### 20-oxo-5β-pregnan-3α-yl (Z)-3-karboxyprop-2-enoát

Sloučenina vzorce II (100 mg, 0,31 mmol) byla rozpuštěna v pyridinu (0,5 ml), po ochlazení na 0 °C byl přidán 4-dimethylaminopyridin (1 mg) a anhydrid kyseliny maleinové (180 mg, 1,55 mmol). Reakční směs byla temperována na 40 °C a ponechána při ní 16 hod. Poté byla nalita na led. Po jeho rozpuštění byl produkt extrahován do ethylacetátu (3 x 30 ml). Spojené organické fáze byly promyty vodným roztokem kyseliny citronové (1%, 30 ml), vodným roztokem hydrogenuhličitanu sodného (5%, 20 ml) a vodou (30 ml). Poté byl roztok sušen bezvodým síranem sodným a odpařen na rotační odparce. Získaný odparek byl chromatografován na preparativní desce silikagelu (200 x 200 x 0,3 mm). Bylo získáno 116 mg (90%) titulního hemiesteru, <sup>1</sup>H-NMR: δ 0,62 (s, 3H, H-18); 0,99 (s, 3H, H-19); 2,11 (s, 3H, H-21); 2,67 (t, 1H, J=9, H-17); 4,77 (m, 1H, w=35, H-3); 6,77 (d, 2H, J=6, H-maleinát). IR: 1725, 1705 (C=O); 1358 (CH<sub>3</sub>C=O); 1172, 982 (C-O); 1645 (C=C). Pro C<sub>25</sub>H<sub>36</sub>O<sub>5</sub> (416,6) vypočteno: 72,08 % C; 8,71 % H; nalezeno: 72,05 % C; 8,86 % H.

Stejným postupem byly připraveny i sloučeniny v příkladech 18 a 19.

#### Příklad 18

##### 20-Oxo-5β-pregnan-3α-yl 3-karboxyperfluoropropanoát

Reakcí sloučeniny vzorce II (240 mg, 0,75 mmol) v pyridinu (5 ml) a perfluorosukcinanhydridu (645 mg, 3,75 mmol) byl získán olej. <sup>1</sup>H-NMR: δ 0,60 (s, 3H, H-18); 0,92 (s, 3H, H-19); 2,11 (s, 3H, H-21); 2,53 (t, 1H, J=8,7); 4,75 (m, 1H, W=35, H-3).

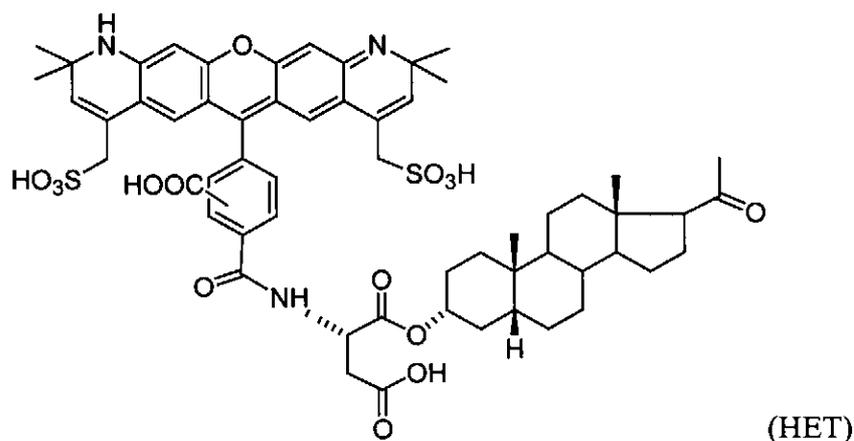
## Příklad 19

20-Oxo-5 $\beta$ -pregnan-3 $\alpha$ -yl 3-karboxy- $\xi$ -methyl-propanoát

Reakcí sloučeniny vzorce II (100 mg, 0,31 mmol), 4-dimethylaminopyridinu (3 mg, 0,03 mmol) a methyl-sukcinyln-anhydridu (170 mg, 1,5 mmol) byla získána titulní látka (jako směs isomerů),  $^1\text{H-NMR}$ :  $\delta$  0,60 (s, 3H, H-18); 0,93 (s, 3H, H-19); 2,11 (s, 3H, H-21); 2,30 (m, 2H, w~20, H-methylpropanoát); 2,55 (t, 1H, J=8, H-17); 4,75 (m, 1H, w=35, H-3). IR: 1712, 1702 (C=O); 1358 (CH<sub>3</sub>C=O); 1181, 987 (C-O). Pro C<sub>26</sub>H<sub>40</sub>O<sub>5</sub> (432,6) vypočteno: 72,19 % C; 9,32 % H; nalezeno: 71,88 % C; 9,70 % H.

## Příklad 20

## Konjugát vzorce HET



Aktivní ester Alexa fluor 567 (Molecular Probes) (57,3 mg, 64,1  $\mu\text{mol}$ ) a aspartát z příkladu 3 (33 mg, 1,2 ekv., 76,8  $\mu\text{mol}$ ) se rozpustí ve 3 ml DMSO a 1 ml pyridinu. Směs byla ponechána při 40 °C 72 h. Po ukončení reakce podle kontroly pomocí HPLC byla rozpouštědla odpařena ve vakuu na olejové pumpě při 60 °C. Odparek byl dělen PLC ve směsi butanol:methanol:voda (3:1:1) s 1 % (obj.) triethylaminu. Eluát byl spojen a vysušen za sníženého tlaku (1 mm). Bylo získáno 40,3 mg titulní sloučeniny, IR: 1648 s (CONH), 3360, 3300 (NH), 1246 s (C-O, ester), 1731 (C=O, ester), 1695 (C=O, keton), 1718, 1685 (C=O, kyselina), 1229 (SO<sub>3</sub>H), 1612, 1497, 1405 kruh. MS-ESI: 368,8 [63%, M-3H]<sup>-3</sup>; 553,7 [63%, M-2H]<sup>-2</sup>; 1130,1 [2%, M+Na]<sup>+</sup>; 1146,1 [6%, M+K]<sup>+</sup>; (HR) pro [C<sub>58</sub>H<sub>67</sub>N<sub>3</sub>O<sub>15</sub>N<sub>2</sub>-2H]<sup>-2</sup>m/z vypočteno: 553,692856. nalezeno: 553,69231.

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{D}_2\text{O}$ ,  $\text{K}_2\text{CO}_3$ ): 0,54 s, 3 H (3  $\times$  H-18); 0,90 s, 3 H (3  $\times$  H-19); 0,88-0,92 m (4  $\text{CH}_3$ , rhodamin) 1,27 t, 9 H,  $J = 7,0$  ( $\text{NCH}_2\text{CH}_3$ ); 2,12 s, 3 H (3  $\times$  H-21); 3,60 t, 8 H,  $J = 7,0$  ( $\text{NCH}_2\text{CH}_3$ ); 5,69 s, 2 H, (H-11 + 21, rhodamin); 6,53 m, 4 H, (4H-rhodamin); 7,33 d, 2 H,  $J = 8,0$  (H-6' a H-2', rhodamin); 8,19 d, 2 H,  $J = 8,0$  (H-3' a H-5', rhodamin).

#### Příklad 21

##### 20,20-(Ethyldioxy)-5 $\beta$ -pregnan-3 $\beta$ -yl-tosylát

Roztok 20-oxo-5 $\beta$ -pregnan-3 $\beta$ -yl-tosylátu (Swann D. A., Turnbull J. H.: Tetrahedron 1966, 22, 231, 200 mg, 0,42 mmol) a orthomravenčanu ethylnatého (0,38 ml, 2,3 mmol), ethylenglykolu (0,3 ml, 5,8 mmol) a monohydrátu kyseliny p-toluensulfonové (2 mg, 0,01 mmol) v suchém benzenu (2 ml) byl míchán dva dny za laboratorní teploty. Poté byl nalit do nasyceného roztoku kyselého uhličitanu sodného (30 ml). Steroid byl extrahován do ethyl-acetátu (2  $\times$  60 ml). Extrakt byl promyt vodou, vysušen bezvodým síranem hořečnatým a rozpouštědla odpařena. Odparek byl čištěn tenkovrstvou chromatografií na 6 deskách silikagelu (200  $\times$  200  $\times$  0,3 mm) ve směsi petrolether-ether (1:1) se dvěma kapkami pyridinu. Bylo získáno 194 mg (89 %) titulní sloučeniny, t.t. 146-148  $^\circ\text{C}$  (petrolether-ether),  $[\alpha]_{\text{D}} +11,7$  (c 0,37,  $\text{CHCl}_3$ ). IR ( $\text{CHCl}_3$ ): 1358 ( $\text{SO}_2$ , tosylát); 1189 ( $\text{SO}_2$ , tosylát); 1053 ( $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$ ); 901 (C-O, tosylát).  $^1\text{H}$ -NMR (200 MHz): 0,73 (s, 3H, H-18); 0,94 (s, 3H, H-19); 1,27 (s, 3H, H-21); 2,44 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ , tosylát); 3,81-4,01 (m, 4H,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$ ); 4,83 (m, 1H, H-3); 7,32 (d, 2H,  $J = 7,8$ , H-3 a H-5, tosylát); 7,78 (d, 2H,  $J = 8,3$ , H-3 a H-5, tosylát). FAB MS: 517 (6 %,  $M + 1$ ), 345 (2,5 %,  $M -$  tosylát). Pro  $\text{C}_{30}\text{H}_{44}\text{O}_5\text{S}$  (516,7) vypočteno: 69,73 % C, 8,58 % H, 6,21 % S; nalezeno: 69,92 % C, 8,79 % H, 6,41 % S.

#### Příklad 22

##### Dimethyl-(2-[20,20-(ethyldioxy)-5 $\beta$ -pregnan-3 $\alpha$ -yl]-propandioát)

K roztoku malonátu sodného, připraveného varem směsi toluenu (30 ml), sodíku (80 mg, 3,5 mmol) a dimethyl-malonátu (0,707 ml, 6,2 mmol) pod zpětným chladičem do rozpuštění sodíku, byl za intenzivního míchání přikapán roztok sloučeniny z příkladu 21 (600 mg, 1,16 mmol) v toluenu (20 ml). Po 12h zahřívání byla reakční směs ochlazená na laboratorní teplotu,

sraženina p-toluensulfonátu sodného byla odfiltrována a promyta malým množstvím toluenu. Spojené toluenové roztoky byly odpařeny. Získaný olejovitý odparek byl rozpuštěn v etheru (200 ml). Etherický roztok byl promyt vodou vysušen bezvodým síranem sodným a odpařen. Chromatografií na sloupci silikagelu (20 g) ve směsi petrolether-ether (9:1) byla získána titulní sloučenina (430 mg, 77 %), t.t. 98-102 °C (ethyl-acetát).  $[\alpha]_D +55,4$  (c 0,25 CHCl<sub>3</sub>). IR: 1753 (C=O, COOMe); 1731 (C=O, COOMe); 1436 (CH<sub>3</sub>, COOMe); 1472, 1295 (CH<sub>2</sub>, acetál); 1149 (C-O). <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz): 0,73 (s, 3H, H-18); 0,93 (s, 3H, H-19); 1,29 (s, 3H, H-21); 3,19 (d, 1H, J=9,2, CH(COOMe)<sub>2</sub>); 3,72 (s, 6H, (2 x COOMe)); 3,80-4,02 (m, 4H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O); ESI MS: 976 (47 %, 2M + 1 + Na); 975 (100 %, 2M + Na); 499 (15 % M + Na). Pro C<sub>24</sub>H<sub>44</sub>O<sub>6</sub> (476,6) vypočteno: 70,56 % C, 9,30 % H; nalezeno: 70,61 % C, 9,53 % H.

#### Příklad 23

##### Methyl-(2-[20,20-(ethylendioxy)-5β-pregnan-3α-yl]-acetát)

Směs sloučeniny z příkladu 22 (187 mg, 0,39 mmol), kyanidu sodného (37,5 mg, 0,76 mmol) v dimethylsulfoxidu (11 ml) byla 3 h zahřívána pod inertní atmosférou na 210 °C. Po ochlazení na laboratorní teplotu byla směs nalita do vody (100 ml) a produkt extrahován do etheru (3 x 100 ml). Spojené etherické extrakty byly promyty vodou a rozpouštědlo odpařeno. Odparek byl čištěn chromatografií na 6 deskách silikagelu (200 x 200 x 0,3 mm) ve směsi petrolether-ether (4:1). Bylo získáno 90 mg (57 %) titulní sloučeniny. T.t. 75-76 °C (ethyl-acetát).  $[\alpha]_D +68,0$  (c 0,25, CHCl<sub>3</sub>). IR: 1729 (C=O); 1295, 1073, 1054 (CH<sub>2</sub>, acetál); 1142 (C-O). <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz): 0,73 (s, 3H, H-18); 0,93 (s, 3H, H-19); 1,29 (s, 3H, H-21); 2,01 (m, 1H, H-3β); 2,22 (d, 2H, J=7,3, CH<sub>2</sub>COOCH<sub>3</sub>); 3,66 (s, 3H, COOCH<sub>3</sub>); 3,85-4,00 (m, 4H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O); ESI MS: 419 (61 %, M + 1); 357 (26 %, M - CH<sub>2</sub>COOCH<sub>3</sub>); 230 (100 %). Pro C<sub>26</sub>H<sub>42</sub>O<sub>4</sub> (418,6) vypočteno: 74,60 % C, 10,11 % H; nalezeno: 74,42 % C, 10,30 % H.

#### Příklad 24

##### 2-[20,20-(Ethylendioxy)-5β-pregnan-3α-yl]-octová kyselina

K míchanému roztoku sloučeniny z příkladu 23 (75 mg, 0,18 mmol) v methanolu (2 ml) byl přidán roztok hydroxidu draselného (55 mg, 0,98 mmol) v ethanolu (0,125 ml) a vodě (0,125

ml). Reakční směs byla míchána a zahřívána po dobu 1,5 h na 120 °C. Po ochlazení na laboratorní teplotu byla tato směs nalita do vody (50 ml), roztok byl okyselen roztokem vodné kyseliny chlorovodíkové (12%) na pH 1 a produkt byl extrahován etherem (30 ml) a chloroformem (2 x 30 ml). Organické fáze byly spojeny a promyty vodou. Odpařením rozpouštědel ve vakuu bylo získáno 45 mg titulní sloučeniny (63 %). T.t. 164-167 °C.  $[\alpha]_D +41,0$  (*c* 0,19, CHCl<sub>3</sub>). IR (CHCl<sub>3</sub>): 3516 (O-H, COOH, monomer); 3088 (O-H, COOH, dimer); 1739 (C=O, COOH, monomer); 1705 (C=O, COOH, dimer); 1496, 1375, 1054 (CH<sub>2</sub>, acetal). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz): 0,74 (s, 3H, H-18); 0,93 (s, 3H, H-19); 1,29 (s, 3H, H-21); 2,02 (m, 1H, H-3β); 2,26 (d, 2H, J = 6,6, CH<sub>2</sub>COOH); 3,86-3,98 (m, 4H, J = 8,8, H-17). FAB MS: 405 (4 %, M + 1); 261 (1 %, M - CH<sub>2</sub>COOH, C<sub>4</sub>H<sub>7</sub>O<sub>2</sub>); 231 (2 %, M - CH<sub>2</sub>COOH, C<sub>4</sub>H<sub>7</sub>O<sub>2</sub>, 2 x CH<sub>3</sub>). Pro C<sub>25</sub>H<sub>40</sub>O<sub>4</sub> (360,26) vypočteno: 74,22 % C; 9,97; nalezeno: 73,99 % C; 10,16 % H.

#### Příklad 25

##### a) 2-(Oxo-5β-pregnan-3α-yl)-octová kyselina

K míchanému roztoku sloučeniny z příkladu 24 (55 mg, 0,13 mmol) v acetonu (5 ml) byl přidán monohydrát kyseliny p-toluensulfonové (20 mg, 0,12 mmol) ve vodě (0,6 ml). Reakční směs byla míchána 24 h za laboratorní teploty. Poté byla tato směs nalita do vody, vzniklý roztok byl okyselen vodnou kyselinou chlorovodíkovou (12%) a extrahován etherem (30 ml) a chloroformem (2 x 30 ml). Organické fáze byly spojeny a promyty vodou. Odpařením rozpouštědel na vakuové odparce bylo získáno 42 mg titulní sloučeniny, t.t. 189-192 °C (aceton),  $[\alpha]_D +127,6$  (*c* 0,2, CHCl<sub>3</sub>). IR (CHCl<sub>3</sub>): 3516 (O-H, COOH, monomer), 3090 (O-H, COOH, dimer), 1739 (C=O, COOH, monomer); 1702 (C=O, COOH, dimer a C=O, keton), 1702 (C=O, COCH<sub>3</sub>). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz): 0,59 (s, 3H, H-18); 0,93 (s, 3H, H-19); 2,11 (s, 3H, H-21); 2,16 (m, 1H, H-3β); 2,27 (d, 2H, J = 6,8, CH<sub>2</sub>COOH); 2,54 (t, 1H, J = 8,8, H-17). ESI MS: 742 (15 %), 720 (42 %, 2M), 719 (100 %, 2M - 1), 359 (21 %, M - 1). Pro C<sub>23</sub>H<sub>36</sub>O<sub>3</sub> (360,3) vypočteno: 76,62 % C; 10,06; nalezeno: 76,54 % C; 10,25 % H.

##### b) 2-(20-Oxo-5β-pregnan-3α-yl)propandiová kyselina

K roztoku dimethylesteru z příkladu 22 (55 mg, 0,11 mmol) v methanolu (4 ml) byl přidán roztok hydroxidu draselného (140 mg, 2,5 mmol) v ethanolu (0,35 ml) a vodě (0,35 ml). Po 6

hodinách refluxu byla reakční směs nalita do vody a extrahována etherem (50 ml). Vodná fáze byla okyselena směsí HCl - H<sub>2</sub>O, 1:2 do pH 1 poté ponechána stát za laboratorní teploty 3 hodiny. Volná kyselina byla extrahována chloroformem (2 × 30 ml), spojené organické fáze byly promyty vodou, sušeny a odpařeny ve vakuu. Odparek byl krystalizován ze směsi petrolether-ether. Bylo získáno 27 mg titulní kyseliny (58 %): t.t. 214–215 °C, [α]<sub>D</sub> +82.7 (c 0.25, CHCl<sub>3</sub>). IR (CHCl<sub>3</sub>): 3500 (O-H, COOH, monomer); 3200 (O-H, COOH, dimer); 1741 (C=O, COOH, monomer); 1702 (C=O, keton). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz): 0.58 (s, 3H, H-18); 0.93 (s, 3H, H-19); 2.12 (s, 3H, H-21); 2.15 (m, 1H, H-3β); 2.54 (t, 1H, J = 8.6, H-17); 3.17 d, 1H, J = 8.5, CH(COOH)<sub>2</sub>. ESI MS: 808 (4 %, 2M), 404 (22 %, M), 403 (100 %, M - 1). Pro C<sub>24</sub>H<sub>36</sub>O<sub>5</sub> (404.5) vypočteno: 71,26 % C; 8,97 % H; nalezeno: 71,08 % C, 8,80 % H.

#### Příklad 26

#### Vliv pregnanolon sulfátu a jeho analogů na nativní a rekombinantní NMDA receptory

Primárně disociované hipokampální kultury byly připraveny z 1-2 denních potkanů. Zvířata byla dekapitována a následně byl izolován hipokampus. Buněčná suspenze byla připravena rozvolněním pomocí trypsinu a mechanické disociace. Buňky byly nasazeny na 25mm nebo 12mm polylysinem potažená krycí sklíčka v hustotě 500 000 buněk/cm<sup>2</sup>. Neuronální kultury byly udržovány v mediu Neurobasal<sup>TM</sup>-A (Invitrogen, Carlsbad, USA) doplněného glutaminem (0,5 mM) a B-27 Serum-Free Supplement (Invitrogen) při 37 °C a 5 % CO<sub>2</sub>.

*HEK293 buňky* (American Type Culture Collection, ATTC No. CRL1573, Rockville, MD) byly kultivovány v mediu Opti-MEM® I (Invitrogen) s přidavkem 5% fetálního telecího séra při 37°C a transfekovány NR1-1a/NR2B/GFP plazmidy jak bylo popsáno dříve (Cais et al., 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 24-jamkové destičce. Po trypsinizaci byly buňky resuspendovány v Opti-MEM® I obsahujícím 1% fetální telecí sérum. Do směsi bylo dále přidáno 20 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM D,L-2-amino-5-fosfonopentanové kyseliny, 3 mM kynurenové kyseliny, ketamin a buňky byly nasazeny na polylysinem potažená krycí sklíčka o průměru 25 mm. Pro transfekci byly použity následující geny kódující

podjednotky NMDA receptorů: NR1-1a (GenBank accession no. U08261) a NR2B (GenBank accession no. M91562).

Pro elektrofyziologické pokusy byly použity 5-10 dní staré hipokampální kultury nebo kultury HEK293 buněk 16-40 hodin po transfekci. Proudové vzrušení 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 ( $<10 \text{ M}\Omega$ ) 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 mM D-glukonové kyseliny, 15 mM chloridu cesného, 5 mM EGTA, 10 mM HEPES, 3 mM chloridu hořečnatého, 0,5 mM chloridu vápenatého a 2 mM hořečnaté soli ATP (pH upraveno na 7,2 roztokem hydroxidu cesného). Extracelulární roztok (ECS) obsahoval 160 mM chloridu sodného, 2,5 mM chloridu draselného, 10 mM HEPES, 10 mM glukózy, 0,2 mM EDTA a 0,7 mM chloridu vápenatého (pH upraveno na 7,3 roztokem hydroxidu sodného). Glycin byl přidán jak do testovacího, tak do kontrolního roztoku. K hipokampálním kulturám byl ještě navíc přidán bicuculin (10  $\mu\text{M}$ ) a tetrodotoxin (0,5  $\mu\text{M}$ ). Roztoky se steroidem byly připraveny z čerstvě připraveného zásobního roztoku (20 mM) steroidu rozpuštěného v dimethylsulfoxidu (DMSO). Ve všech extracelulárních roztocích byla použita stejná koncentrace DMSO. Kontrolní a testovací roztoky byly aplikovány mikroprocesorem kontrolovaným systémem promývání, s rychlostí výměny roztoku v okolí buňky  $\sim 10 \text{ ms}$ .

Proudové odpovědi vyvolané 100  $\mu\text{M}$  NMDA (v případě hipokampálních neuronů) nebo 1 mM 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  $\mu\text{M}$  pregnanolonsulfátu byl průměrný inhibiční efekt  $71,3 \pm 5,0 \%$  ( $n = 5$ ) odpovědí vyvolaných aktivací NMDA receptorů na hipokampálních neuronech a  $67,2 \pm 8,2 \%$  ( $n = 5$ ) na rekombinantních NR1/NR2B receptorech (Petrovic a spol., 2005). Syntetická analoga pregnanolon-sulfátu měla inhibiční efekt (obrázek 1) v koncentraci 50, 100 nebo 200  $\mu\text{M}$  (tak aby míra inhibice byla v rozmezí 30-70% maximální inhibice). Relativní míra steroidem indukované inhibice byla použita pro výpočet  $\text{IC}_{50}$ .  $\text{IC}_{50}$  byly vypočítány rovnicí  $\text{RI} = 1 - (1/1 + ([\text{steroid}]/\text{IC}_{50})^h)$ , kde RI je relativní míra steroidem

indukované inhibice a  $h$  je parametr Hillova koeficientu (1,2). Hodnoty  $IC_{50}$  jsou uvedeny v následující tabulce.

Nově syntetizované analogy (z příkladů 1 – 25) mají stejný mechanismus působení na NMDA receptorech jako pregnanolon sulfát liší se však svoji relativní afinitou (viz Tabulka 1).

Tabulka 1

testovaná látka - sloučenina z příkladu č.	relativní míra inhibice (%)	$IC_{50}$ ( $\mu$ mol)	počet buněk
Pregnanolon-sulfát	$67,2 \pm 8,2$	55	
Sloučenina z příkladu 26	$43,4 \pm 3,4$	250	4
Sloučenina z příkladu 25	$63,6 \pm 21,1$	126	5
Sloučenina z příkladu 3	$83,6 \pm 2,7$	51	5
Sloučenina z příkladu 9	$77,1 \pm 5,2$	73	5
Sloučenina z příkladu 20	$36,3 \pm 3,2$	320	5
Sloučenina z příkladu 13	$87,3 \pm 8,9$	40	4
Sloučenina z příkladu 17	$81,6 \pm 2,7$	14	6
Sloučenina z příkladu 19	$80,9 \pm 3,6$	30	4
Sloučenina z příkladu 15	$54,0 \pm 10,8 \%$	175	5
Sloučenina z příkladu 14	$61,5 \pm 10,6 \%$	135	5

Výsledky tedy ukazují, že syntetizované analogy pregnanolon-sulfátu mají stejný mechanismus působení na NMDA receptorech jako pregnanolon-sulfát, liší se však svoji relativní afinitou k NMDA receptoru. Vzhledem k etickému požadavku na minimalizaci počtu laboratorních zvířat použitých v pokusech jsme vybrali sloučeninu z příkladu 9 jako modelovou molekulu a studovali její vliv na chování zvířat a neuroprotektivní vlastnosti v animálních modelech. Všechny pokusy byly prováděny v souladu se Zákonem na ochranu zvířat proti týrání.

#### Příklad 27

Vliv sloučeniny z příkladu 9 na spontánní pohybovou aktivitu v testu otevřeného pole (*open-field*) a na senzomotorický gating v testu prepulzní inhibice úlekové reakce

Při hodnocení spontánní lokomoční aktivity byla zvířata sledována 30 minut v testu otevřeného pole (*open-field*), který byl tvořen čtvercovou arénou s délkou hrany 1 m. Zvířata byla snímána systémem Ethovision Pro (Noldus) a vyhodnocována byla celková dráha za toto sezení. Sloučenina z příkladu 9 byla aplikována subkutánně (rozpuštěna v cyklohexanu) v dávkách 1 mg/kg a 10 mg/kg, a to 30 min před behaviorálním sledováním. Kontrolním zvířatům byl aplikován fyziologický roztok.

Výsledky ukázaly, že sloučenina z příkladu 9 ani v jedné z dávek nezměnila spontánní pohybovou aktivitu, všechny skupiny zvířat vykazovaly podobnou ušlou vzdálenost (viz Obr 2; horní panel)

Testování prepulzní inhibice úlekové reakce jako měřítko možného deficitu v senzomotorickém zpracování ukázalo, že ani jedna z dávek sloučeniny z příkladu 9 statisticky významně neovlivnila tento parametr ve srovnání s kontrolními zvířaty (viz Obr. 2., dolní panel)

#### Příklad 28

Vliv samotné aplikace sloučeniny z příkladu 9 a dizocilpinu (nekompetitivní NMDA antagonist; standardní sloučenina používaná jako pozitivní kontrola dále zde označována také jako Dizocilpin) na chování v úloze aktivního alotetického vyhýbání se místu (AAPA) jako měřítko prostorové orientace a kognitivních funkcí.

Vliv sloučeniny z příkladu 9 na kognitivní funkce a také lokomoci byl studován v úloze aktivního alotetického vyhýbání se místu (AAPA), která vyžaduje po zvířeti jednak schopnost prostorové navigace a také kognitivní koordinace (Wesierska et al., 2005) a zároveň umožňuje sledovat potenciální změny v lokomoční (pohybové) aktivitě. V úloze AAPA jsou zvířata trénována pohybovat se po rotující uniformní kruhové aréně, na které je vymezena zakázaná oblast, po jejímž navštívení zvíře obdrží mírnou elektrickou ranku do končetin. Tato zakázaná oblast je definována stabilně v souřadnicovém systému místnosti, ve které pokus probíhá (Stuchlík et al., 2008).

Tato úloha je vysoce závislá na hipokampální formaci u potkanů, kdy již pouhá jednostranná přechodná léze této struktury způsobí poškození orientace v AAPA (Cimadevilla et al., 2001). Zvíře se tak musí neustále aktivně pohybovat proti směru rotace arény, jinak by bylo touto rotací pasivně zaváženo do zakázané oblasti. Jedno experimentální sezení v této úloze trvá 20 min, a celkově jsme prováděli 4 sezení ve čtyřech po sobě následujících dnech.

Kontrolním zvířatům jsme intraperitoneálně aplikovali fyziologický roztok, experimentálním skupinám potom sloučeniny z příkladu 9 a to v dávkách 1 mg/kg a 10 mg/kg (rozpuštěno v cyklodextrinu), podkožní aplikace. Roztok sloučeniny z příkladu 9 (1 mg/2 ml nebo 10 mg/2 ml rozpuštěné v cyklodextrinu) byl aplikován subkutánně v dávce 2 ml/kg. Jako pozitivní kontrola bylo použito intraperitoneální podání sloučeniny Dizocilpin (dizocilpinu), nekompetitivního antagonisty NMDA receptorů, který v mnoha experimentech vykazuje neuroprotektivní aktivitu, avšak rovněž narušuje kognitivní a lokomoční parametry a *de facto* způsobuje stav do jisté míry analogický psychóze. Dizocilpin byl použit v dávkách 0,1 mg/kg, 0,2 mg/kg a 0,3 mg/kg. Je třeba rovněž uvést, že Dizocilpin se (kromě svého neuroprotektivního působení) využívá k modelování schizofrenii podobného chování u laboratorních hlodavců a opakovaně bylo prokázáno, že v závislosti na dávce vyvolává kognitivní deficit a hyperlokomoci.

Výsledky jsou uvedeny v grafech na obrázku 3, kde jsou uváděny vždy průměry a střední chyby průměru (S.E.M.) za jednotlivá sezení. Statistické porovnání bylo pro přehlednost vyjádřeno vždy pro poslední sezení, kdy bylo dosaženo asymptotické úrovně výkonnosti u kontrolních zvířat.

Lokomoční (pohybová) aktivita byla v úloze AAPA hodnocena jako celková ušlá vzdálenost v aréně za 20-minutové sezení. Zvířata jimž byla aplikována sloučenina z příkladu 9, nevykazovala ani u jedné dávky této sloučeniny zvýšení ani snížení lokomoční aktivity oproti kontrolním potkanům, zatímco Dizocilpin dávkově závisle zvyšoval lokomoční aktivitu. Zatímco dávka 0,1 g/kg Dizocilpinu nevedla ke zvýšení pohybu, dávka 0,2 mg/kg zvyšovala lokomoci výrazně a dávka 0,3 mg/kg způsobovala ještě výraznější hyperaktivitu.

Je třeba dodat, že hyperaktivita (hyperlokomoce) indukovaná aplikací NMDA antagonistů je v literatuře často považována za experimentální analogii pozitivních příznaků psychóz, neboť mj. souvisí s nadměrnou funkcí dopaminového systému v mesolimbických oblastech. Hodnocení pohybové aktivity v úloze AAPA tedy ukázalo, že sloučenina z příkladu 9 tuto aktivitu v daném uspořádání experimentu nemění. Výsledky měření lokomoční aktivity jsou na Obr. 3.

Obr. 3. ukazuje celkovou ušlou dráhu za každé sezení v úloze AAPA, a to aplikaci Dizocilpinu a sloučeniny z příkladu 9. Dvě vyšší dávky Dizocilpinu (0,2 a 0,3 mg/kg) způsobily hyperlokomoci, zatímco sloučenina z příkladu 9 nezpůsobila statisticky významnou změnu pohybové aktivity. \* značí signifikantní rozdíl oproti kontrolám ( $P < 0,05$ ), statistické rozdíly byly vyhodnocovány v posledním sezení, kdy je přítomná asymptotická úroveň u kontrol.

#### Příklad 29

##### Počet vstupů do zakázané oblasti

Dalším hodnoceným parametrem v úloze AAPA, tentokrát již parametrem prostorovým, je počet vstupů do zakázané oblasti. Tento parametr ukazuje jak jsou zvířata schopna tuto úlohu řešit, je tedy měřítkem kognitivních funkcí zvířat. Výsledky experimentu ukázaly, že ani jedna z dávek sloučeniny z příkladu 9 nezpůsobila zhoršení v tomto parametru, zatímco Dizocilpin dávkově závisle tento parametr zhoršoval. Tyto výsledky jsou znázorněny na Obr. 4.

Obr. 4. ukazuje počet vstupů do zakázané oblasti jako měřítko kognitivních funkcí za každé sezení v úloze AAPA, a to aplikaci Dizocilpinu a sloučeniny z příkladu 9. Všechny dávky Dizocilpinu způsobily zhoršení v tomto parametru, zatímco sloučenina z příkladu 9 nezpůsobila statisticky významnou změnu kognitivních funkcí. Symbol \* značí signifikantní rozdíl oproti

kontrolám ( $P < 0,05$ ), statistické rozdíly byly vyhodnocovány v posledním sezení, kdy je přítomná asymptotická úroveň u kontrol.

### Příklad 30

#### Maximální doba mezi dvěma vstupy

Dalším měřeným parametrem, který ukazuje na kognitivní schopnosti, byla maximální doba mezi dvěma vstupy, tzv. maximální čas vyhýbání. U tohoto parametru Dizocilpin ve všech třech dávkách signifikantně zhoršoval výkonnost potkanů, avšak sloučenina z příkladu 9 tento účinek neměla. Její aplikace nevedla k signifikantnímu zhoršení kognitivních funkcí ve srovnání s kontrolními zvířaty. Tato část experimentu je graficky znázorněna na Obr.5.

Obr. 5. ukazuje maximální čas vyhýbání jako měřítko kognitivních funkcí za každé sezení v úloze AAPA, a to aplikaci Dizocilpinu a sloučeniny z příkladu 9. Všechny dávky Dizocilpinu způsobily zhoršení v tomto parametru, zatímco sloučenina z příkladu 9 nezpůsobila statisticky významnou změnu kognitivních funkcí. Symbol \* značí signifikantní rozdíl oproti kontrolám ( $P < 0,05$ ), statistické rozdíly byly vyhodnocovány v posledním sezení, kdy je přítomná asymptotická úroveň u kontrol.

Z příkladů 27 až 30 plyne následující shrnutí: Výše uvedené poznatky lze tedy uzavřít tvrzením, že v uvedeném dávkovém rozmezí (1 mg/kg a 10 mg/kg) sloučenina z příkladu 9 nezpůsobuje statisticky významné zhoršení kognitivních funkcí, pokud je aplikována samotná. Tím se výrazně liší od nekompetitivního antagonisty NMDA receptorů, Dizocilpinu, který způsobuje hyperlokomoci a kognitivní deficit v úloze vyhýbání se místu. Tyto výsledky naznačují, že sloučenina z příkladu 9 ve výše uvedeném dávkovém rozmezí nenarušuje bazální synaptickou aktivitu v mozku a mohla by být tedy potenciálně využitelná při prokázání její možné neuroprotektivity (viz níže)

### Příklad 31

Vliv sloučeniny z příkladu 9 na prostorovou kognici po oboustranné lézi hipokampu pomocí excitotoxické sloučeniny NMDA (*N*-methyl-D-aspartátu)

Neuroprotektivní účinek 3 $\alpha$ -substituovaných derivátů pregnanolonu jsme testovali na modelu oboustranné léze hipokampu mikroinjekcí NMDA, agonisty NMDA receptorů. Model intrahipokampální aplikace NMDA je dlouhodobě zavedený model narušení paměťových funkcí u laboratorních hlodavců. Tento model současně simuluje excesivní působení glutamátu na hipokampální buňky, jejichž poškození vede k zhoršení paměti. Vliv léze resp. protektivní vliv látek je sledován jako výkonnost zvířete v behaviorálních úlohách v časovém odstupu od exp. zákroku. V našem případě jsme testovali prostorovou orientaci a kognitivní koordinaci v testu aktivního alotetického vyhýbání se místu.

Všechny pokusy byly prováděny v souladu se Zákonem na ochranu zvířat ČR. V této fázi experimentu jsme sledovali účinnost v závislosti na dávce a v časovém odstupu od indukce excitotoxické léze. K experimentům bylo použito 150 dospělých samců (250-350 g) potkanů kmene Long-Evans. Potkani byli chováni v průhledných plastových boxech o rozměru 25x25x50 cm v klimatizovaném příručním zvěřinci se světelným režimem 12/12 hodin. Zvířata měla neomezený přístup k potravě a vodě.

Během operace byla zvířata fixována ve stereotaktickém aparátu a uvedena do hluboké inhalační anestézie isofluranem (3,5 %, poháněno vzduchem). Iniciační usnutí bylo provedeno diethyletherem v iniciační komoře. Zvířatům byly mikrovrtačkou vyvrtány díry do lebky a následně stereotakticky bilaterálně aplikován mikroinjekcí 1 mikrolitru roztoku NMDA (0,09 mol roztok NMDA ve fyziologickém roztoku, pufováno dihydrogenfosforečnanem vápenatým na  $pH = 7,2$ ), do obou hipokampů. Koordináty aplikace (4 mm dorzálně od *bregma*,  $\pm 2,5$  mm bilaterálně, 4 mm do hloubky) byly odměřeny podle stereotaktického atlasu (Paxinos a Watson, 2005) a ověřeny podle histologických kontrol. Po operaci byli potkani umístěni do měkkých pooperačních boxů. Aplikace sloučeniny z příkladu 9 probíhala podle experimentálního schématu 30 minut před a po, 30 minut po, 3 hodiny po nebo 24 hodin po aplikaci NMDA v dávkách 0,01 mg/kg, 0,1 mg/kg a 10 mg/kg živé váhy. V kontrolních skupinách a skupinám se samotnou lézí byl do hipokampu aplikován pouze fyziologický roztok anebo NMDA. Roztok

sloučeniny z příkladu 9 (0,01 mg/2 ml, 0,1 mg/2 ml nebo 10 mg/2 ml rozpuštěný v cyklodextrinu) byl aplikován subkutánně v dávce 2 ml/kg.

Před začátkem behaviorálního testování byla zvířata ponechána 7 dní v klidu. Poté byla testována 2 dny v úloze aktivního alotetického vyhýbání se místu (AAPA). Každý den zvíře podstoupilo dvě sezení. Potkan byl na začátku sezení umístěn do kruhové arény o průměru 82 cm, která se otáčí rychlostí 1 otáčka/min, s vymezenou zakázanou výsečí (60°), definovanou stabilně v souřadnicích místnosti (Stuchlík et al., 2008). Vstoupil-li potkan do zakázané oblasti arény, byl potrestán mírnou elektrickou rankou. Zvíře mělo na zádech připevněnu infračervenou diodu, která je snímána televizní kamerou nad arénou, napojenou na počítač. Tato oblast není na aréně vyznačená a jediným způsobem, jak zvíře může určit její polohu, je vzhledem k okolním orientačním bodům v místnosti (Stuchlík et al., 2008). Pro správné řešení úlohy zvíře musí mít neporušené neuronální mechanismy prostorové paměti, orientované pozornosti a kognitivní koordinace (Wesierska et al., 2005) pro zdárné zvládnutí úlohy. Úloha je také vysoce závislá na hipokampální formaci u potkanů, kdy již pouhá jednostranná přechodná léze této struktury způsobí poškození orientace v AAPA (Cimadevilla et al., 2001). Z tohoto důvodu jsme tuto úlohu shledali velmi vhodnou pro detekci kognitivního deficitu po lézi hipokampu pomocí NMDA jejího možného zlepšení následkem podání sloučeniny z příkladu 9.

K analýze dat je využíván program TrackAnalysis od firmy Biosignal Group Corp. (USA). Tento program umožňuje analyzovat trajektorii zvířete. Počet vstupů do zakázané oblasti odráží sílu paměťové stopy a tedy kognitivní funkce, podobně jako maximální čas vyhýbání.

Aplikace samotného NMDA vedla k hipokampální lézi a tím k signifikantnímu zhoršení prostorového vyhýbání testovaného následně v úloze AAPA ve srovnání s kontrolními zvířaty. Potenciální zlepšující (a tedy neuroprotektivní) vliv sloučeniny z příkladu 9 v různých dávkách a různých časových odstupech od léze je shrnut v následujících odstavcích. V jednotlivých grafech jsou uváděny vždy průměry a střední chyby průměru (S.E.M.) v posledním sezení, kdy bylo dosaženo asymptotické úrovně výkonnosti u kontrolních zvířat.

### Příklad 32

Vliv sloučeniny z příkladu 9 v dávce 0,01 mg/kg na počet vstupů

Sloučenina z příkladu 9 v dávce 0,01 mg/kg zlepšila následnou výkonnost měřenou jako počet vstupů v úloze AAPA, pokud byl podán 30 minut po provedení NMDA léze. Zajímavé zde je, že pokud byla podána ve dvou dávkách (30 minut před a 30 minut po lézi) toto zlepšení nebylo signifikantní. S delším časovým odstupem tato dávka vliv na následné behaviorální testování neměla. Výsledky jsou uvedeny na obrázku 6.

Obr. 6 ukazuje vliv sloučeniny z příkladu 9 v dávce 0,01 mg/kg na počet vstupů během následného testování v úloze AAPA. Dávka 0,01 mg/kg aplikovaná 30 minut po provedení léze zlepšila výkonnost potkanů ve srovnání se samotnou lézí pomocí NMDA.

### Příklad 33

Vliv sloučeniny z příkladu 9 v dávce 0,01 mg/kg na maximální dobu vyhýbání

Na další kognitivní parametr (maximální doba vyhýbání) měla sloučenina pozitivní účinek, pokud byla aplikována 30 minut po lézi a rovněž pokud byla injikována ve dvou dávkách, 30 minut před a 30 minut po provedení léze pomocí NMDA. Získané výsledky jsou uvedeny na Obr. 7, který uvádí vliv sloučeniny z příkladu 9 v dávce 0,01 mg/kg na maximální čas vyhýbání během následného testování v úloze AAPA. Dávka 0,01 mg/kg aplikovaná 30 min po provedení léze a také 30 minut před a 30 minut po lézi zlepšila výkonnost potkanů ve srovnání se samotnou lézí pomocí NMDA.

### Příklad 34

Vliv sloučeniny z příkladu 9 v dávce 0,1 mg/kg na počet vstupů

Na celkový počet vstupů do zakázané oblasti měla zlepšující (avšak nesignifikantní) vliv tato dávka pouze tehdy, pokud byla aplikována 30 minut po provedení léze, jak ukazuje Obr.8. Zvířata, jímž byla aplikována sloučenina z příkladu 9 v dávce 0,1 mg/kg, a to 30 minut po provedení léze, vykazovala podobnou výkonnost jako kontrolní zvířata, u nichž léze provedena

nebyla, avšak zřejmě díky vysokým rozptylům, nenabyla tato hodnota statistické významnosti. Grafické znázornění výsledků je znázorněno na Obr. 8, kde je uveden vliv sloučeniny z příkladu 9 v dávce 0,1 mg/kg na počet vstupů do zakázané oblasti během následného testování v úloze AAPA. Dávka 0,1 mg/kg aplikovaná 30 minut po provedení léze nesignifikantně zlepšila výkonnost potkanů ve srovnání se samotnou lézí pomocí NMDA.

#### Příklad 35

Vliv sloučeniny z příkladu 9 v dávce 0,1 mg/kg na maximální čas vyhýbání

Podobné výsledky byly obdrženy také pro maximální čas vyhýbání, jak je znázorněno na obr. 9, kde je ukázán vliv sloučeniny z příkladu 9 v dávce 0,1 mg/kg na maximální čas vyhýbání během následného testování v úloze AAPA. Dávka 0,01 mg/kg aplikovaná 30 minut po provedení léze nesignifikantně zlepšila výkonnost potkanů ve srovnání se samotnou lézí pomocí NMDA.

#### Příklad 36

Vliv sloučeniny z příkladu 9 v dávce 10 mg/kg na počet vstupů

Sloučenina z příkladu 9 v dávce 10 mg/kg způsobila statisticky významné zlepšení oproti zvířatům se samotnou lézí pouze v případě, pokud byla aplikována ve dvou dávkách (30 minut před a 30 minut po provedení léze) a rovněž v samostatné dávce aplikované 3 hodiny po provedení léze. V ostatních intervalech nebylo zlepšení signifikantní nebo nebylo pozorováno, jak je znázorněno na Obr. 10, který ukazuje vliv sloučeniny z příkladu 9 v dávce 10 mg/kg na celkový počet vstupů do zakázané oblasti během následného testování v úloze AAPA. Dávka 10 mg/kg aplikovaná 30 minut před a 30 minut po provedení léze a také 3 hodiny po lézi zlepšila výkonnost potkanů ve srovnání se samotnou lézí pomocí NMDA.

## Příklad 37

## Vliv sloučeniny z příkladu 9 v dávce 10 mg/kg na maximální čas vyhýbání

U dalšího parametru kognitivních funkcí, a to maximálního času vyhýbání, bylo u této dávky pozorováno zlepšení ve stejných časových intervalech aplikace jako u počtu vstupů do zakázané oblasti, jak znázorňuje Obr. 11, kde je uveden vliv sloučeniny z příkladu 9 dávce 10 mg/kg na maximální čas vyhýbání ze sezení během následného testování v úloze AAPA. Dávka 10 mg/kg aplikovaná 30 minut před a 30 minut po provedení léze a také 3 hodiny po lézi zlepšila výkonnost potkanů ve srovnání se samotnou lézí pomocí NMDA.

Z předcházejících příkladů 31-37 vyplývá, že sloučenina z příkladu 9 v kombinaci s určitými odstupy od provedení hipokampální léze pomocí NMDA může zlepšit kognitivní výkonnost zvířat ve srovnání se zvířaty, kterým byla provedena pouze léze. To naznačuje potenciální neuroprotektivní působení sloučeniny z příkladu 9 na tento model prostorového učení po provedení hipokampální léze.

## Příklad 38

## Histochemická analýza po oboustranné NMDA lézi hipokampu

Pro histochemickou analýzu oboustrané NMDA léze hipokampu byla zvířata rozdělena do čtyř skupin ve dvou sériích. První skupině bylo aplikováno *i.c.v.* NMDA a sloučenina z příkladu 9 v dávce 1 mg/kg *i.p.*. Druhé skupině aplikován *i.c.v.* NMDA a cyklodextrin *i.p.*. Třetí skupině byl aplikován *i.c.v.* fyziologický roztok a cyklodextrin *i.p.*. Čtvrté skupině aplikován *i.c.v.* fyziologický roztok a sloučenina z příkladu 9 *i.p.* v dávce 1 mg/kg *i.p.* 6 zvířat z každé skupiny bylo perfundováno první, druhý, třetí a čtvrtý den po experimentálním zákroku.

Během operace byla zvířata fixována ve stereotaktickém aparátu a uvedena do hluboké inhalační anestézie isofluranem (3,5 %, poháněno vzduchem). Iniciační uspání bylo provedeno diethyletherem v iniciační komoře. Zvířatům byly mikrovrtačkou vyvrtány díry do lebky a následně stereotakticky bilaterálně aplikován mikroinjekcí 1 mikrolitru roztoku NMDA (0,09 mol roztok NMDA ve fyziologickém roztoku, pufrováno dihydrogenfosforečnanem vápenatým na  $pH = 7,2$ ), do obou hipokampů. Koordináty aplikace (4 mm dorzálně od *bregma*,  $\pm 2,5$  mm

bilaterálně, 4 mm do hloubky) byly odměřeny podle stereotaktického atlasu (Paxinos a Watson, 2005) a ověřeny podle histologických kontrol. Po operaci byli potkani umístěni do měkkých pooperačních boxů stejně jako v příkladu 31.

Aplikace sloučeniny z příkladu 9 probíhala podle experimentálního schématu 30 minut před a po aplikaci NMDA v jedné sérii a 30 minut po v druhé sérii pokusů.

První až čtvrtý den byla zvířata naperfundována. Mozky byly naloženy paraformaldehydu a sacharosy. Potom zamraženy na -70 stupňů Celsia, nařezány na mikrotonu, nabarveny a analyzovány po mikroskopem.

Po hipokampální lézi NMDA při barvení Fluoro Jade B přítomno bilaterální poškození hipokampů v rozsahu gyrus dentatus, CA1-CA3, intenzivnější barvení v oblasti CA2 a gyrus dentatus, méně v subiculu, entorhinální kůře a pre a piriformním kortexu. V neocortexu frontálního a parietálního laloku postiženy cytoarchitektonicky vrstvy 2.-5., v menší míře i první a 6 vrstva. Nejzřetelněji se barvily pyramidové neurony a drobné intersticiální neurony 4. vrstvy. Dále přítomno postižení basálních ganglií a thalamu v oblasti retikulárního jádra, caudatoputamen. Zadní části hipokampů obarveny méně než hipokampální oblast suprakomisurální a ventrální.

Po aplikaci neurosteroidů zřetelné vymizení postižení hipokampů, zejména v oblasti gyrus dentatus a všech polí CA1-CA3, včetně subicula. Přidružené korové oblasti (entorhinální a piriformní kůra) si ponechávaly těžko kvantifikovatelné postižení 2. a 3. vrstvy archikortexu v celém rozsahu až k hranici olfaktorických struktur. Ještě výraznější vymizení poškození v celé oblasti neokortexu (celé pole frontální a prefrontální kůry, parietální a okcipitální kůry, včetně funkčních korových oblastí – zrakové kůry, sluchové kůry a sensorimotorické kůry). Oslabení, ale ne přímo vymizení poškození v oblasti caudatoputamen a thalamických jader.

V obou případech kolokalizace na konfokálním mikroskopu s DAPI ukázala specifické postižení neuronů bez neuroglie.

Tyto výsledky silně potvrzují neuroprotektivní působení sloučeniny z příkladu 9 na poškození hipokampu pomocí intrahipokampální aplikace NMDA.

## Průmyslová aplikovatelnost

Sloučeniny podle předloženého vynálezu jsou průmyslově vyrobitelné a použitelné pro léčení mnoha onemocnění CNS, jako jsou například následující:

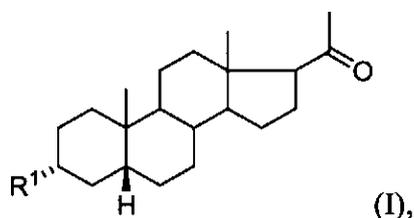
- 1) ischemické poškození CNS
- 2) neurodegenerativní změny a poruchy
- 3) afektivní poruchy, deprese, PTSD a nemoci související se stresem
- 4) schizofrenie
- 5) bolest
- 6) závislosti
- 7) roztroušená skleróza
- 8) epilepsie
- 9) gliomy

## Seznam použité literatury

- Cimadevilla JM, Wesierska M, Fenton AA, Bures J, Inactivating one hippocampus impairs avoidance of a stable room-defined place during dissociation of arena cues from room cues by rotation of the arena, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 98 (2001) 3531-3536.
- Morrow AL. Recent developments in the significance and therapeutic relevance of neuroactive steroids--Introduction to the special issue. *Pharmacol Ther.* 2007; 116(1):1-6.
- Paxinos G, Watson CR, *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates* (5th ed.), Elsevier Academic Press, San Diego (2005)
- Petrovic M, Sedlacek M, Horak M, Chodounska H, Vyklický L Jr. 20-oxo-5beta-pregnan-3alpha-yl sulfate is a use-dependent NMDA receptor inhibitor. *J Neurosci.* 2005; 25(37):8439-50.
- Stuchlik A, Petrasek T, Vales K, Dopamine D2 receptors and alpha1-adrenoceptors synergistically modulate locomotion and behavior of rats in a place avoidance task, *Behav. Brain Res.* 189 (2008) 139-144
- Villmann C, Becker CM. On the hypes and falls in neuroprotection: targeting the NMDA receptor. *Neuroscientist.* 2007; 13(6):594-615.
- Weaver CE, Land MB, Purdy RH, Ruchards KG, Gibbs TT, Farb DH, Geometry and charge determine pharmacological effects of steroids on *N*-methyl-D-aspartate receptor-induced Ca<sup>2+</sup> accumulation and cell death, *J. Pharm. Exp. Ther.* 293 (2000) 747-753.
- Wesierska M, Dockery C, Fenton AA, Beyond memory, navigation, and inhibition: behavioral evidence for hippocampus-dependent cognitive coordination in the rat, *J. Neurosci.* 25 (2005) 2413-2419

## Patentové nároky:

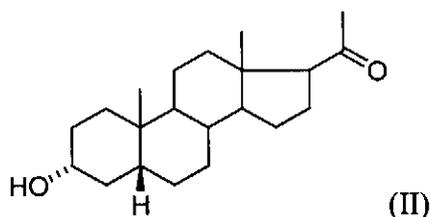
## 1. Sloučeniny obecného vzorce I



v němž

$R^1$  znamená skupinu obecného vzorce  $R^3OOC-R^2-C(R^4)-R^5-$ , kde  $R^2$  znamená alkylovou nebo alkenylovou skupinu s 1 až 18 atomy uhlíku s přímým nebo větveným uhlíkovým řetězcem, které mohou být substituovány jedním nebo více atomy halogenu, aminovou skupinou, která může být buď volná nebo chráněná odstranitelnou chránicí skupinou, alkoxykarbonylovou skupinou, aromatickou skupinou a/nebo heterocyklickou skupinou, kde heteroatom znamená atom kyslíku, síry nebo dusíku,  $R^3$  znamená buď atom vodíku nebo chránicí skupinu karboxylové skupiny, s výhodou benzylovou skupinu,  $R^4$  znamená atom kyslíku, atom dusíku nebo atom síry vázaný dvojnou vazbou nebo  $R^4$  znamená dva atomy vodíku, a  $R^5$  znamená jakýkoliv minimálně dvojný atom, s výhodou atom kyslíku, atom dusíku nebo atom uhlíku, kromě toho, kdy  $R^2$  znamená skupinu  $(CH_2)_n$ , kde  $n = 0-3$ , a současně  $R^3$  znamená atom vodíku a  $R^4$  i  $R^5$  znamenají atom kyslíku.

2. Způsob výroby sloučenin obecného vzorce I podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se 3alfa-hydroxy-5beta-pregnan-20-on vzorce II



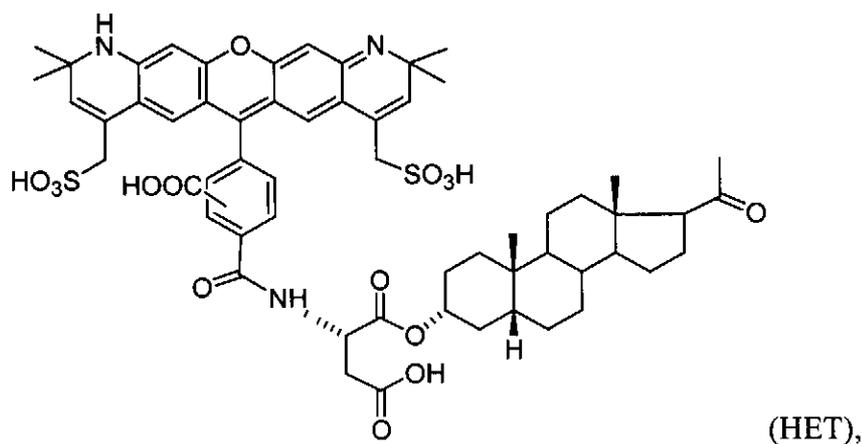
převeďte na sloučeninu obecného vzorce I, kde  $R^1$  znamená jak shora uvedeno a  $R^4$  znamená atom kyslíku, a to tak, že se příslušná dikyselina, popřípadě chráněná na aminové skupině a popřípadě chráněná na jedné karboxylové skupině, rozpustí ve

vhodném rozpouštědle, kterým se ze směsi mohou oddestilováním odstranit zbytky vody, s výhodou v benzenu nebo toluenu, nejvýhodněji v benzenu, načež po odstranění vody oddestilováním části rozpouštědla se reakční směs, ke které je zabráněn přívod vody vhodným způsobem známým z oblasti techniky, ochladí na laboratorní teplotu, pod inertní atmosférou se pomalu přidá kondenzační činidlo, s výhodou DCC, a roztok sloučeniny vzorce II ve vhodném rozpouštědle, s výhodou v aromatickém uhlovodíku, výhodněji v benzenu nebo toluenu, nejvýhodněji v benzenu za přítomnosti katalytického činidla, s výhodou DMAP, načež se tato reakční směs míchá 10-48 hodin, s výhodou přes noc, za teploty od 0 do 50 °C, s výhodou za teploty místnosti, potom se druhý den směs nalije do nasyceného roztoku hydrogenuhličitanu, s výhodou vodného NaHCO<sub>3</sub> nebo KHCO<sub>3</sub>, a produkt se extrahuje organickým rozpouštědlem, ve kterém je dobře rozpustný, například a s výhodou ethyl-acetátem, a spojené organické fáze se promývají vodou do odstranění přítomného hydrogenuhličitanu, vysrážená N,N'-dicyklohexylmočovina se odfiltruje, filtrát se vysuší sušicím činidlem, s výhodou síranem hořečnatým nebo síranem sodným, nejvýhodněji síranem sodným, a rozpouštědlo se odpaří, s výhodou oddestilováním ve vakuu, takto získaný produkt se popřípadě přečistí, s výhodou chromatografií na sloupci silikagelu a získá se tak sloučenina obecného vzorce I, v němž R<sup>1</sup> znamená skupinu obecného vzorce R<sup>3</sup>OOC-R<sup>2</sup>-CO-, kde R<sup>2</sup> znamená alkylovou nebo alkenylovou skupinu s 1 až 18 atomy uhlíku s přímým nebo větveným uhlíkovým řetězcem, které mohou být substituovány jedním nebo více atomy halogenu, aminovou skupinou, která je chráněná odstranitelnou skupinou, a R<sup>3</sup> znamená chránicí skupinu karboxylové skupiny, s výhodou benzylovou skupinu, která se odstraní tak, že se získaná sloučenina rozpustí ve vhodném rozpouštědle, s výhodou v alkoholu, nejvýhodněji v methanolu, a k tomuto roztoku se přidá hydrogenační katalyzátor, s výhodou Pd/CaCO<sub>3</sub>, po hydrogenaci se katalyzátor odfiltruje a rozpouštědlo se odpaří, čímž se získá produkt obecného vzorce I, v němž R<sup>1</sup> znamená skupinu obecného vzorce R<sup>3</sup>OOC-R<sup>2</sup>-CO-, kde R<sup>2</sup> znamená alkylovou nebo alkenylovou skupinu s 1 až 18 atomy uhlíku s přímým nebo větveným uhlíkovým řetězcem, které mohou být substituovány jedním nebo více atomy halogenu, aminovou skupinou, která je chráněná odstranitelnou skupinou, a R<sup>3</sup> znamená atom vodíku.

3. Způsob výroby sloučenin obecného vzorce I podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se tím, že v případě, kdy sloučenina obecného vzorce I získaná podle nároku 2, v němž R<sup>1</sup> znamená skupinu obecného vzorce R<sup>3</sup>OOC-R<sup>2</sup>-CO-, kde R<sup>2</sup> znamená

alkylovou nebo alkenylovou skupinu s 1 až 18 atomy uhlíku s přímým nebo větveným uhlíkovým řetězcem, které mohou být substituovány jedním nebo více atomy halogenu, aminovou skupinou, která je chráněná odstranitelnou skupinou, a  $R^3$  znamená atom vodíku, obsahuje aminovou skupinu, která je chráněná odstranitelnou skupinou, provede se odblokování chránění aminové skupiny tak, že se tato sloučenina rozpustí v organickém rozpouštědle, s výhodou v dichlormethanu, a přidá se trifluoroctová kyselina, načež se tato směs nechá reagovat 0,1 až 48 hodin, s výhodou 16 hodin, při teplotě v rozmezí od 0 °C do 50 °C, s výhodou za teploty místnosti, rozpouštědla se odstraní, odparek se rozpustí v organickém rozpouštědle, s výhodou v methanolu, přidá se pyridin a směs se odpaří dosucha, čímž se získá produkt obecného vzorce I, v němž  $R^1$  znamená skupinu obecného vzorce  $R^3OOC-R^2-CO-$ , kde  $R^2$  znamená alkylovou nebo alkenylovou skupinu s 1 až 18 atomy uhlíku s přímým nebo větveným uhlíkovým řetězcem, které mohou být substituovány jedním nebo více atomy halogenu, aminovou skupinou, a  $R^3$  znamená atom vodíku.

4. Způsob výroby sloučenin obecného vzorce I podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se tím, že v případě, kdy  $R^2$  ve sloučenině obecného vzorce I obsahuje heterocyklickou skupinu, jako je tomu například ve sloučenině vzorce HET



se taková heterocyklická skupina zavádí do molekuly obecného vzorce I například reakcí aktivované karboxylové skupiny s aminovým substituentem na alkylovém řetězci  $R^2$ , při čemž taková karboxylová skupina může být funkcionalizována aktivační skupinou, jako je hydroxybenzotriazolová, substituovaná hydroxybenzotriazolová, skupinou HATU, TATU, s výhodou TSTU ve formě sukcinimidylového esteru, kde tento ester reaguje se

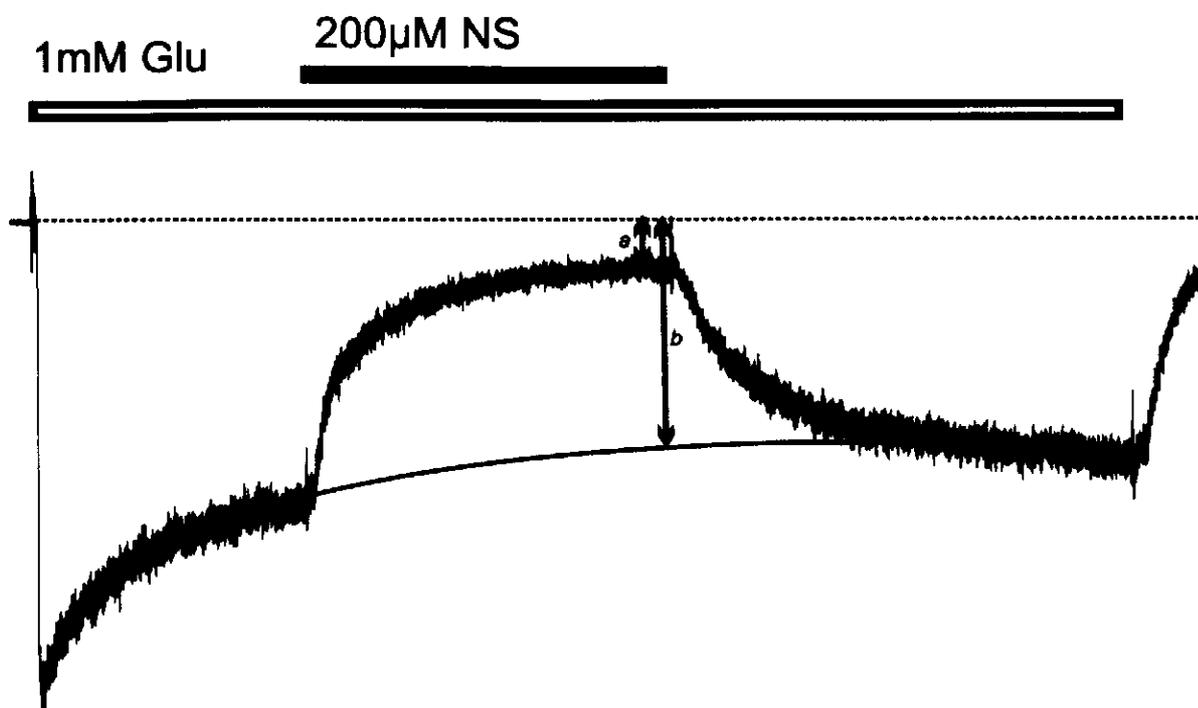
sloučeninou obecného vzorce I, v němž  $R^2$  znamená alkylovou skupinu substituovanou aminovou skupinou, čímž se získá sloučenina obecného vzorce I, v němž  $R^2$  znamená alkylovou skupinu substituovanou aminovou skupinou s navázanou heterocyklickou skupinou HET.

5. Použití sloučenin obecného vzorce I podle nároku 1 pro přípravu léčiva pro léčení různých onemocnění CNS, jako jsou například následující a) ischemické poškození CNS, b) neurodegenerativní změny a poruchy, c) afektivní poruchy, deprese, PTSD a nemoci související se stresem, d) schizofrenie, e) bolest, f) závislosti, g) roztroušená skleróza, h) epilepsie, ch) gliomy.
6. Použití sloučenin obecného vzorce I podle nároku 1 pro přípravu léčiva pro léčení neuropsychiatrických poruch souvisejících s dysbalancemi glutamátergního neuropřenašečového systému, ischemické poškození CNS, neurodegenerativní změny a poruchy CNS, afektivní poruchy, deprese, PTSD a nemoci související se stresem, anxieta, schizofrenie a psychotické poruchy, bolest, závislosti, roztroušená skleróza, epilepsie, gliomy.
7. Použití sloučenin obecného vzorce I podle nároku 1 pro výrobu veterinárního a humáního farmaceutického přípravku pro léčení neuropsychiatrických poruch souvisejících s dysbalancemi glutamátergního neuropřenašečového systému, ischemické poškození CNS, neurodegenerativní změny a poruchy CNS, afektivní poruchy, deprese, PTSD a nemoci související se stresem, anxieta, schizofrenie a psychotické poruchy, bolest, závislosti, roztroušená skleróza, epilepsie, gliomy.
8. Použití sloučenin obecného vzorce I podle nároku 1 pro výrobu látek používaných v experimentálním výzkumu, analytické chemii, potravinového doplňku či kosmetického přípravku.

45  
1/11

28.05.09

PV 2009-34P



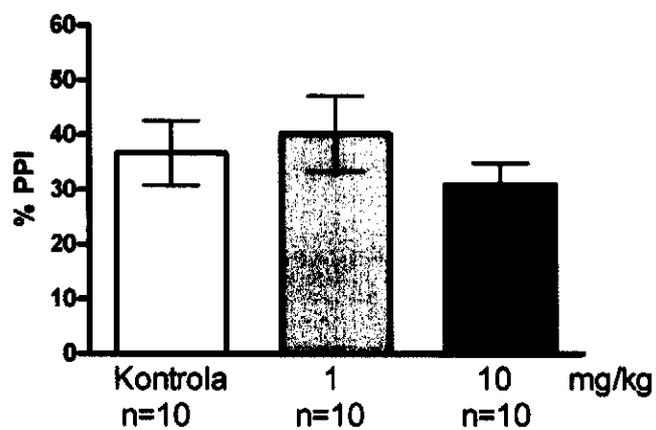
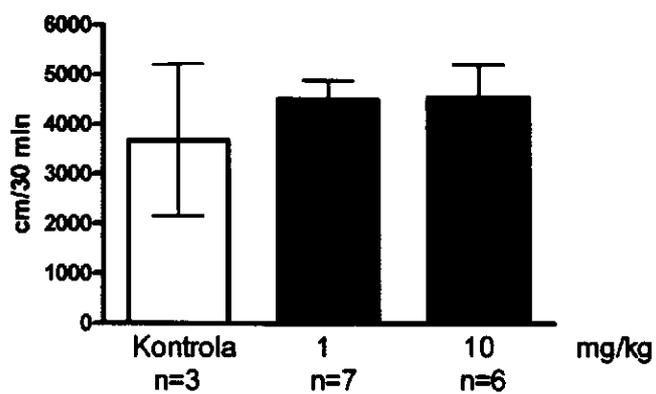
Obrázek 1

Ukázka proudové odpovědi vyvolané aplikací 1 mM glutamátu a vliv sloučeniny z příkladu 9 aplikovaného v koncentraci 200µM současně s glutamátem. Snímání bylo pořízeno technikou patch-clamp z kultivovaných HEK293 buněk transfekovaných NR1/NR2B receptory. Míra inhibice vyvolaná sloučeninou z příkladu 9 byla vypočtena podle vzorce:  $(1-a/b) * 100$  (%).

46  
2/11

28.05.09

PV 2009-34d

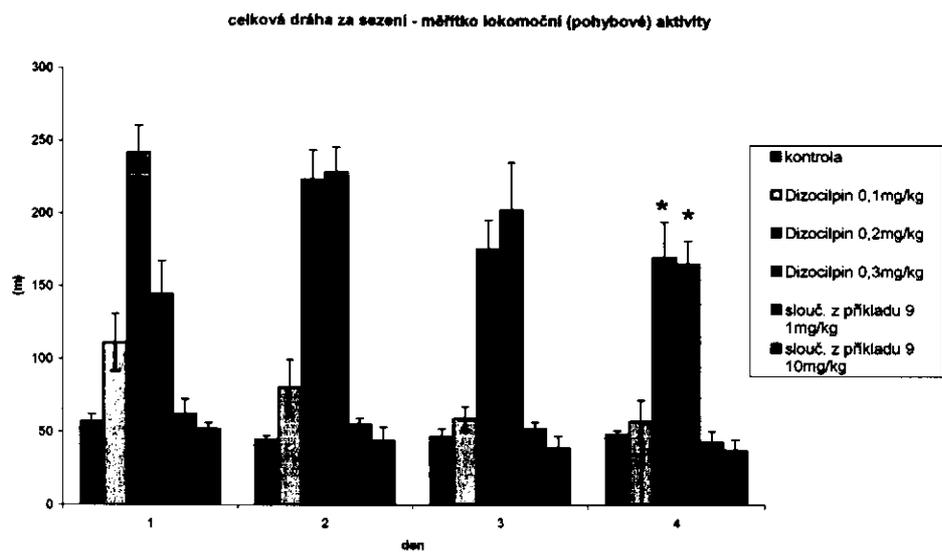


Obrázek 2

A7  
3/11

28.05.09

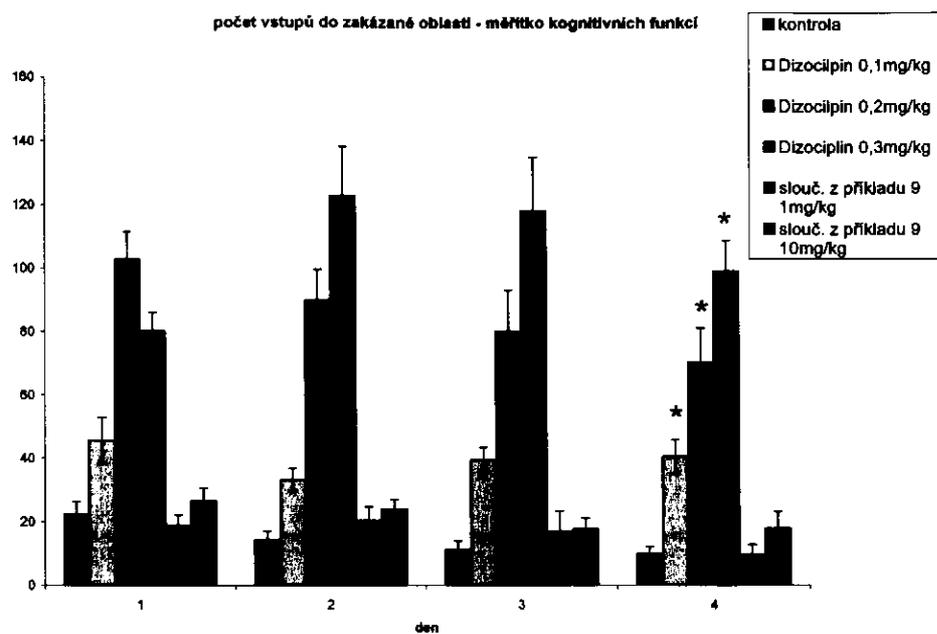
PV 2004-348



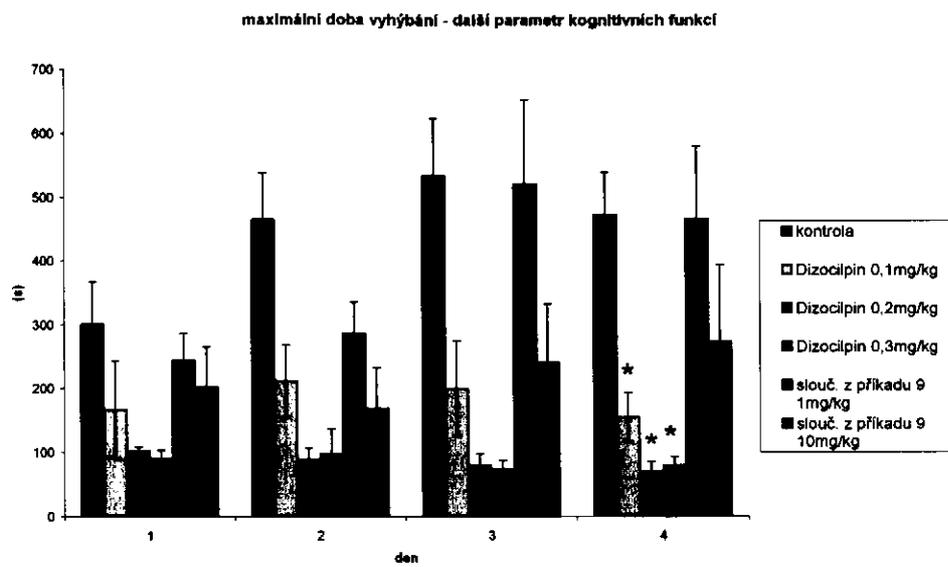
Obrázek 3

48  
4/11

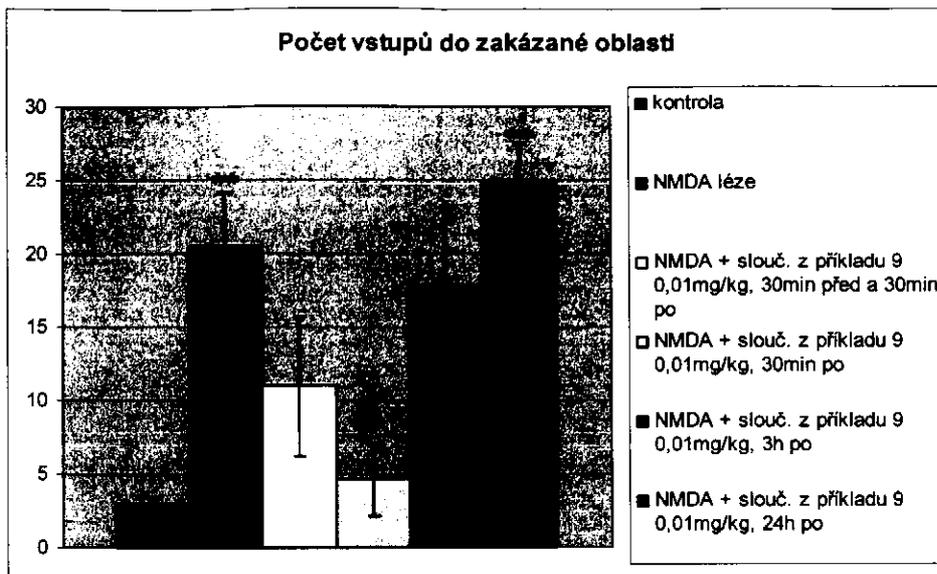
200509  
PV 2009-347



Obrázek 4



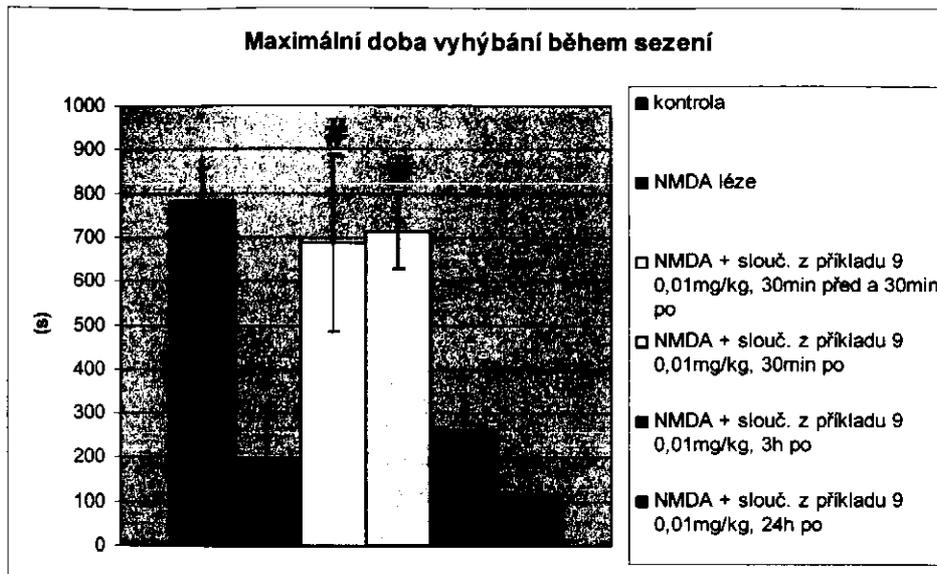
Obrázek 5



Obrázek 6

51  
4/11

28.05.09  
PV 2009-34J

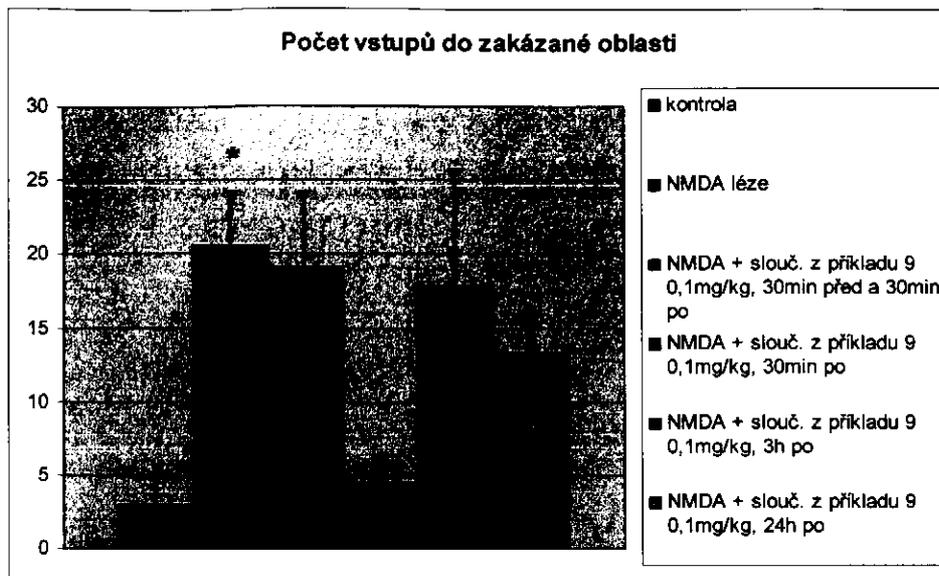


Obrázek 7

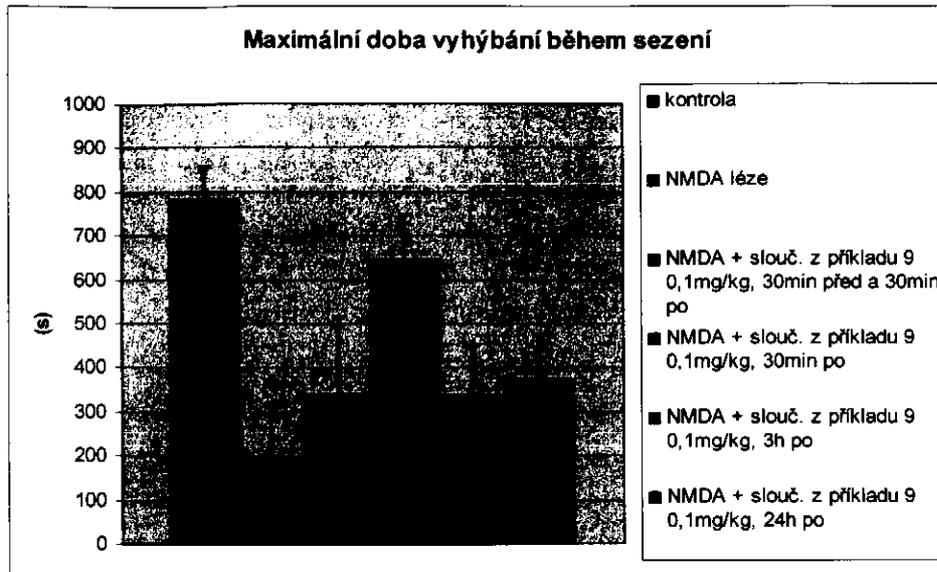
52  
8111

28.05.09

PV 2009-34J



Obrázek 8

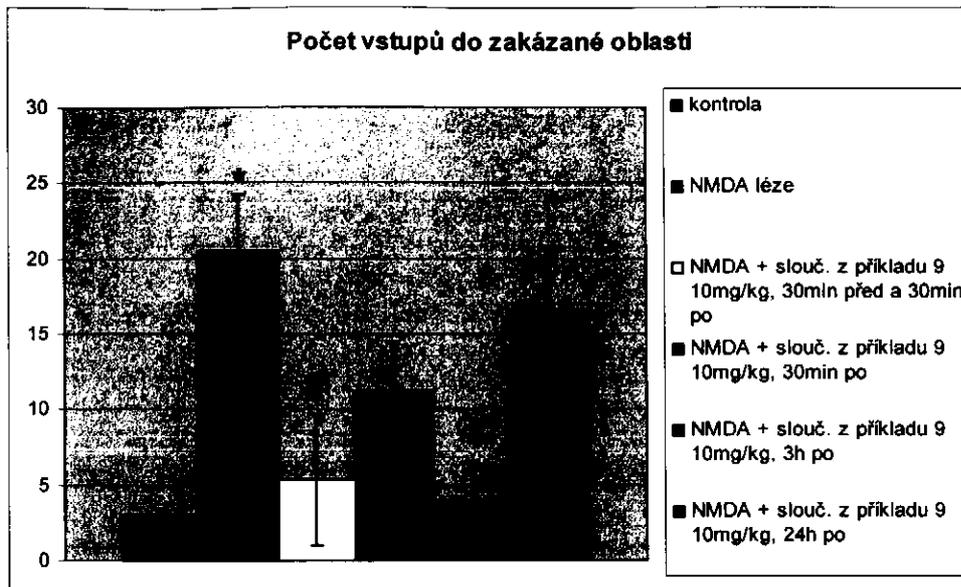


Obrázek 9

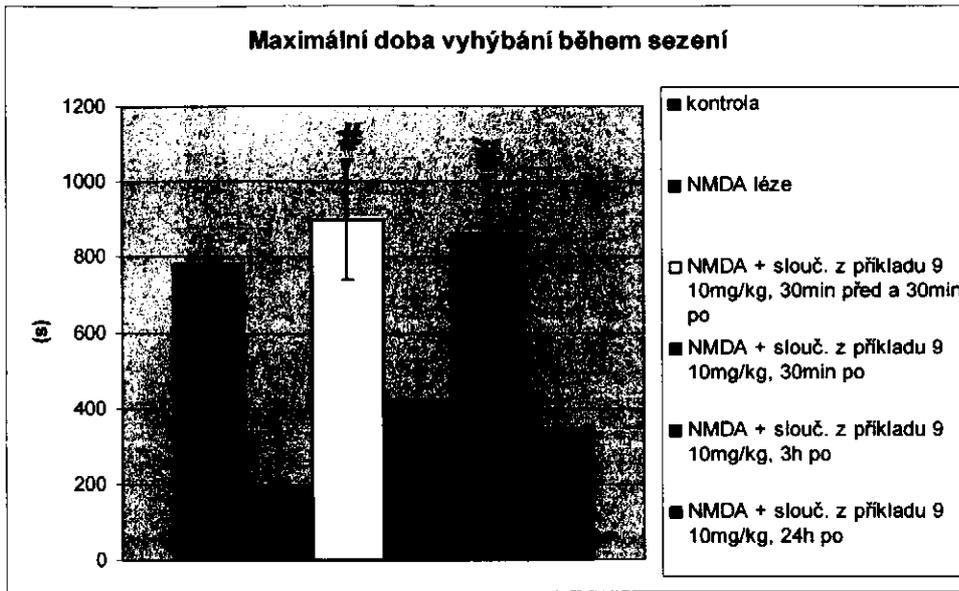
54  
10/11

28.05.09

PV 2009-347



Obrázek 10



Obrázek 11