

PATENTOVÝ SPIS

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2011-81**
(22) Přihlášeno: **15.02.2011**
(40) Zveřejněno: **12.09.2012**
(**Věstník č. 37/2012**)
(47) Uděleno: **02.08.2012**
(24) Oznámení o udělení ve Věstníku: **12.09.2012**
(**Věstník č. 37/2012**)

(11) Číslo dokumentu:

303 443

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.:
C07C 41/00 (2006.01)
A61K 31/57 (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01)

(56) Relevantní dokumenty:

US 2003/0113361 A1; US 2004/0120997 A1.
J. steroid Biochem. Molec. Biol., Vol. 62, No. 4, str. 299-306, 1997; The Regional Brain Distribution of the Neurosteroids...

(73) Majitel patentu:

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

(72) Původce:

Chodounská Hana RNDr. CSc., Praha 6, CZ
Kapas Vojtěch Mgr., Praha 7, CZ
Vyklícký Ladislav MUDr. DrSc., Kamenice, CZ
Borovská Jiřina Mgr., Tuklaty, CZ
Vyklícký Vojtěch Mgr., Kamenice, CZ
Valeš Karel RNDr. Ph.D., Praha 5, Zbraslav, CZ
Stuchlík Aleš RNDr. Ph.D., Čelákovice, CZ
Rambousek Lukáš Bc., Kopřivnice, CZ

(74) Zástupce:

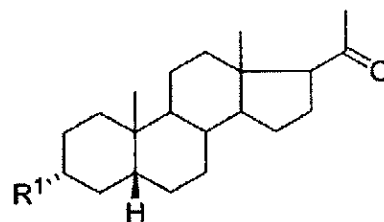
RNDr. Ladislava Součková, CSc., Flemingovo náměstí
542/2, Praha 6, 16610

(54) Název vynálezu:

**Deriváty pregnanolonu substituované v poloze
3alfa kationickou skupinou, způsob jejich
výroby, jejich použití a prostředek je obsahující**

(57) Anotace:

Sloučeniny obecného vzorce I, způsob jejich výroby a jejich použití pro léčení různých onemocnění CNS, zejména pro léčení neuropsychiatrických poruch souvisejících s dysbalancemi glutamatergního neuropřenašedového systému, následků ischemického poškození CNS, neurodegenerativních změn a poruch CNS, afektivní poruchy, deprese, PTSD a nemocí souvisejících se stresem, anxiety, schizofrenie a psychotické poruchy, bolesti, závislosti, roztroušené sklerózy, epilepsie, gliomů. Dále se řeší týká použití sloučenin obecného vzorce I pro výrobu veterinárního a humánního farmaceutického přípravku pro léčení výše uvedených nemocí a farmaceutických přípravků tyto sloučeniny obsahujících.



CZ 303443 B6

Deriváty pregnanolonu substituované v poloze 3alfa kationickou skupinou, způsob jejich výroby, jejich použití a prostředek je obsahující

5 Oblast techniky

Tento vynález se týká steroidních kationických sloučenin, způsobu jejich výroby a jejich použití. Zvláště se tento vynález týká derivátů pregnanolonu substituovaných v poloze 3alfa, které mají v této poloze skupinu schopnou vytvořit kation. Takové deriváty mohou být užitečné pro léčení některých onemocnění centrálního nervového systému (CNS), zvláště pak pro léčbu ischemického poškození CNS, neurodegenerativních změn a poruch, afektivní poruchy, deprese, post-traumatické stresové poruchy (PTSD) a nemocí souvisejících se stresem, anxiétu, schizofrenie a psychotické poruchy, bolesti, závislosti a roztroušené sklerózy, epilepsie a gliomů a jiných nádorů centrální nervové soustavy.

15

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.

25

Typickým příkladem ionotropního glutamátového receptoru jsou N-methyl-D-aspartátové receptory (NMDAR), receptory AMPA (α -amino-3-hydroxy-5-methylisoxazol-4-propionátové) a kianátové receptory. Ačkoliv současné poznatky naznačují úlohu různých podtypů rodiny glutamátových receptorů v glutamátém indukované excitotoxicitě, za klíčového hráče v těchto procesech jsou považovány ionotropní receptory. Aktivace ionotropních glutamátových receptorů vede ke změnám v intracelulárních koncentracích iontů, především vápenatých a sodných. Současné výzkumy ukazují, že kromě vápníku může vést k zániku vápenatých a sodných. Současné výzkumy ukazují, že kromě vápníku může vést k zániku neuronů i zvýšení intracelulárních hladin Na^+ . U neuronů v hipokampální kultuře a v retině může vést aktivace glutamátových receptorů k poškození neuronů prostřednictvím Na^+ kationtů dokonce i bez přítomnosti extracelulárního vápníku. Toxicita vyšších hladin glutamátu je však zpravidla spojována se vzestupem intracelulárních hladin Ca^{2+} . V současnosti je poměrně dobře prokázáno, že existuje přímý vztah mezi nadměrným průnikem vápníku do buněk a glutamátém navozeným poškozením neuronů. Glutamátém vyvolané patologické zvýšení intracelulárního vápníku je připisováno děletrvajícím aktivaci ionotropních glutamátových receptorů. Zvýšení intracelulárního vápníku může spustit sestupnou neurotoxickou kaskádu, která zahrnuje odpřažení mitochondriálního elektronového transportu od syntézy ATP a nadměrnou aktivaci enzymů jako kalpainu a dalších proteas, proteinkinasy, 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).

30

40

45

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 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

55

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 $3\alpha,5\beta$ -pregnanolon-sulfát *use*-dependentním způsobem ovlivňuje aktivitu NMDA receptorů. V důsledku tohoto mechanismu působení vykazuje 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. Předpokládaným neuroprotektivním mechanismem účinku je tedy blokáce excesivního vtoku vápníku do buňky prostřednictvím dlouho otevřených NMDA receptorů. K ostatním typům NMDA receptorů nemají uvedené sloučeniny afinitu, předpokládá se 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_A receptorech. Experimentální studie na zvířecích modelech poukazují na jejich potenciál k 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 mají 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 více typů 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 přetnutí spinální míchy potkanů progesteron zvyšuje počet astrocytů, exprimujících *NO*-syntázu těsně nad a pod místem přetnutí.

Tento steroid rovněž hraje roli v regulaci formování nových myelinových pochev. To bylo ukázáno u regenerujícího potkaního *nervus sciaticus* v kultuře sensorických neuronů a Schwan-

nových buněk. Progesteron rovněž posiluje myelinizaci prostřednictvím aktivace genů, kódujících proteiny účastnící se myelinizace.

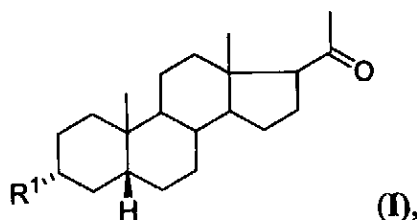
5 Jak již bylo řečeno, neurosteroidy významně moduluji funkci membránových receptorů pro neuropřenašeče, zejména GABA_A receptorů, NMDA receptorů a signal – receptorů. Tyto mechanismy jsou zodpovědné za psychofarmakologické účinky steroidů a částečně vysvětlují jejich antikonvulzivní, anxiolytické, neuroprotektivní 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 nitrobuňkové receptory. Ačkoliv
10 například nejsou doklady o přímé vazbě na glukokortikoidní receptor, neurosteroidy moduluji účinek kortikoidů nepřímo, prostřednictvím interakcí s proteinkinasami A, C, MAPK (mitogeny aktivovaná proteinkinasa) nebo CAMK (kalmodulin–dependentní proteinkinasa). Navíc byl prokázán vliv pregnanolonu a pregnanolon–sulfátu na proteiny asociované s mikrotubuly a na akceleraci polymerace mikrotubulů, čímž dochází k ovlivnění neuronální plasticity. Tyto nově
15 popsané účinky neurosteroidů jsou dosud velmi málo prozkoumané, lze však předpokládat jejich roli v neuroprotektivité.

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 poměr mezi neurosteroidy a jejich sulfatovanými estery udržován enzymaticky. Umělé podání sulfatovaných esterů nemusí
20 v důsledku enzymové aktivity vést k zlepšení sledovaných funkcí. Zde předkládané molekuly představují metabolicky stabilnější analogy sulfatovaných esterů, které vzhledem ke své struktuře snadněji procházejí přes hematoencefalickou bariéru. Sulfatované a tedy polární steroidní sloučeniny obecně hematoencefalickou bariérou nepronikají, ale bylo zjištěno, že pregnanolon–sulfát podaný nitrožilně přes hematoencefalickou bariéru proniká (Wang et al., 1997), nicméně poměr mezi sulfatovaným a nesulfatovaným steroidem se v mozku nemění. V transportu sulfatovaných analogů se pravděpodobně uplatňují aktivní mechanismy spojené s transportním proteinem organických iontů (OATP), který je exprimován v buňkách mozkové tkáně.
25
30

Výhodou zde popsaných sloučenin je to, že si uchovávají podobné farmakologické i fyziologické vlastnosti jako pregnanolon–sulfát, mající terapeutický potenciál, přičemž však nejsou odbourávány sulfatasami.
35

Podstata vynálezu

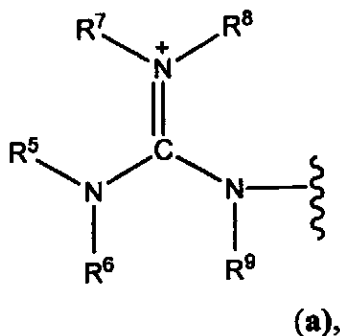
40 Předmětem předloženého vynálezu jsou deriváty pregnanolonu, substituované v poloze 3alfa kationickou skupinou, obecného vzorce I



45 v němž

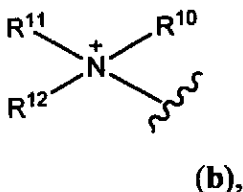
R¹ znamená skupinu obecného vzorce R³–R²–C(R¹³)–R⁴–, kde R² znamená (CH_m)_n–, kde m je 0 až 2, n je 1 až 18 tvořený přímým nebo větveným uhlíkovým řetězcem, který může být dále substituován primární nebo sekundární amino skupinou, která může být buď volná, nebo, v případě

primární aminoskupiny, chráněná odstranitelnou chránicí skupinou, zvolenou z tert-butyloxykarbonylu, tritylu, benzyloxykarbonylu, 9-fluorenylmethoxykarbonylu či p-nitrobenzyloxykarbonylu, R³ znamená kationickou skupinu zvolenou z guanidylové skupiny obecného vzorce a,



5

popřípadě amoniové skupiny obecného vzorce b



10

příčemž R⁵ a R¹² znamenají vodíkové atomy nebo alkylové či alkenylové skupiny s 1 až 18 atomy uhlíku, které tvoří přímý nebo větvený řetězec,

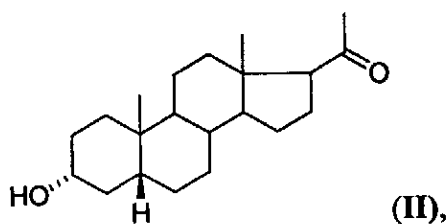
R¹³ je atom kyslíku a R⁴ je atom kyslíku.

15

Dále je předmětem předloženého vynálezu způsob výroby derivátů pregnanolonu, substituovaných v poloze 3alfa kationickou skupinou, obecného vzorce I podle nároku 1, kde R¹ má stejný význam jako bylo uvedeno výše, přičemž substituent R3 je guanidylová skupina vzorce a, R⁴ znamená atom kyslíku,

20

při němž reakční směs, obsahující 3alfa-hydroxy-5beta-pregnan-20-on vzorce



25

arginin chráněný vhodnými chránicími skupinami a dimethylaminopyridin, se rozpustí ve vhodném bezvodém rozpouštědle pod inertní atmosférou, reakční směs se pak ochladí v ledové lázni a za míchání se po kapkách přidává kondenzační činidlo, jímž je dicyklohexylkarbodiimid nebo 1-(3-dimethylamino-propyl)-3-ethylkarbodiimid, rozpuštěné ve vhodném rozpouštědle; za chránění proti přístupu vzdušné vlhkosti se reakční směs míchá 10 až 48 h při teplotě v rozmezí 0 až 50 °C, poté se nalije do nasyceného vodného roztoku hydrogenuhličitanu sodného nebo draselného a produkt se extrahuje organickým rozpouštědlem, ve kterém je dobře rozpustný, následně se spojené organické fáze promývají nasyceným roztokem chloridu sodného do odstranění přítomného hydrogenuhličitanu, extrakt se vysuší a rozpouštědlo se odpaří; surový materiál se přelije minimálním množstvím acetonu a vysrážená močovina se odfiltruje k získání sloučeniny obecného vzorce I, která se může dále podrobit přečištění, přičemž případná chránicí skupina argininové

35

struktury se odstraní tak, že se získaná sloučenina rozpustí ve směsi karboxylové kyseliny a alkoholu, k tomuto roztoku se přidá hydrogenační katalyzátor, s výhodou Pd/C nebo platinová čerň a po hydrogenaci se katalyzátor odfiltruje a rozpouštědlo se odpaří.

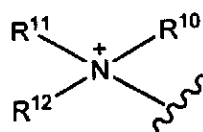
- 5 Výhodně se vhodné chránicí skupiny zvolí z tosylové, 2,2,5,7,8-pentamethylchroman-6-sulfonylové, 2,2,4,6,7-pentamethyl-2,3-dihydrobenzofuran-5-sulfonylové, mesityl-2-sulfonylové, 4-methoxy-2,3,6-trimethylfenylsulfonylové, 1,2-dimethylindol-3-sulfonylové, ω,ω' -bis-tert-butylloxykarbo-nylové, ω -nitro, trifluoroacetylové, ω,ω' -bis-benzyloxykarbonylové či z ω,ω' -bis-allyloxykarbonylové skupiny a jako vhodné rozpouštědlo se použije chloroform, dichlor-
10 methan, benzen, toluen nebo acetonitril.

- Jedno z výhodných provedení způsobu podle předkládaného vynálezu spočívá v tom, že reakční směs se míchá 10 až 12 hodin, použitým organickým rozpouštědlem je s výhodou ethylacetát, k přečištění produktu se použije krystalizace nebo chromatografie na sloupci silikagelu a k roz-
15 puštění produktu v případě odstraňování chránicí skupiny se použije s výhodou směs kyseliny octové s methanolem, přičemž doba hydrogenace se s výhodou zvolí jako 72 hodin.

- Dalším význakem způsobu výroby podle předloženého vynálezu je to, že chránicí skupina argini-
20 nové struktury sloučeniny obecného vzorce I získané jak bylo popsáno výše, již je benzyloxykarbonylová nebo 2,2,4,6,7-pentamethyl-2,3-dihydrobenzofuran-5-sulfonylová (Pbf) skupina, se odstraní působením trifluoroctové kyseliny na chráněný derivát, přičemž se reakční směs nechá reagovat 16 až 72 hodin při teplotě mezi 0 až 50 °C, pak se směs nalije do nasyceného vodného roztoku hydrogenuhlčitanu zvoleném z NaHCO₃ nebo KHCO₃, produkt se extrahuje organickým rozpouštědlem, ve kterém je dobře rozpustný, zvoleném z chloroformu a dichlor-
25 methanu či dichlorethanu, spojené organické fáze se promyjí 5% obj./obj. vodným roztokem kyseliny chlorovodíkové, extrakt se vysuší sušicím činidlem a rozpouštědlo se odpaří; surový materiál se případně čistí například krystalizací, která poskytne dihydrochlorid sloučeniny obecného vzorce I.

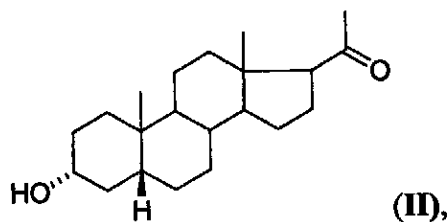
- 30 Význakem způsobu výroby podle vynálezu je dále, že reakční směs se ponechá reagovat při teplotě místnosti, přičemž použitým hydrogenuhlčitanem je s výhodou NaHCO₃ a jako sušící činidlo se použije síran hořečnatý nebo síran sodný a rozpouštědlo se s výhodou odpaří destilací pod vakuem.

- 35 Dále je předmětem vynálezu také způsob výroby sloučeniny obecného vzorce I popsané výše, kde R¹ znamená totéž co výše, přičemž R³ je kvartérní amoniová sůl obecného vzorce b



(b),

- 40 s různou délkou řetězců spojujících amoniovou skupinu s karboxylem, tvořícím esterovou vazbu se sloučeninou obecného vzorce II, jak je popsána výše, jehož podstata spočívá v tom, že se vhodná sůl kvartérní ω -aminokarboxylové kyseliny suspenduje v bezvodém dichlormethanu pod inertní atmosférou, do reakční směsi o teplotě -50 až + 20 °C se přidá vhodné chlorační činidlo, zvolené ze skupiny, zahrnující thionylchlorid, oxychlorid fosforečný a dichlorid kyseliny šťave-
45 lové, přičemž reakci lze usnadnit vhodným katalyzátorem; reakční směs se potom míchá 8 až 72 hodin k rozpuštění všech pevných součástí, těkavé složky směsi se následně odpaří ve vakuu, surový produkt se rozpustí ve směsi bezvodého nitromethanu a pyridinu pod inertní atmosférou, přidá se sloučenina II



a směs se poté míchá 2 až 24 h až do ukončení reakce přidáním vody, následně se směs okyseli na pH 4,0 5% (obj./obj.) vodným roztokem kyseliny chlorovodíkové, organické podíly se extrahují do chloroformu, který se promyje nasyceným roztokem chloridu sodného; získaný roztok se vysuší sušicím činidlem a rozpouštědlo se odpaří, nezreagovaný výchozí materiál se pak odstraní promytím benzenem a produkt se dále, pokud je to vhodné, částí například krystalizací ze směsi vhodných rozpouštědel, která poskytne sloučeninu vzorce I, kde R³ odpovídá obecnému vzorci b, tzn. R³ je kvartérní amoniová sůl.

Dále je význakem způsobu podle předkládaného vynálezu to, že teplota reakční směsi je s výhodou 0 °C, jako chlorační činidlo se s výhodou použije dichlorid kyseliny šťavelové a jako katalyzátor dimethylformamid, přičemž míchání reakční směsi se provádí nejprve 16 hodin a po přidání sloučeniny vzorce III pak 4 hodiny; jako sušicí činidlo se použije síran hořečnatý nebo sodný, rozpouštědlo se odpaří destilací pod vakuem a přečištění produktu krystalizací se provádí ze směsi chloroformu a n-heptanu.

Předložený vynález dále zahrnuje deriváty pregnanolonu, substituované v poloze 3alfa kationickou skupinou, obecného vzorce I který byl uveden výše, pro použití k léčení neuropsychiatrických poruch, souvisejících s nerovnováhami glutamatergního neuropřenašečového systému, jako jsou ischemické poškození centrální nervové soustavy, neurodegenerativní změny a poruchy centrální nervové soustavy, afektivní poruchy, deprese, post-traumatická stresová porucha a nemoci související se stresem, anxieta, schizofrenie a psychotické poruchy, bolest, závislosti, roztroušená skleróza, epilepsie, gliomy.

Předmětem vynálezu je rovněž použití sloučenin obecného vzorce I popsaného výše pro výrobu veterinárního a humánního farmaceutického přípravku pro léčení neuropsychiatrických poruch souvisejících s dysbalancemi glutamatergního neuropřenašečového systému, ischemického poškození CNS, neurodegenerativních změn a poruch CNS, afektivní poruchy, deprese, posttraumatické stresové poruchy a nemocí souvisejících se stresem, anxiety, schizofrenie a psychotických poruch, bolesti, závislosti roztroušené sklerózy, epilepsie, gliomů.

Předmětem předloženého vynálezu je rovněž farmaceutický prostředek, který obsahuje jako aktivní složku deriváty pregnanolonu, substituované v poloze 3alfa kationickou skupinou, obecného vzorce I popsaného výše.

Předmětem vynálezu je konečně i použití derivátů pregnanolonu, substituovaných v poloze 3alfa kationickou skupinou, obecného vzorce I popsaného výše pro výrobu standardů neuroprotektiv a neuroleptik, případně analytických standardů používaných v experimentálním výzkumu a v analytické chemii či jako sloučenin obsažených v potravinových doplncích či kosmetických přípravcích určených pro zlepšování reakcí jednotlivých částí organismu na zvýšený stres zejména oxidativní, nutriční a způsobený volnými radikály, případně na stárnutí.

Vynález je založen na výsledcích 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. Prokázali jsme, že se pregnanolon-sulfát váže pouze na aktivované receptory (use-dependentní účinek), ale neváže se do iontového kanálu jako některé látky typu Mg²⁺, ketamin, dizocilpinu nebo memantinu. Rychlost vazby a mechanismus účinku pregnanolon-sulfátu zapříčiňuje vyšší

inhibiční působení na receptory tonicky aktivované glutamátem než na fáziicky aktivované receptory během synaptického přenosu. Nově bylo zjištěno, že námi syntetizované analogy, kterých se týká vynález, vykazují na NMDA receptorech stejný mechanismus působení jako pregnanolon-sulfát.

5

Aplikace pregnanolon-sulfátu v důsledku enzymové aktivity v CNS nevede k zlepšení sledovaných funkcí, ovšem zde předkládané molekuly představují mnohem výhodnější analogy, které nejsou hydrolyzovatelné sulfatasami.

10 Různé strukturální modifikace námi připravených sloučenin obecného vzorce I navíc ukázaly pouze minimální rozdíly v jejich biologické účinnosti. Tyto nálezy tak potvrzují získané elektrofyziologické výsledky (*patch-clamp*), sledující kinetiku vazby zmíněných látek na NMDA receptory.

15 Údaje dosud publikované jinými pracovišti potvrzují schopnost antagonistů NMDA receptoru předcházet excesivnímu vylití glutamátu a následnému poškození centrální nervové soustavy, což vede ke změnám v chování pokusných zvířat. Ovšem klinické využití takových antagonistů je omezené, vzhledem k tomu, že jejich aplikace vede k celé řadě nejrůznějších vedlejších účinků, projevujících se od poškození motoriky po indukci psychotických příznaků.

20

Hlavní výhodou 3alfa-substituovaných derivátů pregnanolonu je závislost jejich antagonistického účinku na míře excitace NMDA receptorů, což se projevuje nepřítomností vážných vedlejších účinků, typických pro dosud testované (případně používané) kompetitivní NMDA antagonisty, zatímco příznivý efekt těchto antagonistů zůstává zachován.

25

Přehled obrázků na výkrese

30 Obr. 1A znázorňuje proudovou odpověď, vyvolanou aplikací 1 mmol.l^{-1} glutamátu a reverzibilní inhibicí takové proudové odpovědi sloučeninou z příkladu 2, aplikovanou v koncentraci $10 \text{ } \mu\text{mol.l}^{-1}$ současně s glutamátem v intervalech znázorněných obdélníky bez výplně při pozitivním i negativním udržovaném membránovém potenciálu -60 a $+60$ mV. Snímání bylo pořízeno technikou *patch-clamp* z kultivovaných HEK293 buněk s klonovanými NR1/NR2B NMDA receptory. Míra inhibice vyvolaná sloučeninou z příkladu 2 byla vypočtena podle vzorce:

35

$$(1-a/b)*100 (\%).$$

40 Obr. 1B je diagram prokazující nezávislost průměrné inhibice indukované sloučeninou z příkladu 2 ($10 \text{ } \mu\text{mol.l}^{-1}$) v intervalech znázorněných obdélníky bez výplně, vynesené na ose y, na hodnotách udržovaného membránového potenciálu, znázorněných na ose x.

Příklady provedení vynálezu

45 Seznam zkratk:

DMSO	dimethylsulfoxid
DMAP	dimethylaminopyridin
DCC	dicyklohexylkarbodiimid
50 DMF	dimethylformamid
HRMS	hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením
Boc	<i>tert</i> -butoxykarbonyl
Pbf	2,2,4,6,7-pentamethyl-2,3-dihydrobenzofuran-5-sulfonyl

	m	multiplet
	bm	široký multiplet
	d	dublet
	t	triplet
5	EI	ionizace elektronovým nárazem
	ESI	ionizace elektrospřejem
	ekv.	ekvivalent
	IČ	infračervená spektroskopie
	MS	hmotnostní spektroskopie
10	NMR	nukleární magnetická rezonance
	Et	ethyl
	<i>t</i> -Bu	terciární butyl
	Ac	acetyl
	HEK	lidské embryonální ledvinové buňky
15	GFP	zelený fluorescentní protein
	IC ₅₀	koncentrace, při které dochází k 50% inhibici
	Opti-MEM [®] I	minimální esenciální médium, výrobek firmy Invitrogen
	DHEA	5-dehydroepiandrosteron
	EGTA	kyselina ethylenglykoltetraoctová
20	EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
	HEPES	kyselina (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethanesulfonová

Biologická aktivita na buněčných kulturách

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

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

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

45

Příklad 1

20-Oxo-5 β -pregnan-3 α -yl-(2*S*)-2-(benzyloxykarbonylamino)-5-(3-nitroguanidino)pentanoát

5

Do vysušené baňky o objemu 100 ml s magnetickým míchadlem, obsahující směs sloučeniny II (300 mg, 0,94 mmol), N α -(carboxyloxybenzyl)-N ω -nitro-L-guanidinu (366 mg, 1,03 mmol) a DMAP (12 mg; 0,09 mmol) pod argonovou atmosférou bylo přidáno 20 ml bezvodého acetonitrilu a vzniklý roztok ochlazen v ledové lázni. Potom byl za míchání přikapán 1 mol.l⁻¹ roztok dicyklohexylkarbodiimidu v benzenu (1,41 ml; 1,41 mmol). Poté byla reakční směs vyjmuta z chladicí lázně a za teploty místnosti míchána 16 h. Reakce byla ukončena přidáním nasyceného roztoku NaHCO₃ (50 ml), organické podíly byly extrahovány do EtOAc (3x25 ml), promyty nasyceným roztokem chloridu sodného (50 ml), sušeny bezvodým MgSO₄, filtrovány a rozpouštědla byla odpařena ve vakuu. N,N'-Dicyklohexylmočovina byla odstraněna krystalizací za použití malého množství acetonu a odfiltrována. Filtrát byl koncentrován za sníženého tlaku a v toluenu nanesen na sloupec silikagelu (30 g). Eluce směsí petrolether – aceton (7:3, obj./obj.) a následné odpaření rozpouštědel poskytlo 20-oxo-5 β -pregnan-3 α -yl-(2*S*)-2-(benzyloxykarbonylamino)-5-(3-nitroguanidino)pentanoát jako bílou pěnu (473 MG; 77% výtěžek).

20 ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7,41 – 7,31 m (5H, fenyl), 5,67 (d, 1H J = 8,0 Hz, NHCbz), 5,12 (s, 2H, CH₂-Ph), 4,84 – 4,74 (m, 1H, 3-CH), 4,37 – 4,28 (m, 1H, 2'-CH), 3,63 – 3,52 (m, 1H, 5'a-CH), 3,35 – 3,23 (m, 1H, 5'b-CH), 2,57 (t, 1H, J = 9,0 Hz), 2,12 (s, 3H, 21-CH₃), 0,94 (s, 3H, 19-CH₃), 0,60 (s, 3H, 18-CH₃).

25 ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 209,54; 171,34; 159,24, 135,94, 128,70, 128,52, 127,77, 76,34, 67,59, 63,80, 56,60, 52,27, 44,32, 41,87, 40,45, 40,22, 39,09, 35,80, 34,88, 34,61, 32,09, 31,67, 31,51, 26,88, 26,51, 26,25, 24,41, 24,33, 23,22, 22,93, 20,88, 13,42.

30 IČ (CHCl₃): 3397 (NH), 1729 (C=O, ester), 1702 (C=O, keton), 1626, 1606 (C=NH), 1515 (karbamát), 1387 (CH₃), 1348 (NO₂), 1291, 1277 (CO), 1232 (karbamát), cm⁻¹.

ESI m/z 654.1 (45%, [M+H]⁺), 676.3 (100%, [M+Na]⁺); HRMS-ESI m/z 654.3861 ([M+H]⁺, pro C₃₅H₅₂O₇N₅ vypočteno 654.3861).

35

Příklad 2

20-Oxo-5 β -pregnan-3 α -yl-L-argininatodiacetát

40 Sloučenina z příkladu 1 (216 mg; 0,33 mmol) byla rozpuštěna ve směsi kyseliny octové (0,5 ml) a methanolu (9,5 ml). K roztoku bylo přidáno Pd/C (10%, 44 mg) a reakční směs byla míchána pod mírným přetlakem vodíku za teploty místnosti 72 h. Poté byl katalyzátor odfiltrován přes křemelinu a rozpouštědla byla odpařena. Chromatografie na silikagelu (4 g) v MeOH:AcOH:H₂O poskytla 20-oxo-5 β -pregnan-3 α -yl-L-argininatodiacetát (187 mg; 95% výtěžek).

45

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃; d₄-methanol, 4:1) δ 4,82 – 4,74 (m, 1H, 3-CH), 3,47 (t, 1H, J = 6,4 Hz, 2'-CH), 3,15 (t, 2H, J = 6,8 Hz, 5'-CH), 2,58 (t, 1H, J = 8,8 Hz, 17-CH), 2,17 (s, 3H, 21-CH₃), 2,01 (s, 6H, -OOCCH₃), 0,96 (s, 3H, 19-CH₃), 0,61 (s, 3H, 18-CH₃).

50

¹³C NMR (101 MHz, d₄-methanol) δ 212,41, 169,93, 78,62, 65,01, 58,03, 53,89, 45,55, 43,44, 41,95, 41,85, 40,38, 37,34, 36,11, 35,92, 33,36, 31,72, 28,94, 28,19, 27,75, 27,67, 25,80, 25,57, 24,07, 23,81, 22,13, 13,88.

IČ (KBr): 3342, 3267, 3167 (NH₃⁺), 1726 (C=O, ester), 1699 (C=O, keton + guanidinium), 1679, 1601), (guanidinium), 1551, 1408 (AcO⁻), 1387 (CH₃), 1364 (COCH₃), 1235, 1167 (CO) cm⁻¹.

ESI m/z 475.3 (100%, [M-2AcOH+H]⁺); HRMS-ESI m/z 475.3640 ([M-2AcOH+H]⁺, pro C₂₇H₄₇O₃N₄ vypočteno 475.3643).

Příklad 3

20-Oxo-5β-pregnan-3α-yl-2-[(tert-butoxykarbonyl)amino]-5-(3-{[2,2,4,5,7-pentamethyl-2,3-dihydrobenzofuran-6-yl]sulfonyl}guanidino)pentanoát

Do vysušené baňky o objemu 100 ml s magnetickým míchadlem, obsahující směs sloučeniny II (500 mg, 1,57 mmol), Boc-L-Arg(Pbf)-OH (994 mg, 1,88 mmol) a dimethylaminopyridinu (DMAP; 21 mg; 0,16 mmol) a naplněné argonem byl přidán bezvodý benzen (45 ml) a reakční směs byla ochlazena v ledové lázni. Poté byl přikápan roztok dicyklohexylkarbodiimidu (DCC) v benzenu (1 mol.l⁻¹, 1,41 ml; 1,41 mmol). Směs byla zahřáta na laboratorní teplotu a míchána 16 hodin. Přidáním nasyceného roztoku NaHCO₃ (50 ml) byla reakce ukončena. Produkt byl extrahován do EtOAc (3x25 ml), organická fáze promyta nasyceným roztokem chloridu sodného (50 ml), sušena bezvodým MgSO₄, filtrována a rozpouštědla byla odpařena za sníženého tlaku. N,N'-dicyklohexylmočovina byla odkrystalizována z malého množství acetonu a odfiltrována. Filtrát byl odpařen za sníženého tlaku a chromatografován na sloupci silikagelu (50 g) ve směsi petrolether:aceton (7:3, obj./obj.). Odpařením rozpouštědel byl získán 20-oxo-5β-pregnan-3α-yl-2-[(tert-butoxykarbonyl)amino]-5-(3-(2,2,4,5,7-pentamethyl-2,3-dihydrobenzofuran-6-yl)sulfonyl)guanidino)pentanoát ve formě bílé pěny (1,29 g; 99% výtěžek).

[α]_D + 53,0 (c 0,234, CHCl₃);

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 6,31 (bm, 1H, guanidin), 6,04 (s, 2H, guanidin), 5,30 (d, 1H, J = 7,7 Hz, NHBoc), 4,82 – 4,74 (m, 1H, 3-CH), 4,25 – 4,19 (bm, 1H, 2'-CH), 3,40 – 3,30 (m, 1H, 5'a-CH), 3,25 – 3,15 (m, 1H, 5'b-CH), 2,96 (s, 2H, CH₂), 2,59 (s, 3H, CH₃), 2,53 (s, 3H, CH₃), 2,53 (t, 1H, J = 9,0 Hz), 2,10 (s, 3H, 21-CH₃), 1,46 (s, 3H, 2xCH₃), 1,43 (s, 9H, tBu), 0,94 (s, 3H, 19-CH₃), 0,59 (s, 3H, 18-CH₃).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 209,55, 171,81, 158,70, 156,01, 138,37, 133,08, 132,35, 124,54, 117,42, 86,31, 80,49, 75,94, 63,79, 56,57, 44,29, 43,29, 41,88, 40,89, 40,41, 39,10, 35,80, 34,92, 34,62, 32,13, 31,49, 28,59, 28,35, 26,89, 26,57, 26,26, 24,39, 23,23, 22,91, 20,87, 19,21, 17,84, 13,40, 12,45.

IČ (CHCl₃): 3432, 3345 (NH), 1728 (C=O, ester), 1699 (C=O, keton), 1633, 1623, 1559 (guanidin), 1506 (NHBoc), 1408 (guanidin), 1393 (tBu), 1385, 1370, (CH₃), 1358 (COCH₃), 1158 (SO₂), cm⁻¹.

ESI m/z 827.5 (63%, [M+H]⁺), 849,5 (100%, [M+Na]⁺); HRMS-ESI m/z 827,49907 ([M+H]⁺, pro C₄₅H₇₁O₈N₄S vypočteno 827,49871).

Pro C₄₅H₇₀N₄O₈S (827,1) vypočteno: 65,34 % C, 8,53 % H, 6,67 N, 3,88 % S; nalezeno: 65,51 % C, 8,68 % H, 6,43 % N, 3,70 % S.

Příklad 4

20-Oxo-5 β -pregnan-3 α -yl-L-argininát dihydrochlorid

5

Sloučenina z příkladu 3 (430 mg; 0,52 mmol) byla rozpuštěna v neředěné kyselině trifluoroctové (0,5 ml) a míchána 48 h při teplotě místnosti. Reakční směs byla potom nalita do nasyceného roztoku NaHCO₃ (50 ml), produkt extrahován chloroformem (4x20 ml), organická fáze promyta roztokem HCl (5%, 50 ml), vysušena bezvodým Na₂SO₄, přefiltrována a rozpouštědla byla odpařena za sníženého tlaku. Krystalizace z chloroformu poskytla bílé krystaly dihydrochloridu 20-oxo-5 β -pregnan-3 α -yl-L-argininátu (225 mg; 79% výtěžek).

10

$[\alpha]_D +71,4$ (c 0.224; MeOH);

15

¹H NMR (500 MHz, d₄-methanol) δ 4,92 – 4,88 m (1H, 3-CH), 4,84 – 4,74 (m, 1H, 3-CH), 4,06 (t, 1H, J = 6,4 Hz, 2'-CH), 3,27 (t, 2H, J = 6,8 Hz, 5'-CH), 2,64 (t, 1H, J = 8,8 Hz, 17-CH), 2,12 (s, 3H, 21-CH₃), 0,99 (s, 3H, 19-CH₃), 0,61 (s, 3H, 18-CH₃).

20

¹³C NMR (101 MHz, d₄-methanol) δ 212,41, 169,93, 78,62, 65,01, 58,03, 53,89, 45,55, 43,44, 41,95, 41,85, 40,38, 37,34, 36,11, 35,92, 33,36, 31,72, 28,94, 28,19, 27,75, 27,67, 25,80, 25,57, 24,07, 23,81, 22,13, 13,88.

25

IR (KBr): 2935 (NH₃⁺), 1744 (C=O, ester), 1706 (C=O, keton), 1667, 1652, 1625 (guanidinium), 1385 (CH₃), 1358 (COCH₃), 1226, 1193 (CO), cm⁻¹.

25

ESI m/z 475.4 (100%, [M+2Cl+H]⁺); HRMS-ESI m/z 475.36398 ([M-2Cl+H]⁺, pro C₂₇H₄₇O₃N₄ vypočteno 475,36427).

30

Pro C₂₇H₄₈C₁₂N₄O₃ (547,6) vypočteno: 59,22 % C, 8,84 % H, 12,95 % Cl, 10,23 % N; nalezeno: 58,95 % C, 8,72 % H, 13,11 % Cl, 9,99 % N.

Příklad 5

35

20-Oxo-5 β -pregnan-3 α -yl-L-(methylguanidino)-acetát hydrochlorid

Bezvodý kreatin (59 mg; 0,5 mmol) byl rozpuštěn v tetrahydrofuranu (15 ml); po přidání sloučeniny II (160 mg, 0,5 mmol), bezvodého síranu hořečnatého (2 g) a katalytického množství kyseliny sírové (0,02 ml) byla vzniklá směs míchána 16 h za laboratorní teploty. Reakční směs byla potom nalita do vody s ledem, produkt extrahován chloroformem (4x20 ml), organická fáze promyta ledovým roztokem NaHCO₃ (5%), 5% roztokem HCl (20 ml), vysušena bezvodým Na₂SO₄, přefiltrována a rozpouštědla byla odpařena za sníženého tlaku. Krystalizace z chloroformu poskytla 20-oxo-5 β -pregnan-3 α -yl 2-(methylguanidino)-acetát hydrochlorid (107 mg; 47 %).

45

¹H NMR (500 MHz, d₄-methanol) δ 4,92 – 4,88 (m, 1H, 3-CH), 3,53 (s, 2H, N-CH₂), 3,04 (s, 3H, N-CH₃), 2,57 (t, 1H, J = 8,8 Hz, 17-CH), 2,12 (s, 3H, 21-CH₃), 0,99 (s, 3H, 19-CH₃), 0,61 (s, 3H, 18-CH₃).

50

IR (KBr): 2935 (NH₃⁺), 1744 (C=O, ester), 1706 (C=O, keton), 1667, 1652, 1625 (guanidinium), 1385 (CH₃), 1358 (COCH₃), 1226, 1193 (CO), cm⁻¹.

ESI m/z 418.3 (100%, [M-Cl+H]⁺); HRMS-ESI m/z 418.3073 ([M-Cl+H]⁺, pro C₂₄H₄₀O₃N₃ vypočteno 418,3070).

Příklad 6

20-Oxo-5 β -pregnan-3 α -yl-4-(trimethylamonium)-butanoát chlorid

3-Karboxy-N,N,N-trimethylpropan-1-aminium chlorid (připravený podle Lindstedt and Lindstedt, 1965, 321; 69 mg; 0,38 mmol) byl suspendován v bezvodém CH₂Cl₂ (1 ml) v atmosféře argonu. K reakční směsi ochlazené v ledové lázni byl přidán po kapkách dichlorid kyseliny šťavelové (0,5 ml; 5,82 mmol), následovaný katalytickým množstvím bezvodého DMF (3 μ l; 0,03 mmol). Heterogenní směs byla temperována na laboratorní teplotu a při té míchána 16 h. Během této doby se vytvořil čirý roztok. Kapalně podílily směsi byly za sníženého tlaku odpařeny a pevný zbytek rozpuštěn v nitrometanu (2 ml) a bezvodém pyridinu (0,10 ml; 1,24 mmol) pod argonem. K tomuto roztoku byla přidána sloučenina II (100 mg; 0,31 mmol). Reakční směs byla míchána 4 hodiny a následně byla reakce ukončena přidáním vody (10 ml). Vzniklá směs byla okyselena na pH 4 vodným roztokem HCl (5% obj./obj.). Produkt byl extrahován do CHCl₃ (3 x 20 ml), roztok promyt nasyceným vodným NaCl (10 ml), vysušen MgSO₄ a odpařen za sníženého tlaku. Nezreagovaný výchozí steroid II byl odstraněn triturací benzenem a zbylý produkt byl krystalizován ze směsi CHCl₃: *n*-heptan (1:1). Byly tak získány jehlicovité krystaly (134 mg; 89% výtěžek).

$[\alpha]_D = +88,4$ (c 0,243);

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 4,76 – 4,68 (m, 1H, 3-CH), 3,73 – 3,65 (bm, 2H, 4'-CH₂), 3,47 (s, 9H, NCH₃), 2,55 (t, 1H, J = 9,0 Hz, 17-CH), 2,49 (t, 2H, J = 6,2 Hz, 2'-CH₂), 2,12 (s, 3H, 21-CH₃), 0,94 (s, 3H, 19-CH₃), 0,60 (s, 3H, 18-CH₃).

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 4,76 – 4,68 (m, 1H, 3-CH), 3,73 – 3,65 (bm, 2H, 4'-CH₂), 3,47 (s, 9H, NCH₃), 2,55 (t, 1H, J = 9,0 Hz, 17-CH), 2,49 (t, 2H, J = 6,2 Hz, 2'-CH₂), 2,12 (s, 3H, 21-CH₃), 0,94 (s, 3H, 19-CH₃), 0,60 (s, 3H, 18-CH₃).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 209,47, 171,49, 75,20, 65,61, 63,79, 56,62, 53,45, 44,26, 41,83, 40,41, 39,13, 35,76, 34,96, 34,59, 32,19, 31,46, 30,27, 26,87, 26,59, 26,24, 24,37, 23,22, 22,89, 20,82, 18,46, 13,38.

IČ (CHCl₃): 2956 (NMe₃⁺), 1722 (C=O, ester), 1699 (C=O, keton), 1478 (NMe₃⁺) 1386 (CH₃), 1360 (COCH₃), 1230 (NMe₃⁺), 1188 (CO), cm⁻¹.

ESI m/z 446,6 (100%, [M-Cl]⁺); HRMS-ESI m/z 446,3624 ([M-Cl]⁺, pro C₂₈H₄₈O₃N vypočteno 446,3629).

Pro C₂₈H₄₈ClNO₃ (482,1) vypočteno: 69,75 % C; 10,03 % H; 7,35 % Cl; 2,91 % N; nalezeno: 69,59 % C; 9,99 % H; 2,82 % N; 7,12 % Cl.

Příklad 7

20-Oxo-5 β -pregnan-3 α -yl-6-(trimethylamonium)-hexanoát chlorid

Z 5-karboxy-N,N,N-trimethylpentan-1-amoniumchloridu (210 mg, 1 mmol) bylo analogickým postupem jako v příkladu 6 připraveno 101 mg 20-oxo-5 β -pregnan-3 α -yl 6-(trimethylamonium)-hexanoát chloridu (výtěžek 76 %).

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 4,74 – 4,67 (m, 1H, 3–CH), 3,71 – 3,53 (bm, 2H, 5'– CH_2), 3,45 (s, 9H, NCH_3), 2,56 (t, 1H, $J = 8,9$ Hz, 17–CH), 2,49 (t, 2H, $J = 6,1$ Hz, 2'– CH_2), 2,12 (s, 3H, 21– CH_3), 0,95 (s, 3H, 19– CH_3), 0,61 (s, 3H, 18– CH_3).

5 IČ (CHCl_3): 2958 (NMe_3^+), 1720 (C=O, ester), 1700 (C=O, keton), 1478 (NMe_3^+) 1386 (CH_3), 1360 (COCH_3), 1231 (NMe_3^+), 1187 (CO), cm^{-1} .

ESI m/z 474,4 (100%, $[\text{M}-\text{Cl}]^+$); HRMS–ESI m/z 474,3949 ($[\text{M}-\text{Cl}]^+$, pro $\text{C}_{28}\text{H}_{48}\text{O}_3\text{N}$ vypočteno 474,3947).

10

Příklad 8

20–Oxo–5 β –pregnan–3 α –yl–2–(trimethylamonium)–acetát chlorid

15

Dichlorid betainu byl připraven z betainu (62 mg, 0,4 mmol) v bezvodém CH_2Cl_2 (1 ml) pod argonem. K reakční směsi ochlazené v ledové lázni byl přidán po kapkách oxalylchlorid (0,5 ml; 5,82 mmol), následovaný katalytickým množstvím bezvodého DMF (3 μl ; 0,03 mmol). Heterogenní směs byla ponechána zahřát na laboratorní teplotu a míchána po dobu 16 h, za kterou se rozpustily všechny pevné podíly. Poté byla reakční směs za sníženého tlaku odpařena do sucha a pevný zbytek rozpuštěn v nitromethanu (2 ml) a bezvodém pyridinu (0,10 ml; 1,24 mmol) v argonové atmosféře. K roztoku chloridu byla přidána sloučenina II (100 mg; 0,31 mmol). Reakční směs byla míchána 4 h a následně byla reakce ukončena přidáním vody (10 ml). Vzniklá směs byla okyselena na pH 4 vodným roztokem HCl (5% hm./hm.). Produkt byl extrahován do CHCl_3 (3 x 20 ml), spojené organické extrakty promyty nasyceným vodným NaCl (10 ml), vysušeny MgSO_4 a rozpouštědla byla odpařena za sníženého tlaku. Nezareagovaný výchozí lipofilní materiál byl odstraněn vmytím benzenem a zbylý produkt byl krystalizován ze směsi CHCl_3 : *n*-heptan, 1:1. (81 mg; 62 %).

30 $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 4,76 – 4,68 (m, 1H, 3–CH), 3,78 – 3,78 (d, 2H, 2'– CH_2), 3,49 (s, 9H, NCH_3), 2,53 (t, 1H, $J = 9,0$ Hz, 17–CH), 2,12 (s, 3H, 21– CH_3), 0,94 (s, 3H, 19– CH_3), 0,60 (s, 3H, 18– CH_3).

35 IČ (CHCl_3): 2956 (NMe_3^+), 1722 (C=O, ester), 1699 (C=O, keton), 1478 (NMe_3^+), 1386 (CH_3), 1360 (COCH_3), 1230 (NMe_3^+), 1188 (CO), cm^{-1} .

ESI m/z 418,3 (100%, $[\text{M}-\text{Cl}]^+$); HRMS–ESI m/z 418,3323 ($[\text{M}-\text{Cl}]^+$, pro $\text{C}_{28}\text{H}_{48}\text{O}_3\text{N}$ vypočteno 446,3319).

40

Příklad 9

Vliv pregnanolon sulfátu a jeho analogů na rekombinantní NMDA receptory

45 HEK293 buňky (American Type Culture Collection, ATTC No. CRL1573, Rockville, MD) byly kultivovány v médiu Opti–MEM[®] I (Invitrogen) s přidavkem 5% fetálního telecího séra při 37 °C a transfekovány NR1–1a/NR2B/GFP plazmidy, jak bylo popsáno dříve (Cais a další 2008). Stejná množství (0,3 μg) cDNA kódující NR1, NR2 a GFP (green fluorescent protein) (pQBI 25, Takara, Japonsko) byla smíchána s 0,9 μl Matra–A Reagent (IBA, Göttingen, Germany) a přidána ke konfluentním HEK293 buňkám, kultivovaných v 24jamkové destičce. Po trypsinizaci byly buňky resuspendovány v médiu Opti–MEM[®] I, obsahujícím 1% fetální telecí sérum. Do směsi byla dále přidány 20 mmol.l^{-1} MgCl_2 , 1 mmol.l^{-1} D,L–2–amino–5–fosfonopentanové kyseliny 3 mmol.l^{-1} kynurenové kyseliny a buňky byly nasazeny na polylysinem potažená krycí sklička o průměru 25 mm. Po transfekci byly použity následující geny kódující podjednotky NMDA

receptorů: NR1-1a (GenBank, přírůstkové č. U08261) a NR2B (GenBank, přírůstkové č. M91562).

Pro elektrofyziologické pokusy byly použity kultury HEK293 buněk 16 až 40 hodin po transfekci. Proudové, vzniklé při snímání z celé buňky, byly měřeny pomocí patch-clamp zesilovače (Axopatch 1D; Axon Instruments, Inc. Foster City, USA) po kompenzaci kapacity a sériového odporu (<10 MΩ) na 80 až 90 %. Agonistou indukované odpovědi byly filtrovány na 1 kHz (filtr 8-pole Bessel; Frequency Devices, Haverhill, USA), digitalizovány při 5 kHz a analyzovány softwarovým programem pClamp verze 9 (Axon Instruments). Borosilikátové mikropipety byly naplněny intracelulárním roztokem, který obsahoval 125 mmol.l⁻¹ D-glukonové kyseliny, 15 mmol.l⁻¹ chloridu cesného, 5 mmol.l⁻¹ EGTA, 10 mmol.l⁻¹ HEPES, 3 mmol.l⁻¹ chloridu hořečnatého, 0,5 mmol.l⁻¹ chloridu vápenatého a 2 mmol.l⁻¹ hořečnaté soli ATP (pH upraveno na 7,2 roztokem hydroxidu sodného). Extracelulární roztok (ECS) obsahoval 160 mmol.l⁻¹ chloridu sodného, 2,5 mmol.l⁻¹ chloridu draselného, 10 mmol.l⁻¹ HEPES, 10 mmol.l⁻¹ glukózy, 0,2 mmol.l⁻¹ EDTA a 0,7 mmol.l⁻¹ chloridu vápenatého (pH upraveno na 7,3 roztokem hydroxidu sodného). Glycin byl přidán jak do testovacího, tak do kontrolního roztoku. Roztoky se steroidem byly připraveny z čerstvě připraveného zásobního roztoku (20 mmol.l⁻¹) steroidu rozpuštěného v dimethylsulfoxidu (DMSO). Ve všech extracelulárních roztocích byla použita stejná koncentrace DMSO. Kontrolní a testovací roztoky byly aplikovány mikroprocesorem kontrolovaným systémem promývání, s rychlostí výměny roztoku v okolí buňky ~10 ms.

Proudové odpovědi vyvolané 100 μM NMDA (v případě hipokampálních neuronů) byly měřeny při udržovaném membránovém potenciálu -60 mV. V souladu s předchozími výsledky pregnanolon-sulfát snížil amplitudu NMDA-indukované odpovědi. Při použití 100 μmol.l⁻¹ pregnanolon-sulfátu byl průměrný inhibiční efekt 67,2 ± 8,2 % (n = 5) na rekombinantních NR1/NR2B receptorech (Petrovic a spol., J. Neurosci. 2005, 25(37), 8439 až 50). Syntetická analoga pregnanolon-sulfátu měla inhibiční efekt (obrázek 1) v koncentraci 10 μmol.l⁻¹ (tak aby míra inhibice byla v rozmezí 30 až 70 % maximální inhibice). Relativní míra steroidem indukované inhibice byla použita pro výpočet IC₅₀. IC₅₀ byly vypočítány z rovnice $RI = 1 - (1/1 + ([steroid]/IC_{50})^h)$, kde RI je relativní míra steroidem indukované inhibice a he je parametr Hillova koeficientu (1,2). Hodnoty IC₅₀ jsou uvedeny v následující tabulce.

Nově syntetizované analogy (z příkladů 2, 4 – 6) 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 (μmol)	Počet buněk	Koncentrace (μmol.l ⁻¹)
Pregnanolon-sulfát	67,2 ± 8,2	55	5	100
Sloučenina z příkladu 2 a 4	69,2 ± 9,6	5,3+/-2,1	5	10
Sloučenina z příkladu 6	65,4 ± 3,4	5,9+/-0,7	5	10

Výsledky ukazují, že syntetizované analogy pregnanolon-sulfátu mají stejný mechanismus působení na NMDA receptorech jako pregnanolon-sulfát, liší se však svojí relativní afinitou k NMDA receptoru. Všechny pokusy byly prováděny v souladu se Zákonem na ochranu zvířat proti týrání.

Průmyslová využitelnost

5 Sloučeniny podle předloženého vynálezu jsou průmyslově vyrobitelné a použitelné pro léčení mnoha onemocnění centrální nervové soustavy, jako jsou například následující:

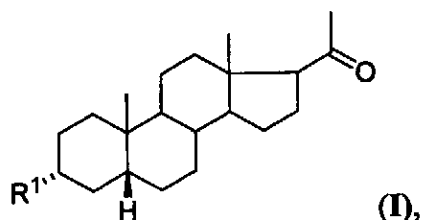
- 1) hypoxické a ischemické poškození CNS, mrtvice a další patologické změny z působené hyperexcitací;
- 10 2) neurodegenerativní změny a poruchy;
- 3) afektivní poruchy, deprese, post-traumatická stresová porucha a nemoci související se stresem;
- 15 4) schizofrenie a další psychotické poruchy;
- 5) bolest, hyperalgezie, poruchy ve vnímání bolesti;
- 6) závislosti;
- 20 7) roztroušená skleróza a další autoimunitní onemocnění;
- 8) epilepsie a jiné poruchy projevující se křečemi a
- 25 9) hyperplazické změny na centrální nervové soustavě, tumory v centrální nervové soustavě včetně gliomů

Seznam použité literatury

- 30 1. Cais O., Sedláček M., Horák J., Dittert I., Vyklický ml. L. Temperature dependence of NR1/NR2B NMDA receptor channels. *Neuroscience* 2008, 151(2), 428 až 438.
2. Lindstedt G., Lindstedt S.; Studie on biosynthesis of carnitine. *J. Biol. Chem.* 1965, 240(1), 316 až 321.
- 35 3. Morrow AL.; Recent developments in the significance and therapeutic relevance of neuroactive steroid—Introduction to the special issue. *Pharmacol. Ther.* 2007, 116(1), 1 až 6.
4. Petrović M., Sedláček M., Horák M., Chodounská H., Vyklický L. Jr.; 20-oxo-5beta-pregnan-3alpha-yl is a use-dependent NMDA receptor inhibitor. *J. Neurosci.* 2005, 25(37), 8439 až 50.
- 40 6. Villmann C., Becker CM.; On the hype and falls in neuroprotection: targeting the NMDA receptor. *Neuroscientist.* 2007, 13(6), 594 až 615.
- 45 7. Wang M., Wahlströmb G., Bäckströma T.; The regional brain distribution of the neurosteroids pregnenolone and pregnenolone sulfate following intravenous infusion. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology.* 1997, 62 (4), 299 až 306.
- 50 8. Weaver CE., Land MB., Purdy RH., Ruchards KG., Gibbs TT., Farb DH.; *J. Pharm. Exp. Ther.* 293 (2000), 747.

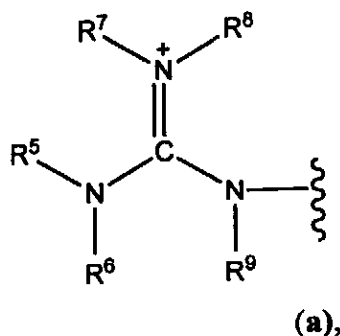
PATENTOVÉ NÁROKY

- 5 1. Deriváty pregnanolonu, substituované v poloze 3alfa kationickou skupinou, obecného vzorce I



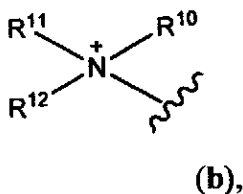
10 v němž

R^1 znamená skupinu obecného vzorce $R^3-R^2-C(R^{13})-R^4$, kde R^2 znamená $(CH_m)_n$, kde m je 0 až 2, n je 1 až 18 tvořený přímým nebo větveným uhlíkovým řetězcem, který může být dále substituován primární nebo sekundární amino skupinou, která může být buď volná, nebo, v případě primární aminoskupiny, chráněná odstranitelnou chránicí skupinou, zvolenou z tert-butyloxykarbonylu, tritylu, benzyloxykarbonylu, 9-fluorenylmethoxykarbonylu či p-nitrobenzyloxykarbonylu, R^3 znamená kationickou skupinu zvolenou z guanidylové skupiny obecného vzorce a,



20

popřípadě amoniové skupiny obecného vzorce b



25 přičemž R^5 až R^{12} znamenají vodíkové atomy nebo alkylové či alkenylové skupiny s 1 až 18 atomy uhlíku, které tvoří přímý nebo větvený řetězec,

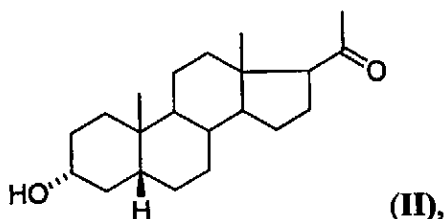
R^{13} je atom kyslíku, a

30

R^4 je atom kyslíku.

2. Způsob výroby derivátů pregnanolonu, substituovaných v poloze 3alfa kationickou skupinou, obecného vzorce I podle nároku 1, kde R^1 má stejný význam jako v nároku 1, přičemž substituent R^3 je guanidylová skupina vzorce a, R^4 znamená atom kyslíku, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že se reakční směs, obsahující 3alfa-hydroxy-5beta-pregnan-20-on vzorce II

35



arginin chráněný vhodnými chránicími skupinami a dimethylaminopyridín, se rozpustí ve vhodném bezvodém rozpouštědle pod inertní atmosférou, reakční směs se pak ochladí v ledové lázni a za míchání se po kapkách přidává kondenzační činidlo, jímž je dicyklohexylkarbodiimid nebo 1-(3-dimethylamino-propyl)-3-ethylkarbodiimid, rozpuštěné ve vhodném rozpouštědle; za chránění proti přístupu vzdušné vlhkosti se reakční směs míchá 10 až 48 h při teplotě v rozmezí 0 až 50 °C, poté se nalije do nasyceného vodného roztoku hydrogenuhličitanu sodného nebo draselného a produkt se extrahuje organickým rozpouštědlem, ve kterém je dobře rozpustný, následně se spojené organické fáze promývají nasyceným roztokem chloridu sodného do odstranění přítomného hydrogenuhličitanu, extrakt se vysuší a rozpouštědlo se odpaří; surový materiál se přelije minimálním množstvím acetonu a vysrážená močovina se odfiltruje k získání sloučeniny obecného vzorce I, která se může dále podrobit přečištění, přičemž případná chránicí skupina argininové struktury se odstraní tak, že se získaná sloučenina rozpustí ve směsi karboxylové kyseliny a alkoholu, k tomuto roztoku se přidá hydrogenační katalyzátor, s výhodou Pd/C nebo platinová černá a po hydrogenaci se katalyzátor odfiltruje a rozpouštědlo se odpaří.

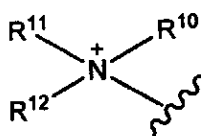
3. Způsob výroby podle nároku 2, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že vhodné chránicí skupiny se zvolí z tosylové, 2,2,5,7,8-pentamethylchroman-6-sulfonylové, 2,2,4,6,7-pentamethyl-2,3-dihydrobenzofuran-5-sulfonylové, mesityl-2-sulfonylové, 4-methoxy-2,3,6-trimethylfenyl-sulfonylové, 1,2-dimethylindol-3-sulfonylové, ω,ω' -bis-tert-butylloxykarbonylové, ω -nitro, trifluoroacetylové, ω,ω' -bis-benzyloxykarbonylové či z ω,ω' -bis-allyloxykarbonylové skupiny a jako vhodné rozpouštědlo se použije chloroform, dichlormethan, benzen, toluen nebo acetonitril.

4. Způsob výroby podle nároku 2 nebo 3, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že reakční směs se míchá 10 až 12 hodin, přičemž organickým rozpouštědlem je s výhodou ethylacetát, k přečištění produktu se použije krystalizace nebo chromatografie na sloupci silikagelu a k rozpuštění produktu v případě odstraňování chránicí skupiny se použije s výhodou směs kyseliny octové s methanolem, přičemž doba hydrogenace se s výhodou zvolí jako 72 hodin.

5. Způsob výroby podle nároků 2, 3 nebo 4, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že chránicí skupina argininové struktury sloučeniny obecného vzorce I, již je benzyloxykarbonylová nebo 2,2,4,6,7-pentamethyl-2,3-dihydrobenzofuran-5-sulfonylová skupina, se odstraní působením trifluorocetové kyseliny na chráněný derivát, přičemž se reakční směs nechá reagovat 16 až 72 hodin při teplotě mezi 0 a 50 °C, pak se směs nalije do nasyceného vodného roztoku hydrogenuhličitanu zvoleného z NaHCO_3 nebo KHCO_3 , produkt se extrahuje organickým rozpouštědlem, ve kterém je dobře rozpustný, zvoleným ze skupiny, zahrnující chloroform, dichlormethan a dichlorethan, spojené organické fáze se promyjí 5% obj./obj. vodným roztokem kyseliny chlorovodíkové, extrakt se vysuší sušicím činidlem a rozpouštědlo se odpaří, načež se surový materiál případně čistí, například krystalizací, která poskytne dihydrochlorid sloučeniny obecného vzorce I.

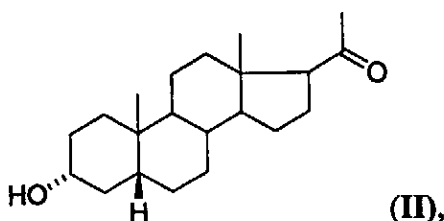
6. Způsob výroby podle nároku 5, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že reakční směs se ponechá reagovat při teplotě místnosti, přičemž použitým hydrogenuhličitanem je s výhodou NaHCO_3 a jako sušicí činidlo se použije síran hořečnatý nebo síran sodný a rozpouštědlo se výhodně odpaří destilací pod vakuem.

7. Způsob výroby sloučeniny obecného vzorce I podle nároku 1, kde R^1 má stejný význam jako bylo uvedeno výše, přičemž substituent R^3 je kvartérní amoniová sůl vzorce b



(b),

s různou délkou řetězců spojujících amoniovou skupinu s karboxylem, tvořícím esterovou vazbu se sloučeninou obecného vzorce II jak je popsána v nároku 2, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že vhodná sůl kvartérní ω -aminokarboxylové kyseliny se suspenduje v bezvodém dichlormethanu pod inertní atmosférou, do reakční směsi o teplotě -50 až $+20$ °C se přidá vhodné chlorační činidlo, zvolené ze skupiny, zahrnující thionylchlorid, oxychlorid fosforečný a dichlorid kyseliny šťavelové, přičemž reakci lze usnadnit vhodným katalyzátorem, potom se reakční směs míchá 8 až 72 hodin do rozpuštění všech pevných součástí, následně se těkavé složky směsi odpaří ve vakuu, surový produkt se rozpustí ve směsi bezvodého nitromethanu a pyridinu pod inertní atmosférou, pak se přidá sloučenina II



(II),

a směs se poté míchá 2 až 24 h až do ukončení reakce přidáním vody, následně se směs okyslí na pH 4,0 5% obj./obj. vodným roztokem kyseliny chlorovodíkové, organické podíly se extrahují do chloroformu, který se promyje nasyceným roztokem chloridu sodného, získaný roztok se vysuší sušicím činidlem, rozpouštědlo odpaří a nezreagovaný výchozí materiál se pak odstraní promytím benzenem a produkt se dále, pokud je to vhodné, čistí například krystalizací ze směsi vhodných rozpouštědel, která poskytne sloučeninu vzorce I, kde R^3 odpovídá obecnému vzorci b.

8. Způsob výroby podle nároku 7, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že teplota reakční směsi je s výhodou 0 °C, přičemž jako chlorační činidlo se s výhodou použije dichlorid kyseliny šťavelové a jako katalyzátor dimethylformamid, míchání reakční směsi se provádí nejprve 16 hodin, po přidání sloučeniny vzorce II pak 4 hodiny, přičemž jako sušící činidlo se použije síran hořečnatý nebo sodný, rozpouštědlo se odpaří destilací pod vakuem a přečištění produktu krystalizací se provádí ve směsi chloroformu a n-heptanu.

9. Deriváty pregnanolonu, substituované v poloze 3alfa kationickou skupinou, obecného vzorce I podle nároku 1, pro použití, při léčení neuropsychiatrických poruch souvisejících s nerovnováhami glutamátergního neuropřenašecového systému, jako jsou ischemické poškození centrální nervové soustavy, neurodegenerativní změny a poruchy centrální nervové soustavy, afektivní poruchy, deprese, post-traumatická stresová porucha a nemoci související se stresem, anxiety, schizofrenie a psychotické poruchy, bolest, závislosti, roztroušená skleróza, epilepsie, gliomy.

10. Použití derivátů pregnanolonu, substituovaných v poloze 3alfa kationickou skupinou, obecného vzorce I popsaného v nároku 1, pro výrobu veterinárního a/nebo humánního farmaceutického přípravku pro léčení neuropsychiatrických poruch souvisejících s dysbalancemi glutamátergního neuropřenašecového systému, jako jsou ischemické poškození centrální nervové soustavy, neurodegenerativní změny a poruchy centrální nervové soustavy, afektivní poruchy, deprese,

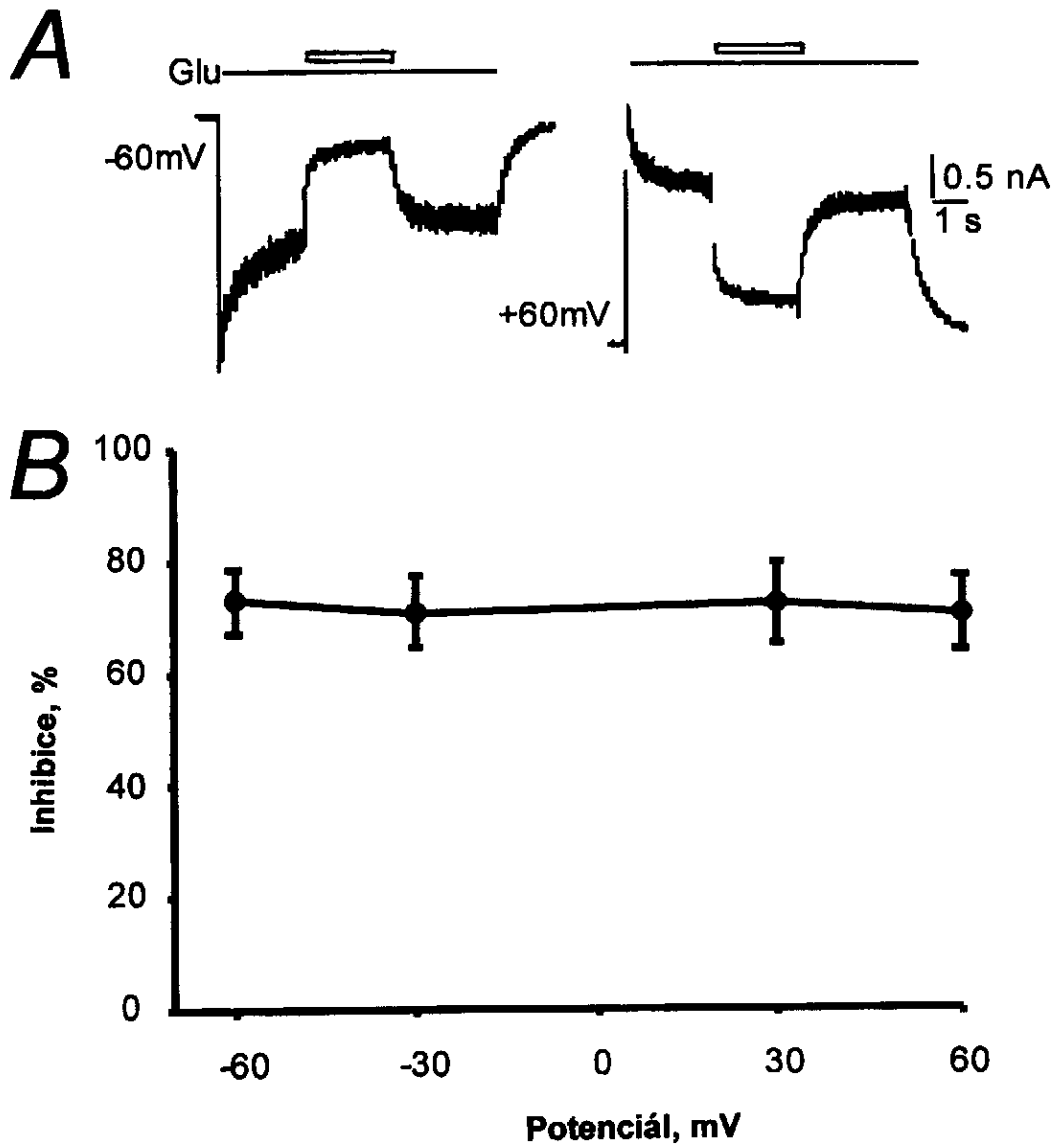
post-traumatická stresová porucha a nemoci související se stresem, anxieta, schizofrenie a psychotické poruchy, bolest, závislosti, roztroušená skleróza, epilepsie, gliomy.

5 **11.** Farmaceutický prostředek, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že obsahuje jako aktivní složku deriváty pregnanolonu, substituované v poloze 3alfa kationickou skupinou, obecného vzorce I popsaného v nároku 1.

10 **12.** Použití derivátů pregnanolonu, substituovaných v poloze 3alfa kationickou skupinou, obecného vzorce I popsaného v nároku 1, pro výrobu standardů neuroprotektiv a neuroleptik, případně analytických standardů používaných v experimentálním výzkumu a v analytické chemii či jako sloučenin obsažených v potravinových doplňcích či kosmetických přípravcích určených pro zlepšování reakcí jednotlivých částí organismu na zvýšený stres zejména oxidativní, nutriční a způsobený volnými radikály, případně na stárnutí.

15

I výkres



Obr. 1

Konec dokumentu
