

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKAÚŘAD
PRŮMYSLVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: 2016-342
 (22) Přihlášeno: 07.06.2016
 (40) Zveřejněno: 20.12.2017
 (Věstník č. 51/2017)
 (47) Uděleno: 11.07.2018
 (24) Oznámení o udělení ve věstníku: 22.08.2018
 (Věstník č. 34/2018)

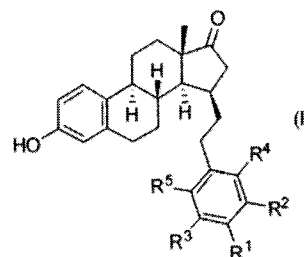
C07J 1/00 (2006.01)
 A61K 31/566 (2006.01)
 A61P 35/00 (2006.01)
 A61P 5/30 (2006.01)
 A61P 17/10 (2006.01)
 A61P 17/14 (2006.01)
 A61P 15/18 (2006.01)
 A61P 15/08 (2006.01)
 A61P 15/00 (2006.01)
 A61P 5/24 (2006.01)

- (56) Relevantní dokumenty:
 KIRSCHNING, Andreas, a kol. Homo-and heterogeneous Ru-based metathesis catalysts in cross-metathesis of 15-allylestrone—towards 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 inhibitors. Tetrahedron Letters, 2008, 49, 3019-3022.; MÖLLER, Gabriele, a kol. Species used for drug testing reveal different inhibition susceptibility for 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1. PLoS One, 2010, 5, e10969..
 WO 2012129673 A1; WO 2005048956 A2.

- (73) Majitel patentu:
 Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, v.v.i.,
 Praha 6, CZ
 Ústav molekulární genetiky AV ČR, v. v. i., Praha
 4, CZ
 Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc, CZ
 Helmholtz Zentrum München GmbH., Neuherberg,
 DE

substituenty R¹ až R⁵ mono-, di-, tri-, tetra- i penta-
 substituované. Sloučeniny podle vynálezu mohou být
 využity k diagnostice a případně i k léčbě estrogen-
 dependentních onemocnění.

- (72) Původce:
 prof. RNDr. Martin Katora, CSc., Praha 5 -
 Radotín, CZ
 Ing. Eva Prchalová, Praha 9, CZ
 prof. Dr. Jerzy Adamski, Mnichov, DE
 Dr. Gabriele Möller, Mnichov, DE
 Dr. Ondřej Štěpánek, Liberec, CZ
 Dr. Petr Bartůňek, Ph.D., Praha 1, CZ
 Dr. David Sedlák, Ph.D., Praha 7, CZ
 doc. MUDr. Marián Hajdúch, Ph.D., Moravský
 Beroun, CZ
 MUDr. Petr Džubák, Ph.D., Brodek u Přerova, CZ



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

- (54) Název vynálezu:
**15 β -substituované deriváty estronu jako
 selektivní inhibitory 17 β -
 hydroxysteroidehydrogenáz**

- (57) Anotace:
 15 β -substituované deriváty estronu obecného vzorce
 I, kde substituenty R¹, R², R³, R⁴, R⁵ jsou nezávisle
 na sobě zvoleny ze skupiny zahrnující: C₁-C₄ alkyl,
 C₁-C₄ alkoxy, C₁-C₄ halogenalkyl, halogen, COOR⁶,
 kde R⁶ je C₁-C₄ alkyl; H, OH; popřípadě jsou R³, R⁴ a
 R⁵ každý tvořen vodíkovým atomem a současně R¹ a
 R² spolu tvoří aryl, výhodně naftyl; přičemž
 aromatický kruh v poloze C-15 může být uvedenými

15 β -substituované deriváty estronu jako selektivní inhibitory 17 β -hydroxysteroid-dehydrogenáz

5 Oblast techniky

Předkládaný vynález se týká přípravy a využití nových ligandů, selektivně inhibujících skupinu enzymů 17 β -hydroxysteroiddehydrogenáz (17PHSD). Sloučeniny, které selektivně regulují aktivitu 17 β HSD, mohou být účinnou složkou farmaceutických prostředků, a to zejména prostředků využitelných pro diagnostiku a léčbu estrogen-dependentních typů onemocnění.

Dosavadní stav techniky

15 Enzymy HSD patří do skupiny NADP(H)/NAD(H) dependentních oxidoreduktáz, které v těle regulují konverzi ketosteroidů na hydroxysteroidy a *vice versa* v procesu zvaném steroidogeneze. 17 β HSD umožňují tento oxidačně-redukční proces v pozici C-17 steroidního skeletu. Redukcí C-17-oxo skupiny steroidů tak z biologicky ne příliš aktivního estronu (E1) vzniká vysoce
20 potentní 17 β -estradiol (E2), stejně tak z 4-androsten-3,17-dionu testosteron (T) a z 5 α -androstan-3,17-dionu dihydrotestosteron. Uvedené 17 β -hydroxy formy, na rozdíl od 17 β -ketosteroidů, disponují vysokou afinitou k příslušným receptorům, a tím zásadně ovlivňují četné pochody v těle, především však proliferaci a diferenciaci buněk. 17 β HSD tedy mají klíčovou roli při tvorbě biologicky aktivních estrogenů a androgenů a specifická regulace těchto enzymů by mohla otevřít dveře k novým skupinám terapeutických a diagnostických látek (Poirier, D.
25 *Current. Med. Chem.* **2003**, *10*, 453).

V současné době je v literatuře popsáno již 15 izoenzymů rodiny 17 β -HSD, přičemž jednotlivé typy se navzájem podstatně liší tkáňovou, substrátovou a kofaktorovou specifitou, ale i distribucí v buňkách.

30 Nadměrná exprese některých izoenzymů z řady 17 β HSD, a tedy nadměrná produkce 17 β -hydroxysteroidů v tkáních, koreluje s výskytem estrogen/androgen-dependentních onemocnění. Selektivní inhibitory jednotlivých izoenzymů by s výhodou mohly být použity pro terapii takových chorob a stanovení míry exprese příslušných typů HSD v postižených tkáních by pak
35 mohlo sloužit jako diagnostický marker zmíněných nemocí. To je důvodem značné pozornosti, jež je v posledních desetiletích věnována výzkumu 17 β HSD.

Předkládaná přihláška vynálezu se týká inhibitorů izoenzymů 17 β HSD1 a 17 β HSD5. Tyto izoenzymy se podílejí na produkci estrogenů a androgenů v lidském těle. Ovlivňují progresi
40 četných hormonálně senzitivních onemocnění, zejména rakoviny prsu, prostaty, nemalobuněčného karcinomu plic (NSCLC), spinocelulárního karcinomu a dalších. Zvýšená hladina E2 vede k výskytu benigních anomálií, zejména endometriózy, adenomyózy, děložních myomů a poruch menstruačního cyklu. Hledání látek, které by byly schopny ovlivnit průběh takových nemocí, je stále věnováno značné úsilí. Důvodem jsou buď dosavadní absence vhodné
45 terapeutické látky, nebo nevýhody stávajících terapeutických možností, využívaných při léčbě hormonálně senzitivních chorob. Jedná se především o nežádoucí účinky, vznik rezistence při dlouhodobém podávání a v neposlední řadě o častý relaps onemocnění.

17 β HSD1 byl jako první ze všech izoenzymů popsán Englem *et al.* v 50. letech 20. století
50 (Ryan, K.J.; Engel, L.L. *Endocrinology* **1953**, *52*, 287). 17 β HSD1 přednostně reguluje redukci estronu (E1) na estradiol (E2) a je přirozeně exprimován zejména v placentě, vaječnících, prsní tkáni, děloze a endometriu. Ve vaječnících katalyzuje produkci E2 z E1, v periferních tkáních pak kontroluje hladinu a dostupnost E2 na pre-receptorové úrovni (intrakrinní modulace). V

menší míře 17 β HSD1 katalyzuje také konverzi dehydroepiandrosteronu (DHEA) na 5-androsten-3 β ,17 β -diol (Δ^5 -diol).

Význam pohlavního hormonu E2 v lidském těle spočívá v jeho silné afinitě k estrogenovým receptorům (ER), jejichž prostřednictvím reguluje expresi řady genů (tzv. transkripční faktor). ER se v klidovém stavu nacházejí obvykle v cytosolu v podobě monomerů. Po vazbě E2 na ER jednotky receptorů dimerují, vstupují do buněčného jádra a tam se váží na sekvence DNA označované jako estrogen responzivní jednotky (ERE). Po vazbě komplexu E2-2ER na ERE se aktivuje kaskáda procesů, vedoucí k proliferaci a diferenciaci buněk. Toto množení buněk může být jak fyziologické, tak i patologické, vedoucí ke zhoubnému bujení (Ciocca, D.R.; Fanelli, M.A. *Trends Endocrinol Metab.* **1997**, 8, 313).

Z výše uvedených skutečností vyplývá, že proliferaci a diferenciaci buněk, způsobenou estrogeny, lze regulovat ovlivněním metabolismu E2. Jednou z možností je zamezení vazby E2 do aktivního místa ER, další možností je blokáce syntézy samotného E2 inhibicí jednoho či několika enzymů, účastnících se steroidogeneze (17 β HSD1, aromatazy, sulfatázy) (Hong, Y.; Chen, S. *Mol. Cell. Endocrinol.* **2011**, 340, 120).

Estrogen senzitivní typy nádorů prsu, ženského pohlavního ústrojí a plic (tzv. non-small-cell lung carcinoma, NSCLC) jsou charakteristické zvýšenou expresí 17 β HSD1. Se zvýšenou hladinou E2 je pak spojena řada benigních anomálií. Mezi nejběžnější z nich patří endometrióza (patologická lokalizace děložní výstelky jinde než v dutině děložní), adenomyóza (přesun výstelky děložní dutiny-endometria do vrstvy děložní svaloviny), menoragie (abnormálně silné menstruační krvácení), metroragie (acyklické, dysfunkční krvácení), dysmenorea (bolesti a jiné obtíže provázející menstruaci) a děložní myomy (WO 2008034796 A2).

17 β HSD5 je exprimována především ve varlatech, běžně se vyskytuje též v prostatě, játrech a nadledvinkách. Zvýšenou expresí vykazují některé typy tumorů prsní tkáně a prostaty (Dufort *et al. Endocrinology.* **1999**, 140, 568). Mezi ostatními izoenzymy zaujímá 17 β HSD5 poněkud zvláštní postavení. Jako jediný z rodiny 17 β HSD enzymů patří mezi tzv. aldo-ketoreduktázy, zatímco ostatní typy patří mezi dehydrogenázy/reduktázy typu "krátký řetězec". Navíc díky značně prostornému vazebnému místu vykazuje jistou substrátovou multispecifitu. To znamená, že sice přednostně redukuje 4-androsten-3,17-dion na T, dokáže však vázat i některé další estrogeny a androgeny a ovlivňovat jejich konverzi v polohách 3 α -, 17 β - a 20 α -. 17 β HSD5 se také podílí na syntéze prostaglandinů (prostaglandin PGF_{2 α}). Bylo prokázáno, že PGF_{2 α} hraje důležitou roli při růstu některých typů nádorů, zejména kolorektálního karcinomu (Qualtrough, D. *Int. J. Cancer* **2007**, 121, 734). Vzhledem k tomu, že byl prokázán vliv 17 β HSD5 na progresi jak steroid-senzitivních, tak i nesenzitivních karcinomů, je selektivní inhibice 17 β HSD5 dlouhodobě jednou z výzev pro další výzkum.

Nejčastějším nádorovým onemocněním u žen je rakovina prsu. Standardní postup léčby raných stádií estrogen pozitivních typů rakoviny prsu spočívá v operaci a následné adjuvantní chemoterapii. V rámci následné terapie se nejčastěji u premenopauzálních žen podávají selektivní modulátory estrogenových receptorů (SERM) jako Tamoxifen, Raloxifen a další. Jedná se o částečné nebo úplné antagonisty ER. U žen po menopauze, jejichž nádor má ER+ status, zůstává Tamoxifen léčivem první volby. V případě ER- tumorů prsu pak bývají vhodnou volbou terapie tzv. SEEM (Selective Estrogen Enzyme Modulators), např. Tibolon či Anastrozol. Tyto látky selektivně ovlivňují příslušné enzymy steroidogeneze, aromatazu, sulfatazu a sulfotransferázu. Nevýhodou dlouhodobé léčby SERM i SEEM je častý výskyt závažných nežádoucích účinků. V případě SERM se jedná o vaginální krvácení, endometriální karcinom, nutnost hysterektomie, ischemické cerebrovaskulární příhody a venózní tromboembolie (Demissie *et al. J. Clin. Oncol.* **2001**, 19, 322). Po aplikaci SEEM jsou pozorovány zvýšená lámavost kostí, zácpa/průjem, nevolnost a zvracení, poruchy spánku, únava/slabost, návaly a pocení, krvácení z pochvy, řídnutí vlasů, změny hmotnosti, deprese a další (Eastell *et al. J. Clin. Oncol.* **2008**, 26, 1051). Podstatná

část tumorů prsní tkáň vykazuje zvýšenou expresi 17 β HSD1. Předpokládá se, že modulací činnosti 17PHSD1 by bylo možné ovlivnit lokální hladinu E2 v postižené tkáni a docílit tak regulace růstu nádorové tkáň. Žádný 17 β HSD1 inhibitor prozatím neprošel klinickými

5

Léčba rakoviny prostaty je založena na snížení hladiny androgenů. Toho lze dosáhnout chirurgickou nebo farmakologickou (hormonální) kastrací, případně jejich vhodnou kombinací. Hormonální léčba spočívá buď v zastavení produkce testosteronu varlaty (LHRH–analoga gonadotropinů), nebo v blokaci androgenního receptoru v prostatické buňce antiandrogeny (např. cypoteron acetát). I u antiandrogenní terapie jsou nežádoucí účinky značné, zahrnují především impotenci, návaly horkosti, gynekomastii, mastodynii, dále zažívací obtíže, depresi, únavu, malátnost a další. Také podstatná část tumorů prostaty vykazuje zvýšenou expresi 17 β HSD5. Předpokládá se, že modulací činnosti 17 β HSD5 by bylo možné ovlivnit lokální hladinu T v postižené tkáni a docílit tak regulace růstu nádorové tkáň.

15

V literatuře je popsána celá řada inhibitorů 17 β HSD. Značný důraz je přitom kladen na přípravu selektivních, reverzibilních inhibitorů 17 β HSD1 s minimálním nebo žádným estrogenním efektem. Přestože výzkum v této oblasti je velmi intenzivní a zahrnuje nespočet *in vitro* a *in vivo* studií, doposud se žádný selektivní inhibitor 17 β HSD1 nedostal do klinické fáze testování jako potenciální terapeutikum na léčbu estrogen–dependentních typů onemocnění (Poirier, D. *Expert Opin. Ther. Patents* **2010**, 20, 1123).

20

Inhibitory 17 β HSD1 a 17 β HSD5 lze ze strukturního hlediska rozdělit do dvou velkých skupin, a to na inhibitory nesteroidní povahy a inhibitory na bázi steroidů. Vzhledem k tomu, že předkládaná přihláška vynálezu popisuje inhibitory, jež jsou deriváty estronu, bude dále diskutována pouze skupina steroidních inhibitorů 17 β HSD1 a 17 β HSD5. Na téma 17 β HSD inhibitorů bylo publikováno několik souhrnných článků (Penning, T.M.; Ricigliano, J.W. *J. Enzyme. Inhib.* **1991**, 5, 165; Poirier, D. *Curr. Med. Chem.* **2003**, 10, 453; Brožič *et al.* *Curr. Med. Chem.* **2008**, 15, 137; Poirier, D. *Anti–cancer Agents Med. Chem.* **2009**, 9, 642; Day *et al.* *Minerva Endocrinol.* **2010**, 35, 87).

25

30

Následující přehled bude zaměřen na vývoj v oblasti inhibitorů 17 β HSD1 především od roku 1990 do současnosti. Inhibiční aktivita vůči 17 β HSD1 byla testována u derivátů progestinu, např. nomegestrol acetátu, medrogestonu, tibolonu a jejich metabolitů, za použití rakovinných linií MCF–7 a T–47D (estrogen–dependentní typy rakoviny prsu) při fyziologické hladině E1. Inhibitory nebyly selektivní vůči 17 β HSD1 (např. Chetrite *et al.* *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* **1996**, 58, 525; Chetrite, G.S.; Pasqualini, J.R. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* **2001**, 76, 95; Shields–Botella *et al.* *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2005**, 93, 1). Testován byl i účinek Dydrogesteronu (Duphaston®) a jeho 20–dihydro metabolitů vzhledem ke konverzi E1 na E2. (Chetrite, G.S. *et al.* *Anticancer Res.* **2004**, 24, 1433).

35

40

Série sedmnácti estratrienů fluorovaných v poloze C–17 byla připravena Delucou *et al.* a byla testována vzhledem k inhibiční aktivitě vůči pěti izoformám 17 β PHSD (1, 2, 4, 5, 7). Látky vykazovaly průměrnou inhibiční aktivitu vůči 17 β HSD1 a mizivou selektivitu vůči ostatním testovaným izoformám. Studium estrogenního potenciálu látek nebylo předmětem této studie (Deluca *et al.* *Mol. Cell. Endocrinol.* **2006**, 248, 218).

45

Série různě substituovaných látek na bázi E2 s inhibiční aktivitou vůči 17 β HSD1 (testovány i izoformy 2 a 3) byla připravena ve skupině D. Poiriera. Inhibitor, nesoucí na uhlíku C–6 butyl(methyl)thiaheptanamidový substituent, vykázal 40% inhibiční aktivitu při koncentraci 0,1 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ (Poirier *et al.* *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **1998**, 64, 83). Následně byly připraveny i tzv. duální inhibitory, nesoucí současně dva farmakofory v pozici C–16. Nejlepší z připravených derivátů vykazoval i antiestrogenní účinky (Pelletier *et al.* *Steroids* **1994**, 59, 536; Tremblay, M.R.; Poirier, D. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I* **1996**, 2765).

50

Připraveny byly i hybridní inhibitory se steroidním skeletem, mající na uhlíku C-16 postranní řetězec různé délky nesoucí adenosin. Nejlepší látka EM-1745 je vynikajícím kompetitivním, reverzibilním inhibitorem (Qiu *et al. FASEB J.* **2002**, *16*, 1829; Poirier *et al. Synt. Commun.* **2003**, *33*, 3183). V roce 2005 byly popsány nové série selektivních hybridních inhibitorů 17βHSD1 (testován ještě izoenzym 17βHSD2). Jednalo se o deriváty E1 (nebo 2-ethyl-E1), nesoucích v poloze C-16 skupinu -CH₂CONHR. Nejlepší z připravených látek vykazovaly koncentraci látky nutnou k 50% inhibici, tj. IC₅₀, v rozmezí 27 až 37 nmol·l⁻¹ při koncentraci E1 = 2 nmol·l⁻¹ (Lawrence *et al. J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 2759). Souběžně byly vyvíjeny i inhibitory s C-16α-bromalkylovou a C-16β-bromalkylovou skupinou. Látky sice byly potentními inhibitory 17βHSD1, byly však estrogenní. Estrogenicitu se podařilo později odstranit modifikací steroidního skeletu v pozici C-7, tato modifikace ovšem vedla ke zhoršení inhibiční aktivity (Tremblay, M.R.; Poirier, D. J. *Steroid Biochem. Mol. Biol.* **1998**, *66*, 179; Blomquist *et al. Endocrinol.* **1997**, *153*, 453; Tremblay *et al. Steroids* **2001**, *66*, 821). Dalšími modifikacemi C-16 postranního řetězce steroidního skeletu bylo připraveno velké množství látek typu enonů, enolů, fenolů, sulfamátů a nasycených alkoholů. Zlepšení inhibiční aktivity vůči 17βHSD1 však nebylo dosaženo (Ciobanu, L.C.; Poirier, D. *Chem. Med. Chem.* **2006**, *1*, 1249).

Studována byla také E1/E2 derivatizace v polohách C-7, C-16, C-17. Připraveny byly deriváty E1 s pyrazolovým, nebo isoxazolovým kruhem, jehož součástí byla C-C vazba mezi uhlíky C-16 a 17 (Sweet *et al. Biochem. Biophys. Res. Comm.* **1991**, *180*, 1057); testovány byly také série derivátů E1/E2 nesoucích substituovaný pyrazolový kruh, jehož součástí byla C-C vazba mezi uhlíky C-16 a 17. Hodnoty IC₅₀ derivátů E1-C16-methylkarboxamidů se pohybovaly v rozmezí od desítek nmol·l⁻¹ (Allan *et al. J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 1325). U skupiny N- a C-substituovaných 1,3,5(10)-estratrien-[17,16-c]-pyrazolových derivátů byla inhibiční aktivita horší, pohybovala se ve stovkách nmol·l⁻¹. N-substituce pyrazolového kruhu však potlačuje estrogenicitu těchto derivátů. Později připravené deriváty měly řádově lepší hodnoty IC₅₀ stanovené na T-47D buňkách (WO2004085457; Vicker *et al. Chem. Med. Chem.* **2006**, *1*, 464). Souhrnně je E1/E2 derivatizace v polohách C-7, C-16, C-17 a biologická aktivita nejslibnějších inhibitorů diskutována v práci (Purohit *et al. Mol. Cell. Endocrinol.* **2006**, *248*, 199).

Testována byla také E1/E2 derivatizace v polohách C-3, C-16, C-17. Nejlepším z testovaných inhibitorů 17βHSD1 byl 16β-m-carbamoylbenzyl-E2 (E2B), schopný redukovat proliferaci indukovanou fyziologickou hladinou E1 v T-47D ER+ buňkách o 62 %. Růst buněk nebyl zastaven ze 100 %, protože látka sama vykazovala slabou estrogenicitu (Laplanche *et al. Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 1849). Proto byl připraven její 16β,17β-γ-lakton. Látka nebyla estrogenní, ale její inhibiční aktivita vůči 17βHSD1 signifikantně klesla. Derivát E2B, který namísto 3-OH skupiny nesl bromethylový řetězec, prokázal, že pro úspěšnou inhibici 17βHSD1 není nezbytná přítomnost 3-OH skupiny na kruhu A steroidního skeletu. Tato látka není estrogenní, je kompetitivním irreverzibilním, selektivním inhibitorem a byla testována *in vivo* na myším xenograft modelu s buňkami T-47D. Bylo prokázáno, že při dávce 250 μg/den/myš se nádor po 32 dnech zmenšil o 74 % (WO2012129673, Ayan *et al. Mol. Cancer. Ther.* **2012**, *11*, 2096; Maltais *et al. J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 204).

Messinger *et al.* připravili rozsáhlou sérii C-15α/β-E1 derivátů, z nichž některé měly v poloze C-3 hydroxylovou skupinu, některé její methylether, a vykazovaly vynikající inhibiční aktivitu. Selektivita ani estrogenita nebyla diskutována (Messinger *et al. Mol. Cell. Endocrinol.* **2009**, *301*, 216; WO 2005047303, US 20050192263). Stejní autoři patentovali také 17-difluorestratrieny substituované v poloze C-15 řetězcem, nesoucím ve většině případů amidickou funkční skupinu (WO 2006125800, US 20060281710). Opět se jedná o početnou skupinu látek s vysokou inhibiční aktivitou, většinou dostatečně selektivních vůči 17βHSD1 (WO 2008065100). Autoři popsali metodu měření estrogenicity, nicméně estrogenita není v dokumentu kvantifikována. Série estratrienů, substituovaných v poloze C-15 deriváty triazolu, je popsána v WO 2008034796 a US 20080146531. Jedná se o velice početnou skupinu látek s vynikající

inhibiční aktivitou kolem 90 % při koncentraci $1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Vybrané deriváty jsou selektivní inhibitory $17\beta\text{HSD1}$ (testovány ještě izoenzymy $17\beta\text{HSD2}$ a 3). Estratrieny substituované v poloze C-15 deriváty triazolu, se steroidním skeletem modifikovaným v polohách C-2, 3, 4, 15 a 17, představují selektivní inhibitory $17\beta\text{HSD1}$ (WO 2014207311, WO 2014207309, WO 2014207310).

Mezi inhibitory $17\beta\text{HSD1}$ patří také C-2-D-homo-E1 deriváty; nejaktivnějším je 2-fenethyl-D-homo-E1 s $\text{IC}_{50} = 15 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ (Möller *et al. Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, 19, 6740; WO 2006003012).

Nové 2-substituované estra-1,3,5(10)-trien-17-ony jsou popsány v patentu US 7419972 (WO 2006003013). Jejich inhibiční aktivita vzhledem k $17\beta\text{HSD1}$ je charakterizována hodnotami IC_{50} , které se pohybují v rozmezí desítek až sta $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$.

Pokud je nám známo, až do současnosti jsou C-15 deriváty estronu jako inhibitory $17\beta\text{HSD1}$ předmětem pouze několika výše uvedených patentů Solvay Pharmaceuticals (J. Messinger) a Forendo Pharma LTD (L. Hirvela) a jedné publikace (Messinger *et al. Mol. Cell. Endocrinol.* **2009**, 301, 216–224).

Ve všech uvedených případech se jedná o strukturně velmi podobné látky, které se však od námi předkládaných derivátů podstatně liší. Nyní předkládané deriváty vykazují výhodnější a komplexnější soubor biologických vlastností.

Inhibitory $17\beta\text{HSD5}$

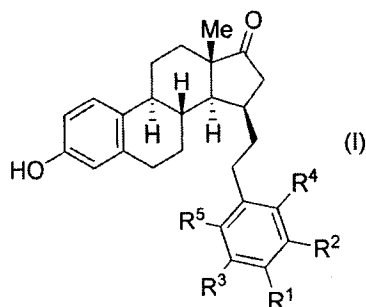
Připraveny byly C-3,17 a 18-oxiranové steroidní deriváty, ovšem jejich inhibiční aktivita ani selektivita prozatím nebyla publikována (Penning *et al. Molec. Cell. Endocr.* **2001**, 171, 137). Selektivní inhibice $17\beta\text{HSD5}$ byla popsána u derivátu J2404 (Deluca *et al. Mol. Cell. Endocrinol.* **2006**, 248, 218). Z testované série spirolaktonů byl nejlepším kompetitivním a selektivním inhibitorem derivát EM 1404 (3-carboxamido-1,3,5-(10)-estratrien-17(R)-spiro-2-(5,5-dimethyl-6-oxo)tetrahydro-pyran) s $\text{IC}_{50} = 3,2 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ a $K_i = 6,9 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ (Qiu *et al. J. Biol. Chem.* **2007**, 282, 8368; WO 9946279).

Obdobný spirolakton připravený Bydalem *et al.*, 3-deoxyestradiol s C-17-dimethyl-spiro- δ -laktonem vykazoval $\text{IC}_{50} = 2,9 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$. Látka je jen zanedbatelně estrogení a není androgení, ale selektivita vůči jednotlivým izoenzymům není diskutována (Bydal *et al. Eur. J. Med. Chem.* **2009**, 44, 632). Zveřejněna byla také syntéza dvou sérií C-17-spirolaktonových derivátů androstanu. Látky se neváží na ER ani nevykazují androgení aktivitu, $17\beta\text{HSD5}$ inhibují v rozmezí 54 až 73 % při koncentraci $0,3 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ (Djigoué *et al. Molecules* **2013**, 18, 914). Bothem a spoluautory byla nedávno představena série estra-1,3,5(10), 16-tetraen-3-karboxamidových derivátů (WO 2013045407, WO 2014128108). Látky nesou v poloze C-17 různě substituovaný pyridinový kruh a byly představeny jako inhibitory $17\beta\text{HSD5}$, $\text{IC}_{50} < 50 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$. Syntézu a použití C-3 substituovaných estra-1,3,5(10),16-tetraenů s obdobnou hodnotou IC_{50} předkládá WO 2014009274.

Podstata vynálezu

Tato přihláška vynálezu předkládá skupinu nových C-15 derivátů estronu, které zcela specificky inhibují pouze izoenzymy $17\beta\text{HSD1}$ a/nebo $17\beta\text{HSD5}$, aniž by současně při dané koncentraci ovlivňovaly ostatní testované izoenzymy, konkrétně $17\beta\text{HSD}$ typu 2, 3, 4, 7.

Předmětem vynálezu jsou 15β -substituované deriváty estronu obecného vzorce **I**,



kde:

5 substituenty R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , R^5 jsou nezávisle na sobě zvoleny ze skupiny zahrnující: C_1 – C_4 alkyl, C_1 – C_4 alkoxy, C_1 – C_4 halogenalkyl, halogen, $COOR^6$, kde R^6 je C_1 – C_4 alkyl; H, OH;

popřípadě R^1 a R^2 spolu dohromady tvoří aryl, výhodně naftyl, a pak jsou R^3 , R^4 a R^5 každý tvořen vodíkovým atomem;

10 přičemž aromatický kruh v poloze C–15 může být mono–, di–, tri–, tetra– i penta–substituovaný uvedenými substituenty R^1 až R^5 .

15 Alkyl je lineární nebo rozvětvený C_1 až C_4 alkylový řetězec, tedy methyl, ethyl, propyl, isopropyl či butyl.

Alkoxy je skupina $-OR_a$, kde R_a je alkyl.

20 Aryl je uhlovodíková skupina obsahující 6 až 10 uhlíkových atomů a alespoň jeden aromatický kruh. S výhodou je aryl vybrán ze skupiny zahrnující fenylyl, benzyl, naftyl; aryl může být nesubstituovaný nebo substituovaný 1 až 5 substituenty, vybranými ze skupiny zahrnující $-OH$, halogen, C_1 až C_4 alkyl, C_1 až C_4 alkoxy, $-CN$ a $-COOR_b$, kde R_b je vodík nebo C_1 až C_4 alkyl.

25 Halogen je vybrán ze skupiny zahrnující $-F$, $-Cl$, $-Br$, $-I$.

V rozsahu uvažovaných terapeutických koncentrací nemají předkládané sloučeniny estrogení ani toxický účinek. Vybrané deriváty navíc vykazují vlastnosti ER/AR antagonistů a/nebo antiproliferační účinek *in vitro*.

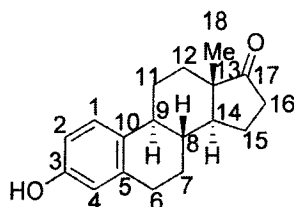
30 Předkládané látky vykazují jedinečný soubor vlastností, díky nimž mohou být využitelné v terapii a diagnostice estrogen–dependentních onemocnění. Jsou selektivními inhibitory 17β HSD, nemají estrogení účinek a nejsou obecně cytotoxické. Selektivní inhibici skupiny enzymů 17β –hydroxysteroid dehydrogenáz (17β HSD), majících klíčovou roli při tvorbě biologicky aktivních estrogenů a androgenů, mohou zásadně ovlivnit četné pochody v těle, především proliferaci a diferenciaci buněk.

40 Nadměrná exprese sledovaných izoenzymů zraďy 17β HSD, a tedy nadměrná produkce 17β –hydroxysteroidů v tkáních, souvisí s výskytem takových estrogen/androgen – dependentních onemocnění, jako jsou tumory prsní tkáně, vaječníků, endometria, prostaty, kolorektální karcinom, karcinom plic, spinocelulární karcinom, ale i nenádorové poruchy typu akné, hirsutismu, pseudohermafroditismu a mnohé další. Selektivní inhibice aktivity jednotlivých izoenzymů tedy může přispět k léčbě těchto onemocnění. Stanovení míry exprese příslušných typů HSD v postižených tkáních pak poskytuje marker pro jejich včasnou diagnostiku.

45 Sloučeniny podle vynálezu byly výhodně připraveny novým způsobem, jímž je křížová metatetická reakce derivátů 15β –vinylestronu s příslušnými alkeny za katalýzy komplexu

ruthenia v organických rozpouštědlech. Následné dva syntetické kroky pak využívají běžné postupy k získání cílové molekuly.

- 5 Strukturním základem předkládaných sloučenin je 3-hydroxy-estra-1,3,5(10)-trien-17-on (estron), u něhož je použito následující číslování uhlíkových atomů:



10 Příklady uskutečnění vynálezu

Seznam zkratk

	$[\alpha]_D$	specifická rotace
15	δ	chemický posun
	σ	směrodatná odchylka
	A549	lidský adenokarcinom plic
	Ac	acetyl
	AKR	aldo-ketoreduktázy
20	APCI	chemická ionizace za atmosférického tlaku
	AR	androgenní receptor
	b	broad (široký) signál v NMR spektru
	BJ	lidské fibroblasty
	Bu	butyl
25	cDNA	komplementární DNA (DNA vzniklá zpětným přepisem z RNA do DNA)
	CEM	T-lymfoblastická leukémie
	CEM-DNR-bulk	T-lymfoblastická leukémie rezistentní na doxorubicin
	CHO	křeččí karcinom ovária
30	d	dublet
	DHEA	dehydroepiandrosteron
	DMEM	Eaglovo médium modifikované podle Dulbecca
	DMSO	dimethylsulfoxid
	DNA	deoxyribonukleová kyselina
35	E1	estron
	E2	estradiol
	E3	estriol
	ekv	ekvivalent
	ER	estrogenní receptory
40	ERE	úsek DNA, na který se váže estrogenový receptor, aktivovaný vazbou estrogenu (estrogen response element)
	ESI	ionizace elektrosprejem
	EST	estrogen sulfotransferáza
	Et	ethyl
45	FBS	fetální hovězí sérum
	HCT116p53	wt lidská rakovina tlustého střeva, wild-type
	HCT116p53-/-	lidská rakovina tlustého střeva, mutant p53
	HMPA	hexamethylfosfortriamid
	HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie

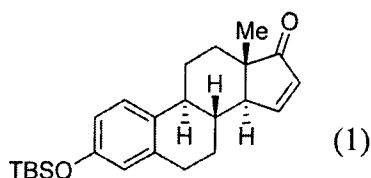
	HR-MS	hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením
	HSD	hydroxysteroiddehydrogenázy
	IC ₅₀	koncentrace látky, nutná k 50% inhibici
	IČ	infračervená spektroskopie
5	<i>J</i>	interakční konstanta
	K562	lidská myeloidní leukémie
	K562-Tax	lidská myeloidní leukémie rezistentní vůči taxolu
	LHRH	hormon, řídící uvolňování luteinizačního hormonu (LH)
	m	multiplet
10	MCF-7	buněčná linie odvozená z lidského prsního karcinomu
	Me	methyl
	MRC7	lidské fibroblasty
	MTT test	kolorimetrický test stanovení životnosti buněk
	NAD(P)	nikotinamidadenindinukleotid(fosfát)
15	NMR	nukleární magnetická rezonance
	NSCLC	nemalobuněčný karcinom plic
	P450	cytochrom P450
	p53	tumor supresorový gen
	PGF _{2α}	prostaglanin F _{2α}
20	pGL4	luciferázový reporterový vektor
	PgP	protein mnohočetné lékové rezistence
	PgR	progesteronový receptor
	ppm	dílů či částic na jeden milion (parts per million)
	q	kvadruplet
25	R _f	retardační faktor
	s	singlet
	SDR	dehydrogenázy typu krátký řetězec
	SEEM	selektivní modulátor enzymů steroidogeneze
	SERD	selektivní deregulátor estrogenních receptorů
30	SERM	selektivní modulátor estrogenních receptorů
	SHBG	globulin, vázající pohlavní hormony
	SPE	extrakce na pevné fázi
	STS	sulfatáza
	T	testosteron
35	t	triplet
	T-47D	buněčná linie odvozená z lidského prsního karcinomu
	TBAF	tetrabutylammonium fluorid
	TBS	<i>t</i> -butyldimethylsilyl
	TES	triethylsilyl
40	THF	tetrahydrofuran
	TLC	chromatografie na tenké vrstvě
	TMS	trimethylsilyl
	t _R	retenční čas
	tt	teplota tání
45	U2OS	buňky lidského osteosarkomu
	UV	ultrafialové záření
	wt	"wild type"
	Δ ⁵ -diol	androstendiol (androst-5-en-3β,17β-diol)
50	Syntetické postupy	

¹H NMR spektra byla měřena při teplotě 24 °C a při frekvenci 400 MHz na spektrometrech Bruker AVANCE-400 a 500 v deuteriochloroformu nebo deuteromethanolu, s tetramethylsilanem jako vnitřním standardem. Chemické posuny jsou udány v ppm (δ-stupnice), interakční konstanty (*J*) jsou udány v Hz. Multiplicity signálů jsou označeny následovně: s – singlet, d –

dublet, t – triplet, q – kvadruplet, m – multiplet, písmeno b označuje široký signál (broad). Body
tání byly změřeny na přístroji Kofler. Optická rotace byla měřena polarimetrem Autopol IV
(Rudolf Research Analytical, Flanders, USA), $[\alpha]_D$ hodnoty jsou uvedeny v $10^{-1} \cdot \text{deg} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ a
byly kompenzovány na standardní teplotu 20 °C. Infračervená spektra byla měřena v roztocích
5 vzorků nebo v tabletách bromidu draselného pomocí spektrometru Bruker IFS 55, vlnočty jsou
udány v cm^{-1} . Hmotnostní spektra byla měřena na spektrometrech ZAB-EQ (při 70 eV) nebo
LCQ Classic (Thermo Finnigan). HPLC chromatografie byla prováděna na přístroji Waters 600 s
detektorem s diodovým polem PDA 2996. Fluka 60 silica gel byl používán na sloupcovou
10 chromatografii, pro tenkovrstvou chromatografii (TLC) byly používány aluminiové desky
potažené vrstvou 60 FB_{254B} silikagelu. Pro vizualizaci TLC byly využívány roztoky KMnO_4 a
fosfomolybdenové kyseliny a UV detekce.

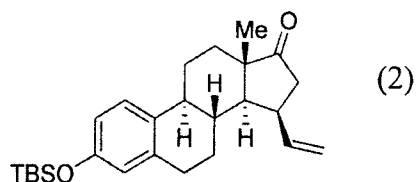
Syntéza výchozí látky

Příklad 1: 3-(*t*-butyldimethylsilyloxy)-estra-1,3,5(10),15-tetraen-17-on (1)



Enon **1** byl připraven v souladu s publikovanou metodou (Sakakibara, M.; Uchida, A.O. *Biosci.*
Biotech. Biochem **1996**, 60, 3, 405) Saegusovou oxidací v 75% výtěžku: t_t 148 °C; $[\alpha]_D$ -37,4
(c 0,203; CHCl_3); ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 0,19 (s, 6H, $\text{Si}-(\text{CH}_3)_2$), 0,98 (s, 9H, $(\text{CH}_3)_3\text{C}$),
1,11 (s, 3H, H-18), 1,55 (m, 1H, H-7a), 1,66–1,85 (m, 3H, H-8, 11a, 12a), 2,01 (m, 1H, H-12b),
2,18 (dm, 1H, J = 12,9 Hz, H-7b), 2,33 (m, 1H, H-9), 2,43 (m, 1H, H-11a), 2,50 (dm, 1H, J =
11,6 Hz, H-14), 2,87–2,96 (m, 2H, H-6), 6,08 (dd, 1H, J = 6,0; 3,2 Hz, H-16), 6,59 (bd, 1H, J =
2,7 Hz, H-4), 6,64 (dd, 1H, J = 8,5; 2,7 Hz, H-2), 7,12 (d, 1H, J = 8,5 Hz, H-8), 7,63 (dd, 1H, J =
6,0; 1,9 Hz, H-15); ^{13}C NMR (150,9 MHz, CDCl_3) δ -4,41 ($\text{Si}-(\text{CH}_3)_2$), 181,5 ($\text{C}-(\text{CH}_3)_3$),
20,97 (C-18), 25,34 (C-11), 25,67 ($\text{C}-(\text{CH}_3)_3$), 26,68 (C-7), 29,08 a 29,19 (C-6, 12), 35,48 (C-
8), 45,15 (C-9), 51,46 (C-13), 56,13 (C-14), 117,33 (C-3), 120,01 (C-4), 125,82 (C-1), 131,87
(C-16), 132,28 (C-10), 137,31 (C-5), 153,58 (C-3), 158,26 (C-15), 213,09 (C-17); IČ (CHCl_3)
v 3076, 3050, 3029, 2960, 2932, 2897, 2860, 1705, 1615, 1607, 1569, 1497, 1472, 1463, 1443,
1436, 1417, 1391, 1371, 1363, 1258, 1186, 1104, 1005, 941, 885, 697, 582, 449 cm^{-1} ; HR-MS
(ESI) vypočítaná pro $\text{C}_{24}\text{H}_{34}\text{O}_2\text{SiNa}$ $[\text{M}+\text{Na}^+]$ 405,22203 nalezená 405,22212. R_f (7/1
hexan/EtOAc) = 0,6.

Příklad 2: 3-(*t*-butyldimethylsilyloxy)-15 β -vinyl-estra-1,3,5(10)-trien-17-on (2)



Pokud je nám známo, příprava 15 β -vinylestronu je publikována pouze v WO 200834796. Tuto
metodu jsme pozměnili tím, že místo *t*-butyldimethylsilylové chránicí skupiny (poskytující
výtěžek reakce 24 %) byla nyní použita skupina benzylová. Podařilo se tak podstatně zvýšit
výtěžky vinylestronu **2**, které po krystalizaci z EtOAc reprodukovatelně převyšují 90 %. Směs 1
45 $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ roztoku vinylmagnesiumbromidu v THF (13 ml, 13,08 mmol), CuI (65 mg, 0,654 mmol)

a HMPA (2,8 ml, 15,7 mmol) v CH_2Cl_2 (50 ml) a inertní atmosféře argonu byla ochlazena na teplotu -78°C . K této směsi byl po kapkách přidán roztok enonu **1** (2,5 g, 6,54 mmol) a TMSCl (1,7 ml, 13,08 mmol) v CH_2Cl_2 (50 ml). Reakční směs byla poté pozvolna zahřátá na teplotu místnosti a míchána do druhého dne. Po přidání vody a přikapání $1\text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ HCl byla směs
 5 míchána ještě 5 minut, poté naředěna CH_2Cl_2 a promyta vodou. Spojené organické fáze byly promyty nasyceným roztokem NaCl , vysušeny pomocí MgSO_4 a odpařeny za sníženého tlaku. Po chromatografii na silikagelu ve směsi (1/1 hexan/ CH_2Cl_2) bylo získáno 2,5 g vinylestronu **2** v 92% výtěžku ve formě bílé krystalické látky: t_{t} 141°C ; $[\alpha]_{\text{D}} +52.7$ (c 0,186; CHCl_3); ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 0,19 (s, 6H, $\text{Si}-(\text{CH}_3)_2$), 0,98 (s, 9H, $(\text{CH}_3)_3\text{C}$), 1,03 (s, 3H, H-18), 1,41–1,56 (m, 3H, H-7a, 11a, 12a), 1,72–1,83 (m, 2H, H-8, 14), 1,90 (m, 1H, H-12b), 2,15 (m, 1H, H-7b), 2,28 (m, 1H, H-9), 2,36 (m, 1H, H-11a), 2,52 (dd, 1H, $J = 19,5$; 9,0 Hz, H-16b), 2,63 (dd, 1H, $J = 19,5$; 2,2 Hz, H-16a), 2,80–2,92 (m, 2H, H-6), 3,13 (m, 1H, H-15), 5,13 (dt, 1H, $J = 10,4$; 1,6 Hz, H-2b'), 5,17 (dt, 1H, $J = 17,2$; 1,6 Hz, H-2a'), 6,10 (ddd, 1H, $J = 17,2$; 10,4; 6,7 Hz, H-1'), 6,58 (dm, 1H, $J = 2,7$ Hz, H-4), 6,62 (dd, 1H, $J = 8,4$; 2,7 Hz, H-2), 7,11 (dd, 1H, $J = 8,6$; 0,9 Hz, H-1); ^{13}C NMR (150,9 MHz, CDCl_3) δ -4,40 ($\text{Si}-(\text{CH}_3)_2$), 16,87 (C-18), 18,17 (C- $(\text{CH}_3)_3$), 25,48 (C-11), 25,70 (C- $(\text{CH}_3)_3$), 26,31 (C-7), 29,24 (C-6), 33,38 (C-12), 35,94 (C-8), 37,10 (C-15), 41,75 (C-16), 44,50 (C-9), 47,69 (C-13), 52,69 (C-14), 115,96 (C-2'), 117,24 (C-2), 119,98 (C-4), 125,85 (C-1), 132,63 (C-10), 137,62 (C-5), 139,00 (C-1'), 153,54 (C-3), 220,40 (C-17); IR (CHCl_3) ν 3080, 2960, 2932, 2895, 2860, 1732, 1637, 1607, 1570, 1497, 1472, 1463, 1442, 1435, 1419, 1404, 1391, 1377, 1362, 1256, 1186, 1159, 1100, 1008, 1000, 941, 922, 883, 841, 806, 697, 586, 447 cm^{-1} ; HR-MS (ESI) vypočítaná pro $\text{C}_{26}\text{H}_{38}\text{O}_2\text{SiNa}$ $[\text{M}+\text{Na}^+]$ 433,25333 nalezená 433,25330. R_f (7/1 hexan/ EtOAc) = 0,5.

a) Obecný postup metatéze vinylestronu s různými olefiny

25 K roztoku vinylestronu **2** (100 mg, 0,244 mmol) a druhého olefinu (0,488 mmol) ve směsi rozpouštědel CH_2Cl_2 /trifluorotoluen (21 ml, 2/1) byl přidán rutheniový katalyzátor (Sigma Aldrich, katalogové číslo 569755) Hoveyda–Grubbs druhé generace (15 mg, 0,024 mmol) a CuI (5 mg, 0,024 mmol) v inertní atmosféře argonu a výsledná směs byla míchána při teplotě 40 až
 30 70°C , nejlépe 65°C po dobu 4 až 12 h, s pak výhodou po dobu 4 h. Po dalším přidavku druhého olefinu (0,488 mmol) a katalyzátoru (7,5 mg, 0,012 mmol) byla směs dále míchána při stejné teplotě přes noc. Poté byla reakce ukončena odpařením rozpouštědel za sníženého tlaku. Po chromatografii na silikagelu (hexan/ EtOAc 95/5) byl získán produkt zkřížené metatéze. Výtěžky metatezí vinylestronu **2** s různými olefiny se u většiny připravovaných látek pohybovaly v
 35 rozmezí 56 až 98 %.

b) Odstranění TBS skupiny z hydroxylové skupiny v poloze C-3 derivátů

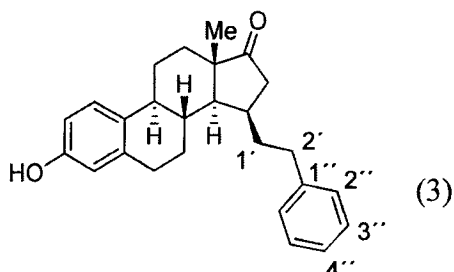
40 K produktu metatéze, rozpuštěnému v THF, byl postupně za teploty místnosti přikapán roztok TBAF, $1\text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ v THF (1ekv). Po 1 h byla přidána voda a reakční směs byla extrahována CH_2Cl_2 a/nebo CHCl_3 . Spojené organické fáze byly promyty nasyceným roztokem NaCl , vysušeny pomocí MgSO_4 a rozpouštědla byla odstraněna za sníženého tlaku. Chromatografií na silikagelu byl získán finální odchráněný produkt. Výtěžky reakce vždy převýšily 90 %.

45 c) Redukce dvojnás vazby

Baňka s roztokem odchráněného produktu metatéze a katalyzátoru Pd/C (10 hmotn. %) v EtOAc byla za vydatného míchání evakuována a posléze naplněna vodíkem. Reakční směs byla vždy míchána přes noc. Průběh reakce byl monitorován pomocí TLC, k vizualizaci bylo využíváno
 50 roztoku KMnO_4 , který selektivně detekuje dvojnás vazbu vedle jednoduché. Navíc výchozí látky byly obvykle viditelné pod UV lampou při vlnové délce 254 nm, zatím co redukováné produkty již při této vlnové délce viditelné nebyly. Hodnoty R_f výchozí látky a produktu hydrogenace byly vždy stejné. Reakční směs byla po zreagování výchozí látky zfiltrována přes Celit (filtrační křemelina SiO_2), rozpouštědla byla odstraněna za sníženého tlaku a chromatografií na HPLC

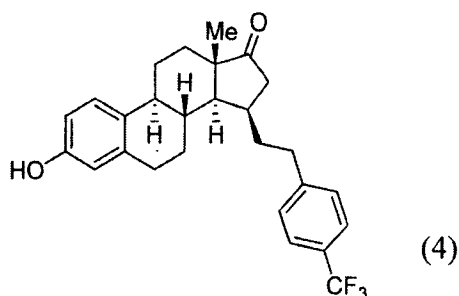
(AcCN/H₂O) byly získány finální bezbarvé, krystalické produkty. Výtěžky reakce byly vždy vyšší než 90 %.

5 Příklad 3: 3-hydroxy-15 β -fenethyl-estra-1,3,5(10)-trien-17-on (3)



Látka 3 byla připravena podle výše uvedeného obecného postupu reakcí vinylestronu 2 se
 10 styrenem (56 μ l). Po chromatografii na HPLC (30/70 AcCN/H₂O, t_R = 15 min) bylo získáno
 36 mg bezbarvé pevné látky 3 (číslování postranního C-15 řetězce je ve všech následujících
 příkladech stejné jako u derivátu 3): mp 153 °C; $[\alpha]_D^{25} +52,6$ (c 0,547; CHCl₃); ¹H NMR (500
 MHz, CDCl₃) δ 1,03 (s, 3H, H-18), 1,35–1,55 (m, 3H, H-7a, 11a, 12a), 1,62–1,76 (m, 3H, H-8,
 14, 1'a), 1,86–1,97 (m, 3H, H-7a, 12b, 1'b), 2,25 (m, 1H, H-9), 2,30–2,38 (m, 2H, H-11b, 15),
 15 2,40 (dd, 1H, J = 19,3; 2,8 Hz, H-16a), 2,49 (dd, 1H, J = 19,3; 8,1 Hz, H-16b), 2,54 (ddd, 1H, J
 = 13,6; 9,2; 7,1 Hz, H-2'a), 2,75 (ddd, 1H, J = 13,6; 9,8; 5,2 Hz, H-2'b), 2,80–2,93 (m, 2H, H-
 6), 4,82 (bs, 1H, OH), 6,59 (dm, 1H, J = 2,8 Hz, H-4), 6,63 (ddm, 1H, J = 8,4; 2,8 Hz, H-2),
 7,13 (dd, 1H, J = 8,5; 1,1 Hz, H-1), 7,18 (m, 2H, H-2''), 7,21 (m, 1H, H-4''), 7,30 (m, 2H, H-
 3''); ¹³C NMR (150,9 MHz, CDCl₃) δ 17,71 (C-18), 25,47 (C-11), 26,57 (C-7), 29,30 (C-6),
 20 33,09 (C-1'), 33,73 (C-15), 33,82 (C-12), 35,80 (C-2'), 35,91 (C-8), 42,70 (C-16), 44,47 (C-9),
 47,19 (C-13), 52,77 (C-14), 112,70 (C-2), 115,22 (C-4), 126,04 (C-4''), 126,16 (C-1), 128,41
 (C-2''), 128,46 (C-3''), 132,33 (C-10), 138,00 (C-5), 141,65 (C-1''), 153,54 (C-3), 221,37 (C-
 17); IČ (CHCl₃) ν 3599, 3413, 3086, 3064, 3027, 2929, 2861, 1729, 1603, 1585, 1499, 1454,
 1465, 1378, 1261, 1178, 1166, 1151, 1124, 1030, 903, 701, 472 cm⁻¹; HR-MS (APCI) vypočtená
 25 pro C₂₆H₃₀O₂Na [M+Na⁺] 397,21380 nalezená 397,21384. R_f (4/1 hexan/EtOAc) = 0,4.

Příklad 4: 3-hydroxy-15 β -(4-(trifluormethyl)fenethyl)-estra-1,3,5(10)-trien-17-on (4)

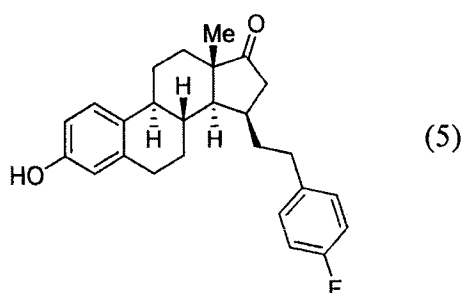


30

Látka 4 byla připravena podle výše uvedeného obecného postupu reakcí vinylestronu 2 s 4-
 (trifluormethyl)styrenem (72 μ l). Po chromatografii na HPLC (30/70 AcCN/H₂O, t_R = 19 min)
 bylo získáno 24 mg bezbarvé pevné látky 4: mp 168 °C; $[\alpha]_D^{25} +51,5$ (c 0,136; CHCl₃); ¹H NMR
 35 (500 MHz, CDCl₃) δ 1,03 (s, 3H, H-18), 1,37–1,55 (m, 3H, H-7a, 11a, 12a), 1,60–1,76 (m, 3H,
 H-8, 14, 1'a), 1,83–1,97 (m, 3H, H-7a, 12b, 1'b), 2,26 (m, 1H, H-9), 2,30–2,38 (m, 2H, H-11b,
 15), 2,41 (dd, 1H, J = 19,4, 2,5 Hz, H-16a), 2,47 (dd, 1H, J = 19,4; 8,5 Hz, H-16b), 2,60 (bddd,
 1H, J = 13,8; 9,0; 7,3 Hz, 2'a), 2,81 (bddd, 1H, J = 13,7; 9,8; 5,3 Hz, 2'b), 2,82–2,92 (m, 2H, H-
 6), 4,91 (s, 1H, OH), 6,59 (bd, 1H, J = 2,8 Hz, H-4), 6,64 (bdd, 1H, J = 8,5; 2,8 Hz, H-2), 7,13

(bd, 1H, $J = 8,5$ Hz, H-1), 7,29 (m, 2H, H-2''), 7,56 (m, 1H, H-3''); ^{13}C NMR (150,9 MHz, CDCl_3) δ 17,72 (C-18), 25,43 (C-11), 26,60 (C-7), 29,24 (C-6), 32,82 (C-1'), 33,71 (C-15), 33,80 (C-12), 35,59 (C-2'), 35,87 (C-8), 42,54 (C-16), 44,43 (C-9), 47,18 (C-13), 52,70 (C-14), 112,75 (C-2), 115,21 (C-4), 124,24 (q, $J^{\text{C-F}} = 271,7$ Hz, CF_3), 125,40 (q, $J^{\text{C-F}} = 3,8$ Hz, C-3''), 126,15 (C-1), 128,46 (q, $J^{\text{C-F}} = 32,4$ Hz, C-4''), 128,71 (C-2''), 132,21 (C-10), 137,88 (C-5), 145,73 (q, $J^{\text{C-F}} = 1,3$ Hz, C-1''), 153,61 (C-3), 220,97 (C-17); ^{19}F NMR (470,3 MHz, CDCl_3) δ -58,46; IČ (CHCl_3) ν 3598, 3433, 3060, 2938, 2864, 1730, 1618, 1560, 1466, 1453, 1418, 1377, 1326, 1249, 1167, 1128, 1108, 1068, 1095, 1057, 1019, 834, 611, 446 cm^{-1} ; HR-MS (APCI) vypočtená pro $\text{C}_{27}\text{H}_{29}\text{O}_2\text{F}_3\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}^+]$ 465,20119 nalezená 465,20102. $R_f(4/1 \text{ hexan/EtOAc}) = 0,4$.

Příklad 5: 3-hydroxy-15 β -(4-(fluor)fenethyl)-estra-1,3,5(10)-trien-17-on (5)

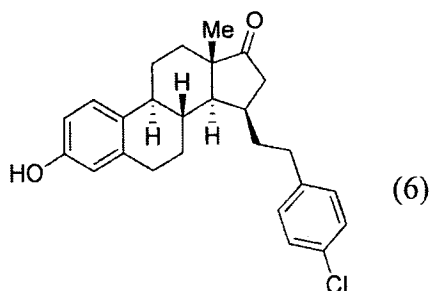


15

Látka **5** byla připravena podle výše uvedeného obecného postupu reakcí vinylestronu **2** s 4-fluorstyrenem (58 μl). Po chromatografii na HPLC (30/70 $\text{AcCN}/\text{H}_2\text{O}$, $t_R = 21$ min) bylo získáno 26 mg bezbarvé pevné látky **5**: mp 164 $^\circ\text{C}$; $[\alpha]_D +33,8$ (c 0,222; CHCl_3); ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 1,03 (s, 3H, H-18), 1,34–1,56 (m, 3H, H-7a, 11a, 12a), 1,58–1,77 (m, 3H, H-8, 14, 1'a), 1,82–1,96 (m, 3H, H-7a, 12b, 1'b), 2,26 (m, 1H, H-9), 2,28–2,38 (m, 2H, H-11b, 15), 2,39 (bdd, 1H, $J = 19,4, 2,5$ Hz, H-16a), 2,45 (bdd, 1H, $J = 19,4; 8,5$ Hz, H-16b), 2,50 (m, 1H, 2'a), 2,72 (m, 1H, 2'b), 2,78–2,94 (m, 2H, H-6), 5,03 (bs, 1H, OH), 6,60 (bd, 1H, $J = 2,7$ Hz, H-4), 6,64 (bdd, 1H, $J = 8,4; 2,8$ Hz, H-2), 6,99 (m, 1H, H-2''), 7,07–7,20 (m, 3H, H-1, 3''); ^{13}C NMR (150,9 MHz, CDCl_3) δ 17,71 (C-18), 25,44 (C-11), 26,56 (C-7), 29,27 (C-6), 33,16 (C-1'), 33,56 (C-15), 33,79 (C-12), 34,90 (C-2'), 35,88 (C-8), 42,64 (C-16), 44,43 (C-9), 47,20 (C-13), 52,72 (C-14), 112,73 (C-2), 115,20 (d, $J^{\text{C-F}} = 21,2$ Hz, C-3''), 115,22 (C-4), 126,14 (C-1), 129,72 (d, $J^{\text{C-F}} = 7,8$ Hz, C-2''), 132,20 (C-10), 137,21 (d, $J^{\text{C-F}} = 3,3$ Hz, C-1''), 137,92 (C-5), 153,62 (C-3), 161,32 (d, $J^{\text{C-F}} = 243,7$ Hz, C-4''), 221,3 (C-17); ^{19}F NMR (470,3 MHz, CDCl_3) δ -110,93 (m, 1F); IČ (CHCl_3) ν 3598, 3431, 3028, 2936, 2864, 1729, 1610, 1585, 1502, 1466, 1453, 1440, 1378, 1281, 1248, 1190, 1157, 1095, 1057, 983, 959, 939, 877, 582, 472 cm^{-1} ; HR-MS (APCI) vypočtená pro $\text{C}_{26}\text{H}_{29}\text{O}_2\text{FNa}$ $[\text{M}+\text{Na}^+]$ 415,20438 nalezená 415,20447. $R_f(4/1 \text{ hexan/EtOAc}) = 0,4$.

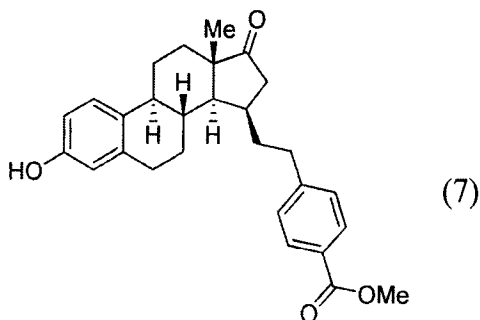
35

Příklad 6: 3-hydroxy-15 β -(4-(chlor)fenethyl)-estra-1,3,5(10)-trien-17-on (6)



Látka **6** byla připravena podle výše uvedeného obecného postupu reakcí vinylestronu **2** s 4-chlorstyrenem (59 μ l). Po chromatografii na HPLC (35/65 AcCN/H₂O, t_R = 30 min) bylo získáno 34 mg bezbarvé pevné látky **6**: t_f 168 °C; $[\alpha]_D +69,3$ (c 0,150; CHCl₃); ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 1,02 (s, 3H, H-18), 1,36–1,56 (m, 3H, H-7a, 11a, 12a), 1,65 (m, 1H, H-1a'), 1,64–1,76 (m, 2H, H-8, 14), 1,84–1,94 (m, 3H, H-1b', 7b, 12b), 2,26 (m, 1H, H-9), 2,26–2,38 (m, 2H, H-11b, 15), 2,40 (dd, 1H, J = 19,3, 2,6 Hz, H-16a), 2,44 (dd, 1H, J = 19,3; 8,3 Hz, H-16b), 2,50 (ddd, 1H, J = 13,8; 8,9; 7,3 Hz, H-1'a), 2,72 (ddd, 1H, J = 13,8; 9,5; 5,2 Hz, H-1'b), 2,81–2,93 (m, 2H, H-6), 4,70 (s, 1H, OH), 6,59 (d, 1H, J = 2,8 Hz, H-4), 6,63 (dd, 1H, J = 8,4; 2,8 Hz, H-2), 7,10 (m, 2H, H-2''), 7,13 (d, 1H, J = 8,4 Hz, H-1), 7,21 (m, 2H, H-3''); ¹³C NMR (150,9 MHz, CDCl₃) δ 17,73 (C-18), 25,45 (C-11), 26,60 (C-7), 29,27 (C-6), 32,96 (C-1'), 33,62 (C-15), 33,82 (C-12), 35,08 (C-2'), 35,89 (C-8), 42,58 (C-16), 44,45 (C-9), 47,17 (C-13), 52,73 (C-14), 112,73 (C-2), 115,21 (C-4), 126,17 (C-1), 128,57 (C-3''), 129,74 (C-2''), 131,79 (C-4''), 132,33 (C-10), 137,95 (C-5), 140,04 (C-1''), 153,54 (C-3), 220,95 (C-17); IČ (KBr) ν 3372, 1728, 1711, 1618, 1611, 1501, 1492, 1464, 1407, 1375, 1015 cm⁻¹; HR-MS (APCI) vypočtená pro C₂₆H₃₀O₂Cl [M+H⁺] 409,19288 nalezená 409,19284. R_f (4/l hexan/EtOAc) = 0,4.

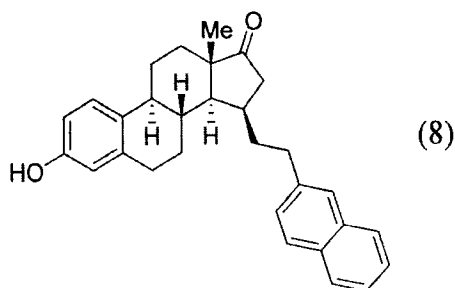
Příklad 7: 3-hydroxy-15 β -(4-ethyl-methylbenzoát)-estra-1,3,5(10)-trien-17-on (7)



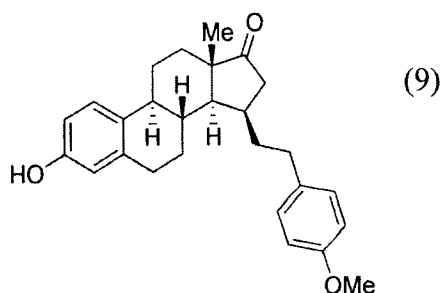
20

Látka **7** byla připravena podle výše uvedeného obecného postupu reakcí vinylestronu **2** s 4-vinyl-methylbenzoátem (62 μ l). Po chromatografii na HPLC (40/60 AcCN/H₂O, t_R = 30 min) bylo získáno 17 mg bezbarvé pevné látky **7**: t_f 139 °C; $[\alpha]_D +70,2$ (c 0,084; CHCl₃); ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 1,02 (s, 3H, H-18), 1,34–1,55 (m, 3H, H-7a, 11a, 12a), 1,65–1,76 (m, 3H, H-1'a, 8, 14), 1,82–1,98 (m, 3H, H-1'b, 7b, 12b), 2,25 (m, 1H, H-9), 2,28–2,38 (m, 2H, H-11b, 15), 2,39 (dd, 1H, J = 19,3; 2,6 Hz, H-16a), 2,45 (dd, 1H, J = 19,3; 8,4 Hz, H-16b), 2,60 (ddd, 1H, J = 13,7; 8,8; 7,2 Hz, H-2'a), 2,80 (ddd, 1H, J = 13,7; 9,6; 5,3 Hz, H-2'b), 2,80–2,93 (m, 2H, H-6), 3,91 (s, 3H, OCH₃), 5,01 (bs, 1H, OH), 6,59 (bd, 1H, J = 2,8 Hz, H-4), 6,64 (bdd, 1H, J = 8,4; 2,8 Hz, H-2), 7,12 (dd, 1H, J = 8,5; 1,0 Hz, H-1), 7,25 (m, 2H, H-2''), 7,98 (m, 2H, H-3''); ¹³C NMR (150,9 MHz, CDCl₃) δ 17,73 (C-18), 25,43 (C-11), 25,59 (C-7), 29,25 (C-6), 32,68 (C-1'), 33,64 (C-15), 33,80 (C-12), 35,73 (C-2'), 35,87 (C-8), 42,53 (C-16), 44,43 (C-9), 47,17 (C-13), 52,07 (OCH₃), 52,71 (C-14), 112,74 (C-2), 115,22 (C-4), 126,13 (C-1), 128,05 (C-4''), 128,48 (C-2''), 129,84 (C-3''), 132,19 (C-10), 137,90 (C-5), 147,14 (C-1''), 153,65 (C-3), 167,09 (CO), 220,99 (C-17); IČ (KBr) ν 3406, 3020, 1733, 1720, 1700, 1610, 1584, 1502, 1436, 1415, 1351, 1282, 964 cm⁻¹; HR-MS (APCI) vypočtená C₂₈H₃₃O₄ [M+H⁺] 433,23734 nalezená 433,23716. R_f (4/l hexan/EtOAc) = 0,2.

35

Příklad 8: 3-hydroxy-15 β -(ethyl-2-naftyl)-estra-1,3,5(10)-trien-17-on (8)

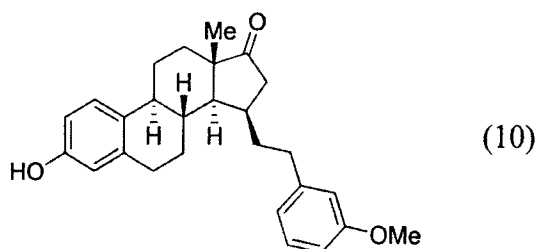
5 Látka **8** byla připravena podle výše uvedeného obecného postupu reakcí vinylestronu **2** s 2-vinylnaftalenem (75 mg). Po chromatografii na HPLC (30/70 AcCN/H₂O, t_R = 38 min) bylo získáno 13 mg bezbarvé pevné látky **8**: t_t 201 °C; $[\alpha]_D$ +77,0 (c 0,309; CHCl₃); ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 1,05 (s, 3H, H-18), 1,32–1,55 (m, 3H, H-7a, 11a, 12a), 1,66–1,75 (m, 2H, H-8, 14), 1,76 (dddd, 1H, J = 13,6; 11,7; 8,9; 5,3 Hz, H-1 a), 1,86–1,95 (m, 2H, H-7b, 12b), 2,02 (dddd, 1H, J = 13,6; 9,5; 7,2; 2,1 Hz, H-1'b), 2,24 (m, 1H, H-9), 2,31–2,42 (m, 2H, H-11b, 15), 2,40–2,52 (m, 2H, H-16), 2,71 (ddd, 1H, J = 15,8; 8,9; 7,2 Hz, H-2'a), 2,78–2,91 (m, 2H, H-6), 2,92 (ddd, 1H, J = 13,8; 9,5; 5,3 Hz, H-2'b), 5,11 (bs, 1H, OH), 6,59 (bd, 1H, J = 2,8 Hz, H-4), 6,64 (bdd, 1H, J = 8,4; 2,8 Hz, H-2), 7,12 (dd, 1H, J = 8,5; 1,1 Hz, H-1), 7,32 (dd, 1H, J = 8,4; 1,8 Hz, H-3"), 7,44 (bddd, 1H, J = 8,0; 6,8; 1,4 Hz, H-6"), 7,47 (bddd, 1H, J = 8,1; 6,8; 1,5 Hz, H-7"), 7,61 (m, 1H, H-1"), 7,79 (m, 1H, H-8"), 7,80 (bd, 1H, J = 8,4 Hz, H-4"), 7,82 (m, 1H, H-5); ¹³C NMR (150,9 MHz, CDCl₃) δ 17,74 (C-18), 25,47 (C-11), 26,62 (C-7), 29,27 (C-6), 32,85 (C-1'), 33,75 (C-15), 32,85 (C-12), 35,89 (C-2'), 35,95 (C-8), 42,71 (C-16), 44,47 (C-9), 47,24 (C-13), 52,82 (C-14), 112,74 (C-2), 115,24 (C-4), 125,30 (C-6"), 126,07 (C-1), 126,11 (C-7"), 126,51 (C-1"), 127,07 (C-3"), 127,35 (C-8"), 127,64 (C-4"), 128,09 (C-5"), 132,06 (C-4a"), 132,28 (C-10), 133,58 (C-8a"), 137,97 (C-5), 139,07 (C-2"), 153,65 (C-3), 221,38 (C-17); IČ (KBr) ν 3371, 3052, 3018, 1729, 1719, 1610, 1601, 1584, 1502, 1451, 1442 cm⁻¹; HR-MS (APCI) vypočtená C₃₀H₃₃O₂ [M+H⁺] 425,24751 nalezená 425,24746. R_f (4/1 hexan/EtOAc) = 0,4.

25 Příklad 9: 3-hydroxy-15 β -(4-(methoxy)fenethyl)-estra-1,3,5(10)-trien-17-on (9)

30 Látka **9** byla připravena podle výše uvedeného obecného postupu reakcí vinylestronu **2** s 4-methoxystyrenem (65 μ l). Po chromatografii na HPLC (37/63 ACCN/H₂O, t_R = 30 min) bylo získáno 24 mg bezbarvé pevné látky **9**: t_t 159 °C; $[\alpha]_D$ +48,0 (c 0,154; CHCl₃); ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 1,02 (s, 3H, H-18), 1,35–1,55 (m, 3H, H-7a, 11a, 12a), 1,63 (m, 1H, H-1'), 1,65–1,76 (m, 2H, H-8, 14), 1,85–1,94 (m, 3H, H-1'b, 7b, 12b), 2,25 (m, 1H, H-9), 2,28–2,36 (m, 2H, H-11b, 15), 2,39 (dd, 1H, J = 19,4; 2,7 Hz, H-16a), 2,44 (dd, 1H, J = 19,4; 8,7 Hz, H-16b), 2,49 (ddd, 1H, J = 13,8; 9,0; 7,2 Hz, H-2'a), 2,69 (ddd, 1H, J = 13,8; 9,7; 5,3 Hz, H-2'b), 2,79–2,93 (m, 2H, H-6), 3,80 (s, 3H, OCH₃), 4,69 (bs, 1H, OH), 6,59 (bd, 1H, J = 2,8 Hz, H-4), 6,63 (bdd, 1H, J = 8,4; 2,8 Hz, H-2), 6,84 (m, 2H, H-3"), 7,09 (m, 2H, H-2"), 7,13 (bd, 1H, J = 8,4 Hz, H-1); ¹³C NMR (150,9 MHz, CDCl₃) δ 17,71 (C-18), 25,49 (C-11), 26,59 (C-7), 29,32 (C-6), 33,27 (C-1'), 33,66 (C-15), 33,83 (C-12), 34,87 (C-2'), 35,93 (C-8), 42,17 (C-16), 44,49

(C-9), 47,19 (C-13), 52,79 (C-14), 55,27 (OCH₃), 112,69 (C-2), 113,86 (C-3"), 115,22 (C-4), 126,18 (C-1), 129,30 (C-2"), 132,39 (C-10), 133,69 (C-1"), 130,06 (C-1"), 138,03 (C-5), 153,51 (C-3), 157,89 (C-4"), 221,31 (C-17); IČ (KBr) ν 3386, 3059, 2835, 1730, 1718, 1619, 1583, 1512, 1452, 1442, 1246, 1035, 965, 708 cm⁻¹; HR-MS (APCI) vypočtená C₂₇H₃₃O₃ [M+H⁺] 405,24242 nalezená 405,24235. R_f(4/1 hexan/EtOAc) = 0,3.

Příklad 10: 3-hydroxy-15 β -(3-(methoxy)fenethyl)-estra-1,3,5(10)-trien-17-on (10)

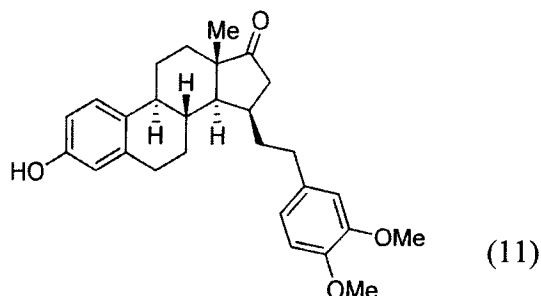


10

Látka **10** byla připravena podle výše uvedeného obecného postupu reakcí vinylestronu **2** s 3-methoxystyrenem (66 μ l). Po chromatografii na HPLC (30/70 ACCN/H₂O, t_R = 16 min) bylo získáno 52 mg bezbarvé pevné látky **10**: tt 178 °C; [α]_D +58,3 (c 1,706; CHCl₃); ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 1,03 (s, 3H, H-18), 1,36–1,50 (m, 2H, H-7a, 12a), 1,50 (m, 1H, H-11a), 1,61–1,76 (m, 3H, H-1a', 8, 14), 1,86–1,96 (m, 3H, H-1b, 7b, 12b), 2,25 (m, 1H, H-9), 2,23–2,38 (m, 2H, H-11b, 15), 2,40 (dd, 1H, *J* = 19,4; 2,8 Hz, H-16a), 2,46 (dd, 1H, *J* = 19,4; 8,1 Hz, H-16b), 2,51 (ddd, 1H, *J* = 13,8; 9,1; 7,1 Hz, H-2a'), 2,73 (ddd, 1H, *J* = 13,7; 9,7; 5,3 Hz, H-2b'), 2,80–2,93 (m, 2H, H-6), 3,81 (s, 3H, OCH₃), 5,00 (bs, 1H, OH), 6,59 (bd, 1H, *J* = 2,8 Hz, H-4), 6,64 (ddm, 1H, *J* = 8,4; 2,8 Hz, H-2), 6,73 (bdd, 1H, *J* = 2,6; 1,6 Hz H-2"), 6,76 (ddd, 1H, *J* = 8,2; 2,6; 1,0 Hz, H-4"), 6,78 (ddd, 1H, *J* = 7,5; 1,6; 1,0 Hz, H-6"), 7,13 (dd, 1H, *J* = 8,5; 1,1 Hz, H-1), 7,22 (bt, 1H, *J* = 7,8 Hz, H-5"); ¹³C NMR (150,9 MHz, CDCl₃) δ 17,70 (C-18), 25,46 (C-11), 26,58 (C-7), 29,29 (C-6), 32,91 (C-1'), 33,72 (C-15), 33,80 (C-12), 35,81 (C-2'), 35,90 (C-8), 42,68 (C-16), 44,47 (C-9), 47,21 (C-13), 52,74 (C-14), 55,16 (OCH₃), 111,03 (C-4"), 112,70 (C-2), 114,41 (C-2"), 115,22 (C-4), 120,83 (C-6"), 126,15 (C-1), 129,44 (C-5"), 132,24 (C-10), 137,96 (C-5), 143,29 (C-1"), 153,59 (C-3), 159,64 (C-3"), 221,54 (C-17); IČ (CHCl₃) ν 3598, 1729, 1611, 1602, 1594, 1585, 1500, 1489, 1439, 1281, 1259, 1233, 1191, 1165, 1153, 1017, 616 cm⁻¹; HR-MS (APCI) vypočtená C₂₇H₃₃O₃ [M+H⁺] 405,24242 nalezená 405,24247. R_f(4/1 hexane/EtOAc) = 0,3.

30

Příklad 11: 3-hydroxy-15 β -(3,4-(dimethoxy)fenethyl)-estra-1,3,5(10)-trien-17-on (11)



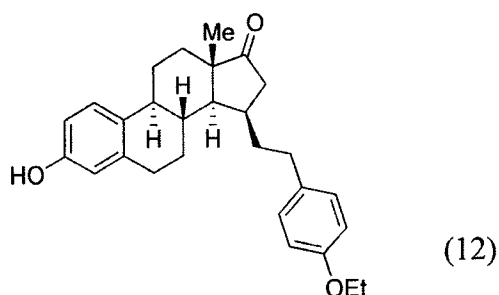
35

Látka **11** byla připravena podle výše uvedeného obecného postupu reakcí vinylestronu **2** s 3,4-dimethoxystyrenem (72 μ l). Po chromatografii na HPLC (30/70 AcCN/H₂O, t_R = 14 min) bylo získáno 17 mg bezbarvé pevné látky **11**: tt 146 °C; [α]_D +55,3 (c 0,347; CHCl₃); ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 1,03 (s, 3H, H-18), 1,31–1,56 (m, 3H, H-7a, 11a, 12a), 1,60–1,77 (m, 3H, H-1a', 8, 14), 1,85–1,95 (m, 3H, H-1b, 7b, 12b), 2,25 (m, 1H, H-9), 2,28–2,38 (m, 2H, H-11b, 15),

40

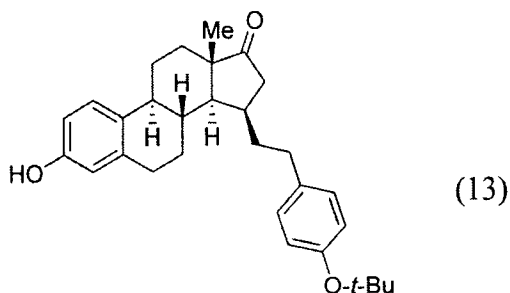
2,37–2,52 (m, 3H, H-16, H-2a'), 2,71 (ddd, 1H, $J = 13,8; 9,3; 5,2$ Hz, H-2b'), 2,78–2,92 (m, 2H, H-6), 3,86 (s, 3H, OCH₃), 3,88 (s, 3H, OCH₃), 5,62 (bs, 1H, OH), 6,60 (bdm, 1H, $J = 2,8$ Hz, H-4), 6,65 (bdd, 1H, $J = 8,5, 2,8$ Hz, H-2), 6,70 (d, 1H, $J = 2,0$ Hz, H-2''), 6,72 (dd, 1H, $J = 8,1; 2,8$ Hz, H-6''), 6,81 (d, 1H, $J = 8,1$ Hz, H-5''), 7,12 (bd, 1H, $J = 8,5$ Hz, H-1); ¹³C NMR (150,9 MHz, CDCl₃) δ 17,69 (C-18), 25,41 (C-11), 26,56 (C-7), 29,25 (C-6), 33,03 (C-1'), 33,49 (C-15), 33,75 (C-12), 35,20 (C-2'), 35,87 (C-8), 42,64 (C-16), 44,40 (C-9), 47,22 (C-13), 52,67 (C-14), 55,80 (OCH₃), 55,87 (OCH₃), 111,19 (C-5''), 111,62 (C-2''), 112,73 (C-2), 115,22 (C-4), 120,29 (C-6''), 126,06 (C-1), 131,98 (C-10), 134,17 (C-1''), 137,79 (C-5), 147,24 (C-4''), 148,79 (C-3''), 153,79 (C-3), 221,87 (C-17); IČ (CHCl₃) ν 3598, 2839, 1610, 1591, 1516, 1501, 1454, 1442, 1260, 1193, 1155, 1029, 870, 808, 581, 544 cm⁻¹; HR-MS (APCI) vypočtená C₃₄H₄₇O₄Si [M+Si]⁺ 547,32381 nalezená 547,32368. R_f(4/l hexan/EtOAc) = 0,25.

Příklad 12: 3-hydroxy-15 β -(4-(ethoxy)fenethyl)-estra-1,3,5(10)-trien-17-on (12)



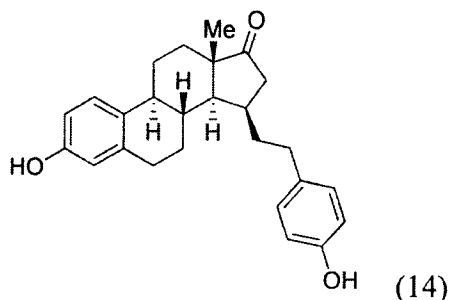
Látka **12** byla připravena podle výše uvedeného obecného postupu reakcí vinylestronu **2** s 4-ethoxystyrenem (73 μ l). Po chromatografii na HPLC (30/70 AcCN/H₂O, $t_R = 17$ min) bylo získáno 62 mg bezbarvé pevné látky **12**: t_f 173 °C; $[\alpha]_D^{25} +62,5$ (c 0,208; CHCl₃); ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 1,02 (s, 3H, H-18), 1,35–1,49 (m, 2H, H-7a, 12a), 1,41 (t, 3H, $J = 7,0$ Hz, OCH₂CH₃), 1,50 (m, 1H, H-11a), 1,58–1,75 (m, 3H, H-1'a, 8, 14), 1,84–1,93 (m, 3H, H-1'b, 7b, 12b), 2,25 (m, 1H, H-9), 2,28–2,37 (m, 2H, H-11b, 15), 2,39 (dd, 1H, $J = 19,4, 2,8$ Hz, H-16a), 2,44 (dd, 1H, $J = 19,4; 8,1$ Hz, H-16b), 2,47 (ddd, 1H, $J = 13,8; 9,0; 7,1$ Hz, H-2'a), 2,69 (ddd, 1H, $J = 13,8; 9,6; 5,3$ Hz, H-2'b), 2,78–2,93 (m, 2H, H-6), 4,02 (q, 2H, OCH₂CH₃), 4,83 (bs, 1H, OH), 6,59 (bdt, 1H, $J = 2,8; 1,0; 1,0$ Hz, H-4), 6,63 (bdd, 1H, $J = 8,4; 2,8$ Hz, H-2), 6,83 (m, 2H, H-3''), 7,08 (m, 2H, H-2''), 7,13 (dd, 1H, $J = 8,5; 1,1$ Hz, H-1); ¹³C NMR (150,9 MHz, CDCl₃) δ 14,87 (OCH₂CH₃), 17,70 (C-18), 25,48 (C-11), 26,57 (C-7), 29,32 (C-6), 33,25 (C-1'), 33,63 (C-15), 33,82 (C-12), 34,86 (C-2'), 35,91 (C-8), 42,72 (C-16), 44,48 (C-9), 47,20 (C-13), 52,77 (C-14), 63,42 (OCH₂CH₃), 112,69 (C-2), 114,44 (C-3''), 115,22 (C-4), 126,16 (C-1), 129,28 (C-2''), 132,33 (C-10), 133,55 (C-1''), 138,01 (C-5), 153,54 (C-3), 157,23 (C-4''), 221,46 (C-17); IČ (CHCl₃) ν 3598, 3098, 3060, 1729, 1611, 1583, 1512, 1502, 1453, 1441, 1245, 1042 cm⁻¹; HR-MS (APCI) vypočtená C₂₈H₃₅O₃ [M+H]⁺ 419,25807 nalezená 419,25810. R_f(4/l hexan/EtOAc) = 0,3.

Příklad 13: 3-hydroxy-15 β -(4-(*t*-butoxy)fenethyl)-estra-1,3,5(10)-trien-17-on (13)



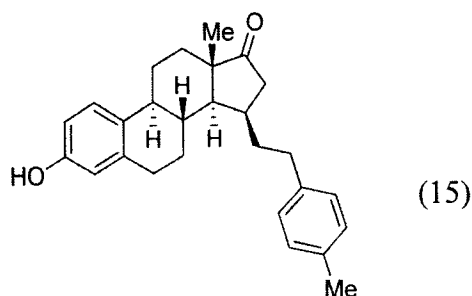
Látka **13** byla připravena podle výše uvedeného obecného postupu reakcí vinylestronu **2** s 4-t-butoxystyrenem (92 μ l). Po chromatografii na HPLC (30/70 AcCN/H₂O, t_R = 17 min) bylo získáno 94 mg bezbarvé pevné látky **13**: t_f 192 °C; $[\alpha]_D +62,5$ (c 0,208; CHCl₃); ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 1,02 (s, 3H, H-18), 1,35–1,49 (m, 2H, H-7a, 12a), 1,41 (t, 3H, J = 7,0 Hz, OCH₂CH₃), 1,50 (m, 1H, H-11a), 1,58–1,75 (m, 3H, H-1'a, 8, 14), 1,84–1,93 (m, 3H, H-1'b, 7b, 12b), 2,25 (m, 1H, H-9), 2,28–2,37 (m, 2H, H-11b, 15), 2,39 (dd, 1H, J = 19,4; 2,8 Hz, H-16a), 2,44 (dd, 1H, J = 19,4; 8,1 Hz, H-16b), 2,47 (ddd, 1H, J = 13,8; 9,0; 7,1 Hz, H-2'a), 2,69 (ddd, 1H, J = 13,8; 9,6; 5,3 Hz, H-2'b), 2,78–2,93 (m, 2H, H-6), 4,02 (q, 2H, OCH₂CH₃), 4,83 (bs, 1H, OH), 6,59 (bdt, 1H, J = 2,8; 1,0; 1,0 Hz, H-4), 6,63 (bdd, 1H, J = 8,4; 2,8 Hz, H-2), 6,83 (m, 2H, H-3"), 7,08 (m, 2H, H-2"), 7,13 (dd, 1H, J = 8,5; 1,1 Hz, H-1); ¹³C NMR (150,9 MHz, CDCl₃) δ 14,87 (OCH₂CH₃), 17,70 (C-18), 25,48 (C-11), 26,57 (C-7), 29,32 (C-6), 33,25 (C-1'), 33,63 (C-15), 33,82 (C-12), 34,86 (C-2'), 35,91 (C-8), 42,72 (C-16), 44,48 (C-9), 47,20 (C-13), 52,77 (C-14), 63,42 (OCH₂CH₃), 112,69 (C-2), 114,44 (C-3"), 115,22 (C-4), 126,16 (C-1), 129,28 (C-2"), 132,33 (C-10), 133,55 (C-1"), 138,01 (C-5), 153,54 (C-3), 157,23 (C-4"), 221,46 (C-17); IČ (CHCl₃) ν 3598, 3098, 3060, 1729, 1611, 1583, 1512, 1502, 1453, 1441, 1245, 1042 cm⁻¹; HR-MS (APCI) vypočtená C₂₈H₃₅O₃ [M+H⁺] 419,25807 nalezená 419,25810. R_f (4/1 hexan/EtOAc) = 0,3.

Příklad 14: 3-hydroxy-15 β -(4-(hydroxy)fenethyl)-estra-1,3,5(10)-trien-17-on (**14**)



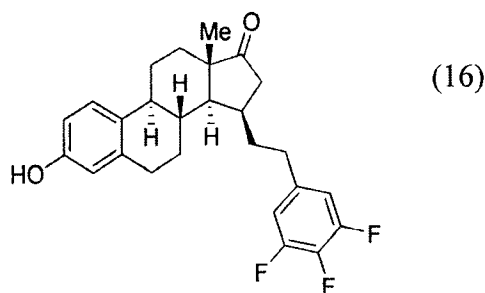
Látka **14** byla připravena podle výše uvedeného obecného postupu reakcí vinylestronu **2** s 4-vinylfenolem (59 mg). Po chromatografii na HPLC (30/70 AcCN/H₂O, t_R = 12 min) bylo získáno 37 mg bezbarvé pevné látky **14**: t_f 169 °C; $[\alpha]_D +79,1$ (c 0,283; CH₃OH); ¹H NMR (500 MHz, MeOD) δ 0,99 (s, 3H, H-18), 1,29 (s, 1H, H-7a), 1,34–1,47 (m, 2H, 11a, 12a), 1,57–1,68 (m, 3H, H-1', 8, 14), 1,75–1,89 (m, 3H, H-1'b, 7b, 12b), 2,17 (m, 1H, H-9), 2,25–2,33 (m, 2H, H-11b, 15), 2,34–2,40 (m, 2H, H-16), 2,42 (dt, 1H, J = 13,6, 7,9 Hz, H-2'a), 2,66 (ddd, 1H, J = 13,6; 8,5; 5,4 Hz, H-2'b), 2,74–2,80 (m, 2H, H-6), 6,49 (dm, 1H, J = 2,7 Hz, H-4), 6,53 (bdd, 1H, J = 8,5; 2,7 Hz, H-2), 6,71 (m, 2H, H-3"), 7,00 (m, 2H, H-2"), 7,04 (dd, 1H, J = 8,5; 1,1 Hz, H-1); ¹³C NMR (150,9 MHz, MeOD) δ 18,21 (C-18), 26,68 (C-11), 27,78 (C-7), 30,38 (C-6), 34,57 (C-15), 34,58 (C-1'), 35,09 (C-12), 35,69 (C-2'), 37,41 (C-8), 43,64 (C-16), 45,83 (C-9), 48,49 (C-13), 53,92 (C-14), 113,71 (C-2), 116,12 (C-4), 116,14 (C-3"), 126,91 (C-1), 130,54 (C-2"), 132,33 (C-10), 134,00 (C-1"), 138,76 (C-5), 156,11 (C-3), 156,52 (C-4"), 224,20 (C-17); IČ (KBr) ν 3370, 2926, 2855, 1716, 1612, 1583, 1514, 1450, 1441, 1376, 1356, 1217, 1170, 1099, 922, 827, 755, 731 cm⁻¹; HR-MS (APCI) vypočtená C₂₆H₃₁O₃ [M+H⁺] 391,22677 nalezená 391,22690. R_f (7/1 CHCl₃/MeOH) = 0,3.

Příklad 15: 3-hydroxy-15 β -(4-(methyl)fenethyl)-estra-1,3,5(10)-trien-17-on (**15**)

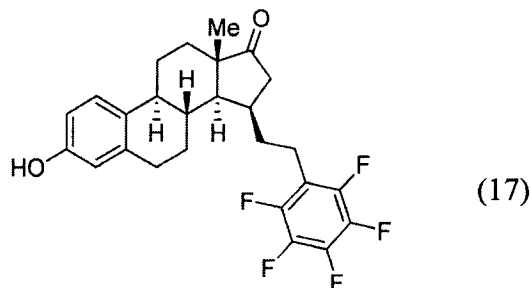


Látka **15** byla připravena podle výše uvedeného obecného postupu reakcí vinylestronu **2** s 4-methylstyrenem (64 μ l). Po chromatografii na HPLC (35/65 AcCN/H₂O, t_R = 36 min) bylo získáno 25 mg bezbarvé pevné látky **15**: t_f 159 °C; $[\alpha]_D$ -13,9 (c 0,170; CHCl₃); ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 1,02 (s, 3H, H-18), 1,36–1,55 (m, 3H, H-7a, 11a, 12a), 1,64 (dddd, 1H, J = 13,6; 11,7; 9,2; 5,3 Hz, H-1'a), 1,66–1,76 (m, 2H, H-8, 14), 1,86–1,95 (m, 3H, H-1'b', 7b, 12b), 2,25 (m, 1H, H-9), 2,33 (s, 3H, CH₃-Ph), 2,30–2,34 (m, 2H, H-11b, 15), 2,37–2,46 (m, 2H, H-16), 2,49 (ddd, 1H, J = 13,7; 9,2; 6,9 Hz, H-1'a), 2,71 (ddd, 1H, J = 13,7; 9,8; 5,3 Hz, H-1'b), 2,80–2,94 (m, 2H, H-6), 4,68 (s, 1H, OH), 6,59 (dm, 1H, J = 2,8 Hz, H-4), 6,63 (dd, 1H, J = 8,5; 2,8 Hz, H-2), 7,07 (m, 2H, H-2''), 7,11 (m, 2H, H-3''), 7,13 (dd, 1H, J = 8,5; 1,0 Hz, H-1); ¹³C NMR (150,9 MHz, CDCl₃) δ 17,73 (C-18), 21,01 (CH₃-Ph), 25,51 (C-11), 26,62 (C-7), 29,34 (C-6), 33,22 (C-1'), 33,81 (C-15), 33,85 (C-12), 35,40 (C-2'), 35,95 (C-8), 42,72 (C-16), 44,52 (C-9), 47,20 (C-13), 52,81 (C-14), 112,71 (C-2), 115,23 (C-4), 126,20 (C-1), 128,29 (C-2''), 129,15 (C-3''), 132,41 (C-10), 135,54 (C-4''), 138,05 (C-5), 138,58 (C-1''), 153,51 (C-3), 221,34 (C-17); IČ (KBr) ν 3382, 1734, 1719, 1584, 1514, 1501, 1443, 708 cm⁻¹; HR-MS (APCI) vypočtená C₂₇H₃₃O₂ [M+H]⁺ 389,24751 nalezená 389,24751. R_f (4/1 hexan/EtOAc) = 0,3.

Příklad 16: 3-hydroxy-15β-(3,4,5-(trifluor)fenethyl)-estra-1,3,5(10)-trien-17-on (**16**)



Látka **16** byla připravena podle výše uvedeného obecného postupu reakcí vinylestronu **2** s 3,4,5-trifluorstyrenem (77 mg). Po chromatografii na HPLC (30/70 AcCN/H₂O, t_R = 21 min) bylo získáno 8 mg bezbarvé pevné látky **16**: t_f 182 °C; $[\alpha]_D$ +48,3 (c 0,118; CHCl₃); ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 1,03 (s, 3H, H-18), 1,39–1,56 (m, 3H, H-7a, 11a, 12a), 1,57–1,77 (m, 3H, H-1'a, 8, 14), 1,81–1,96 (m, 3H, H-1'b', 7b, 12b), 2,21–2,40 (m, 3H, H-11b, 9, 15), 2,36 (dd, 1H, J = 19,3; 2,2 Hz, H-16a), 2,46 (dd, 1H, J = 19,3; 8,9 Hz, H-16b), 2,48 (ddd, 1H, J = 14,0; 9,3; 7,0 Hz, H-2'a), 2,69 (ddd, 1H, J = 14,0; 9,7; 5,1 Hz, H-2'b), 2,82–2,95 (m, 2H, H-6), 4,86 (bs, 1H, OH), 6,60 (d, 1H, J = 2,8 Hz, H-4), 6,64 (dd, 1H, J = 8,4; 2,7 Hz, H-2), 6,78 (m, 2H, H-2''), 7,13 (bd, 1H, J = 8,4 Hz, H-1); ¹³C NMR (150,9 MHz, CDCl₃) δ 17,73 (C-18), 25,41 (C-11), 26,66 (C-7), 29,20 (C-6), 32,60 (C-1'), 33,56 (C-15), 33,79 (C-12), 35,08 (C-2'), 35,86 (C-8), 42,43 (C-16), 44,42 (C-9), 47,16 (C-13), 52,65 (C-14), 112,19 (dd, J^{C-F} = 15,9; 4,7 Hz, C-2''), 112,78 (C-2), 115,23 (C-4), 126,14 (C-1), 132,14 (C-10), 137,77 (C-1''), 137,82 (C-5), 138,16 (dt, J^{C-F} = 249,4; 15,2 Hz, C-4''), 151,10 (ddd, J^{C-F} = 249,6; 9,8; 3,9 Hz, C-3''), 153,65 (C-3), 220,74 (C-17); ¹⁹F NMR (470,3 MHz, CDCl₃) δ -160,47 (t, 1F, J^{C-F} = 20,5 Hz), -131,13 (d, J^{C-F} = 20,5 Hz); IČ (KBr) ν 3295, 1718, 1620, 1585, 1529, 1501, 1376 cm⁻¹; HR-MS (APCI) vypočtená C₂₆H₂₈O₂F₃ [M+H]⁺ 429,20259 nalezená 429,20349. R_f (4/1 hexan/EtOAc) = 0,3.

Příklad 17: 3-hydroxy-15 β -(2,3,4,5,6-(pentafluor)fenethyl)-estra-1,3,5(10)-trien-17-on (17)

Látka **17** byla připravena podle výše uvedeného obecného postupu reakcí vinylestronu **2** s 2,3,4,5,6-pentafluorstyrenem (67 μ l). Po chromatografii na HPLC (35/65 ACCN/H₂O, t_R = 42 min) bylo získáno 27 mg bezbarvé pevné látky **17**: t_f 151 °C; $[\alpha]_D^{25} +43,7$ (c 0,544; CHCl₃); ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 1,00 (s, 3H, H-18), 1,41–1,55 (m, 3H, H-7a, 11a, 12a), 1,61 (m, 1H, H-1a'), 1,69 (m, 1H, H-8), 1,74 (m, 1H, H-14), 1,85–1,95 (m, 3H, H-1b', 7b, 12b), 2,27 (m, 1H, H-9), 2,30–2,39 (m, 2H, H-11b, 15), 2,43 (dd, 1H, J = 19,4; 2,4 Hz, H-16a), 2,51 (dd, 1H, J = 19,4, 8,6 Hz, H-16b), 2,67 (m, 1H, H-2a'), 2,79 (m, 1H, H-2b'), 2,83–2,96 (m, 2H, H-6), 4,93 (bs, 1H, OH), 6,60 (bd, 1H, J = 2,8 Hz, H-4), 6,64 (dd, 1H, J = 8,4; 2,8 Hz, H-2), 7,13 (bd, 1H, J = 8,4 Hz, H-1); ¹³C NMR (150,9 MHz, CDCl₃) δ 17,63 (C-18), 22,19 (C-2'), 25,43 (C-11), 26,56 (C-7), 29,19 (C-6), 30,80 (C-1'), 33,74 (C-12), 33,96 (C-15), 35,86 (C-8), 42,34 (C-16), 44,40 (C-9), 47,12 (C-13), 52,61 (C-14), 112,77 (C-2), 114,44 (bt, J^{C-F} = 18,8 Hz, C-1"), 115,23 (C-4), 126,16 (C-1), 132,10 (C-10), 137,46 (dm, J^{C-F} = 250,4 Hz, C-3"), 137,87 (C-5), 139,68 (dm, J^{C-F} = 251,7 Hz, C-4"), 144,97 (dm, J^{C-F} = 243,2 Hz, C-2"), 153,63 (C-3), 220,53 (C-17); ¹⁹F NMR (470,3 MHz, CDCl₃) δ -158,78 (m, 2F, F-3"), -153,61 (t, 1F, F-4"), -141,15 (m, 2F, F-2"); IČ (CHCl₃) ν 3599, 1732, 1657, 1611, 1585, 1521, 1504, 1440, 1378, 1122, 1068, 963 cm⁻¹; HR-MS (APCI) vypočtená C₂₆H₂₆O₂F₅ [M+H⁺] 465,18475 nalezená 465,18468. R_f (4/1 hexan/EtOAc) = 0,3.

Výsledky testování

Příklad 18: Stanovení míry inhibice enzymové aktivity 17 β HSD vyvolané působením testovaných sloučenin

Inhibiční aktivita testovaných látek byla stanovena pro jednotlivé izoenzymy rodiny 17 β HSD, konkrétně se jednalo o typy 1, 2, 3, 4, 5 a 7. Pro rekombinantní expresi jednotlivých izoenzymů lidské 17 β HSD bylo použito expresních systémů *Escherichia coli* a savčích buněk. Pouze v případě 17 β HSD5 byl enzym částečně purifikován, a pro testování byl použit supernatant, získaný centrifugací bakteriálního lyzátu. Systémy, exprimující konkrétní typ 17 β HSD, byly suspendovány v reakčním pufru a inkubovány s tritiem značenými substráty a příslušnými kofaktory při teplotě 37 °C ve dvou souběžných testech, v kontrolním uspořádání (absence inhibitoru) a v testovacím uspořádání. DMSO slouží v tomto případě jako negativní kontrola (Schéma 11). Poté, co bylo v kontrolním testu 20 až 30 % substrátu přeměněno činností enzymu na produkt, byly oba testy ukončeny. Substrát a produkt z testovacího uspořádání byly izolovány pomocí SPE (extrakce na pevné fázi) a následně separovány pomocí HPLC na reverzní fázi. Konverze substrátu byla určena pomocí integrace signálů substrátu a produktu a byla vyjádřena v %. Pro účely následujícího výpočtu inhibice enzymu byla konverze kontrolního testu zvolena jako 0 % inhibice. Všechny testy byly provedeny v triplicátech. Hodnoty IC₅₀ byly poté určeny standardní metodou pomocí "One Ligand Binding" modelu modulu SigmaPlot kinetics (Schustera *et. al. J. Ster. Biochem. Mol. Biol.* **2011**, 125, 148; Möller *et. al. Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, 19, 6740; Möller *et. al. PLoS One*, **2010**, 5, 6, e 10969).

Testované látky vykazaly vysokou inhibiční aktivitu vůči lidské 17 β HSD typu 1 a obvykle také 17 β HSD typu 5. Jedná se o velmi potentní inhibitory při koncentracích látek v testu jak 1 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, tak i 0,1 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Inhibiční aktivita testovaných derivátů vyjádřená v % inhibice lidské 17 β HSD typu 1 a 5 při různých koncentracích testovaných látek je shrnuta v tabulce 1. Dva nejúčinnější deriváty jsou v tabulce 1 zvýrazněny.

Aktivita ostatních zkoumaných izoenzymů – 17 β HSD typu 2, 3, 4 a 7 – nebyla přítomností látek při koncentraci 1 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ v testech vůbec ovlivněna. Jedná se proto o zcela selektivní inhibitory 17 β HSD1 a 17 β HSD5. Látka 2 inhibuje exkluzivně pouze izoenzym 17 β HSD1, současně však vykazuje i částečnou estrogenicitu.

Tabulka 1. Inhibiční aktivita vybraných derivátů vyjádřená v % inhibice lidské 17 β HSD typu 1 a 5 při různých koncentracích testovaných látek.

č.d.	17 β HSD1			17 β HSD5
	0,1 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$	1 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$	IC ₅₀ (nmol·l ⁻¹)	1 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$
2	79	95	17	7
3	66	83	50	60
4	68	91	42	89
5	72	92	55	70
6	90	97	9	90
7	84	99	16	63
8	77	92	18	76
9	91	100	10	91
10	72	87	ns	ns
11	36	67	ns	ns
12	85	88	ns	ns
13	62	80	ns	ns
14	72	97	ns	ns
15	87	100	8	86
16	67	95	36	79
17	56	90	ns	ns

ns: nebylo stanoveno; č.d: číslo derivátu.

Příklad 19: Stanovení aktivity sloučenin na steroidních receptorech ER α a AR v buněčných luciferázových reportérových testech.

Vliv nově připravených látek na aktivitu steroidních receptorů, estrogeního receptoru α (ER α) a androgeního receptorů (AR), byl ověřen *in vitro* pomocí selektivních luciferázových reportérových testů založených na buněčných reportérových liniích pro ER α a AR v U2OS buňkách (Sedlák *et al.* *Comb. Chem. High T. Scr.* **2011**, *14*, 248). Tyto buněčné linie byly

vytvořeny vnesením expresního vektoru s kódující sekvencí pro konkrétní lidský steroidní receptor a reportérového vektoru pGL4 (Promega, USA), obsahujícího responsivní elementy pro konkrétní steroidní receptor v promotoru, řídícím expresi luciferázového genu. Buňky, které oba vektory stabilně integrovaly do genomu, byly izolovány pomocí selekčního média obsahujícím hygromycin a G418 (aminoglykosid Geneticin®). Z takto selektované buněčné kultury byly dále izolovány klony buněk, poskytující optimální odpověď při testování s referenčními ligandy pro daný steroidní receptor.

Reportérové linie U2OS byly pěstovány v médiu DMEM (Thermo Fisher Scientific, katalogové číslo 11880–036) bez fenolové červeně s přidavkem 10% FBS (Thermo Fisher Scientific, katalogové číslo 10270–106), 2 mmol·l⁻¹ Glutamax (Thermo Fisher Scientific, katalogové číslo 35050061) a roztoku penicilinu a streptomycinu (Thermo Fisher Scientific, katalogové číslo 15070063). Buňky byly inkubovány v prostředí s 5% CO₂, při teplotě 37 °C. Dva dny před testováním sloučenin bylo vyměněno růstové médium za DMEM bez fenolové červeně, s přidavkem 2 mmol·l⁻¹ Glutamax a 4% FBS zbaveného lipofilních složek (včetně endogenních ligandů steroidních receptorů) (Hyclone, GE Healthcare Life Sciences, USA). Dva dny po výměně média byly buňky sklizeny, spočítány a resuspendovány v médiu stejného složení v koncentraci 0,5 x 10⁶/ml. Buněčná suspenze byla dávkově přenesena do 1536jamkových bílých destiček s úpravou pro kultivaci adherentních buněk (Corning Inc., NY, USA). Do každé jamky byly vneseny 4 µl buněčné suspenze odpovídající 2500 buněk. Testované sloučeniny byly naředěny v DMSO a přeneseny do jamek k buňkám pomocí bezkontaktního akustického dávkovače sloučenin Echo 520 (Labcyte). Testování bylo provedeno v 10 koncentračních bodech v rozsahu od 10 µmol·l⁻¹ do 1 nmol·l⁻¹, v triplicátech. Experiment byl proveden ve dvou modech. V agonistickém modu byly stanoveny agonistické vlastnosti testovaných látek, v antagonistickém modu byly detekovány antagonistické vlastnosti. V antagonistickém modu bylo k testovaným vzorkům 30 min po přenosu testovaných látek přidáno 0,5 µl roztoku agonisty. Pro ERα byl použit roztok 1 nmol·l⁻¹ E2, pro AR 1 nmol·l⁻¹ dihydrotestosteronu. Pro rozpuštění agonistů bylo použito růstové médium pro buňky.

Luciferázová aktivita byla stanovena komerčním kitem Britelite plus luciferase reportér gene assay reagent (Perkin Elmer, USA), 24 h po přidání sloučenin k buňkám. Intenzita luminescence byla změřena na multimode spektrofotometru Envision (PerkinElmer).

V rozsahu uvažovaných terapeutických koncentrací látky nemají estrogení účinek. Vybrané látky vykazují dokonce vlastnosti ER/AR antagonistů. Látky **3, 4 a 7** jsou antagonisty ER; látka **9** je antagonist AR a látky **11, 12 a 13** jsou antagonisty obou typů receptorů (ER i AR).

Příklad 20: Stanovení cytotoxicity sloučenin v buněčné linii U2OS

Pro oddělení antagonistické aktivity testovaných sloučenin od cytotoxického efektu na U2OS buňkách (buněčná linie odvozená z osteosarkomu) byl paralelně s reportérovým testem proveden experiment pro stanovení buněčné viability. Původní, geneticky nemodifikované U2OS buňky byly pěstovány za stejných podmínek jako reportérové buňky. Tyto buňky byly dále zpracovány a inkubovány se sloučeninami zcela identickým způsobem a po stejnou dobu jako buňky v reportérovém testu. Na konci experimentu bylo stanoveno množství ATP pomocí luciferázového homogenního testu BriteLite jako míra buněčné viability. Data byla poté zpracována spolu s daty z reportérových testů.

Tento orientační test cytotoxicity byl proveden pro všechny připravené látky a jeho výsledky ukázaly, že žádný z připravených derivátů nevykazuje cytotoxické vlastnosti do koncentrace 20 pmol·l⁻¹ testovaných sloučenin.

Příklad 21: Stanovení cytotoxicity sloučenin na nádorových a nenádorových buňkách

K hodnocení protinádorové účinnosti byly použity referenční látky **5, 6, 7, 9, 14 a 15**. V *in vitro* podmínkách byl použit cytotoxický MTT test na buněčných liniích derivovaných z normálních tkání i nádorů. Konkrétně se jednalo o linii K562 (lidská myeloidní leukémie), K562-Tax (lidská myeloidní leukémie rezistentní na taxol a overexprimující protein mnohočetné lékové rezistence PgP), CEM (T-lymfoblastická leukémie), CEM-DNR-bulk (T-lymfoblastická leukémie rezistentní na doxorubicin, postrádající expresi cílového genu pro inhibitory topoizomerázy II alfa), linie A549 (lidský adenokarcinom plic), HCT116p53 wt (lidská rakovina tlustého střeva), HCT116p53-/- (lidská rakovina tlustého střeva, mutant p53), linie lidského osteosarkomu U2OS a dvě fibroblastové linie BJ a MRC5 jako příklady nenádorových buněk. Expresní charakteristiky, profily vnímavosti na klasická protinádorová léčiva i metodologie cytotoxického MTT testu byly opakovaně publikovány (např. Nosková *et al.* *Neoplasma* **2002**, 49, 418; Šarek *et al.* *J. Med. Chem.* **2003**, 46, 25, 5402).

Látky v testech nevykazovaly významnou cytotoxicitu na nádorových nebo nenádorových buněčných liniích různého histogenetického původu, což ukazuje na absenci off-target protinádorového účinku. Výsledky testů shrnuje tabulka 2.

Tabulka 2. *In vitro* cytotoxicita látek (IC_{50} , $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) testovaná na buněčných liniích nádorového i nenádorového původu.

	CEM		CEM-DNR-bulk		K562		K562-Tax		A549	
č.d.	IC_{50}	σ	IC_{50}	σ	IC_{50}	σ	IC_{50}	σ	IC_{50}	σ
5	25,16	3,80	28,24	1,79	25,25	4,68	19,31	2,44	35,76	4,48
6	16,34	0,90	24,61	2,29	26,89	4,88	13,21	1,72	35,75	3,48
7	25,56	4,97	32,81	3,78	>50,00	0,00	12,49	2,76	>50,00	0,00
9	21,36	3,53	22,14	3,48	27,70	5,71	9,12	0,96	40,98	3,48
14	25,81	3,63	30,76	2,85	22,60	3,20	18,89	1,59	41,32	3,33
15	21,67	2,82	24,10	1,95	23,80	3,25	13,80	1,73	28,21	3,90

	HCT116p53 wt		HCT116p53-/-		U2OS		BJ		MRC5	
č.d.	IC_{50}	σ	IC_{50}	σ	IC_{50}	σ	IC_{50}	σ	IC_{50}	σ
5	29,19	3,33	30,47	2,73	30,38	3,70	24,26	2,89	18,37	3,11
6	29,34	1,97	30,80	2,13	27,88	3,18	28,81	3,76	21,00	1,83
7	>50,00	0,00	>50,00	0,00	>50,00	0,00	>50,00	0,00	>50,00	0,00
9	29,38	3,33	35,73	0,54	45,32	2,86	>50,00	0,00	>50,00	0,00
14	28,22	2,90	32,57	2,14	44,59	4,38	50,00	0,00	50,00	0,00
15	28,27	1,50	29,35	1,88	28,90	2,34	27,93	1,62	19,55	3,58

σ : směrodatná odchylka.

Příklad 22: Stanovení inhibice 17 β HSD v buňkách *in vitro*

Účinek látek na inhibici 17 β HSD v buněčných liniích derivovaných z hormonálně aktivních nádorů MCF-7 (lidský karcinom prsu transfekovaný lidskou 17 β HSD1) a CHO (křečci karcinom ovaria transfekovaný lidskou 17 β HSD1) byl sledován prostřednictvím kumulace prekursoru

17 β HSD, hormonu E1, v supernatantu buněčných linií v časovém intervalu 8 a 24 hodin. Pro tento experiment byly použité necytotoxické koncentrace derivátů estronu ($10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$). Hladiny E1 byly stanovené imunoenzymaticky.

- 5 Přidání estronových derivátů k 17 β HSD1 transfekovaným buněčným kulturám hormonálně aktivních/dependentních nádorů *in vitro* vedlo již do 8 hodin k významnému zvýšení hladiny E1, který je substrátem enzymu 17 β HSD. Toto pozorování je konzistentní s inhibicí 17 β HSD *in vitro*. Výsledky analýzy inhibice 17 β HSD na buněčných liniích *in vitro* shrnuje tabulka 3.

10

Tabulka 3. Výsledky analýzy inhibice 17 β HSD na buněčných liniích *in vitro*

	MCF-7		CHO	
	8 hod.	24 hod.	8 hod.	24 hod.
č.d.	E1 (pg/ml)	E1 (pg/ml)	E1 (pg/ml)	E1 (pg/ml)
kontrola	564	543	745	482
5	3373	2236	3194	1576
6	4251	3323	4137	1804
7	1921	1839	2101	1476
9	1300	1182	1171	739
14	4298	2626	3179	1054
15	719	948	750	554

Kontrola: buněčné linie netransfekované 17 β HSD1.

15

Příklad 23: Stanovení inhibice lidské 17 β HSD *in vivo*

- K hodnocení biologické aktivity látek *in vivo* bylo využito měření poklesu tvorby E2 v plazmě myši léčených kandidátní látkou **9**. Pro tento účel byly použity samice outbredního kmene myši NMRI ve věku 8 týdnů. Tyto zvířata byla léčená po dobu 7 nebo 14 dnů látkou **9** rozpuštěnou v olejovém vehikulu (olivový olej) perorálně gastrickou sondou, 1x denně, v dávce 20 mg/kg váhy myši v celkovém objemu 0,1 ml. Paralelně bylo kontrolní skupině zvířat aplikováno vehikulum samotné. Po 7, respektive 14 dnech byl provedený odběr krve za účelem zpracování krevní plazmy a analýzy hladin E2. Paralelně byla provedená pitva a makroskopické zhodnocení jednotlivých orgánů.

- Podávání látky bylo zvířaty dobře tolerováno, nebyl pozorován signifikantní pokles hmotnosti a makroskopická analýza orgánů neodhalila žádnou zjevnou patologii. Plazma léčených i kontrolních zvířat byla podrobena imunoenzymatické analýze na kvantifikaci E2. Tato analýza prokázala podstatnou a vysoce signifikantní redukci hladiny hormonu E2 po 14-denním podávání, což je konzistentní s inhibicí 17 β HSD *in vivo* (tabulka 4).

Tabulka 4. Inhibice produkce E2 po podání látky 9 *in vivo* v plazmě experimentálních zvířat.

Vehikulum 7 dní	E2 (pg/ml)	Vehikulum 14 dní	E2 (pg/ml)
Myš B_1	4660	Myš D_1	5447
Myš B_2	4988	Myš D_2	5991
Myš B_3	4570	Myš D_3	4796
Myš B_4	6835	Myš D_4	4973
Myš B_5	6202	průměrná hodnota± σ	5302±2416
Myš B_6	6372		
Myš B_7	4824		
průměrná hodnota± σ	5632±950,1		

látka 9:7 dní 20 mg/kg denně	E2 (pg/ml)	látka 9:14 dní 20 mg/kg denně	E2 (pg/ml)
Myš A_1	4927	Myš C_1	6020
Myš A_2	4357	Myš C_2	2668
Myš A_3	6020	Myš C_3	2657
Myš A_4	7379	Myš C_4	3566
Myš A_6	5857	Myš C_5	4312
Myš A_7	5617	Myš C_6	4025
průměrná hodnota± σ	5693±1034,7	průměrná hodnota± σ	3874±1253,2
P	0,362	P	0,019

P: hodnota statistické významnosti; σ: směrodatná odchylka

5

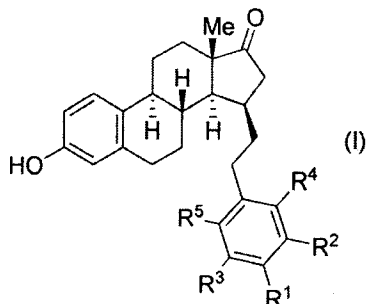
Průmyslová využitelnost

Sloučeniny podle vynálezu mohou být využity k diagnostice a případně i k léčbě estrogen–dependentních onemocnění, především estrogen–dependentních typů nádorů, endometriózy, kožních chorob či poruch pohlavního dospívání. Látky mohou najít uplatnění i při léčbě neplodnosti, k navození předčasné menopauzy, hormonální kastraci, nebo jako antikoncepce.

Mezi estrogen–dependentní onemocnění se řadí rakovina prsu, rakovina vaječníků, rakovina dělohy, endometrióza, adenomyóza, menoragie, metroragie, dysmenorea, děložní myomy, syndrom polycystických ovarií, fibrocystická nemoc prsu, rakovina prostaty, nemalobuněčný karcinom plic (NSCLC), spinocelulární karcinom, kolorektální karcinom, karcinom žaludku, akné, hirsutismus, pseudohermafroditismus, seboroická dermatitida, androgeny vyvolaná alopecie, hyperestrogenismus.

PATENTOVÉ NÁROKY

- 5 1. 15 β -substituované deriváty estronu obecného vzorce I,



kde:

10

substituenty R¹, R², R³, R⁴, R⁵ jsou nezávisle na sobě zvoleny ze skupiny zahrnující: C₁–C₄ alkyl, C₁–C₄ alkoxy, C₁–C₄ halogenalkyl, halogen, COOR⁶, kde R⁶ je C₁–C₄ alkyl; H, OH;

15

popřípadě jsou R³, R⁴ a R⁵ každý tvořen vodíkovým atomem a současně R¹ a R² spolu tvoří aryl, výhodně naftyl;

přičemž aromatický kruh v poloze C–15 může být uvedenými substituenty R¹ až R⁵ mono-, di-, tri-, tetra- i penta-substituovaný.

20

2. Způsob výroby sloučenin obecného vzorce I podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že v prvním kroku se k roztoku 3-(*t*-butyldimethylsilyloxy)-15 β -vinylestra-1,3,5(10)-trien-17-onu **2** a příslušného druhého olefinu ve směsi rozpouštědel CH₂Cl₂/trifluorotoluen v objemovém poměru 2/1 přidá rutheniový katalyzátor Hoveyda–Grubbs druhé generace a CuI v inertní atmosféře argonu, výsledná směs se nejprve míchá při teplotě 40 až 70 °C po dobu 4 až 12 h a po
- 25 dalším přidavku příslušného druhého olefinu a katalyzátoru při stejné teplotě přes noc; poté se reakce ukončí odpařením rozpouštědel za sníženého tlaku a chromatografií na silikagelu se získají příslušné produkty zkřížené metatéze;

30

ve druhém kroku se k produktu metatéze, rozpuštěnému v tetrahydrofuranu, postupně za teploty místnosti přikape 1 mol·l⁻¹ roztok tetrabutylammonium fluoridu v tetrahydrofuranu, po 1 h se přidá voda a reakční směs se extrahuje CH₂Cl₂ a/nebo CHCl₃; spojené organické fáze se pak promyjí nasyceným roztokem NaCl, vysuší pomocí MgSO₄ a rozpouštědla se odstraní za sníženého tlaku, přičemž ochráněné produkty se izolují chromatografií na silikagelu; a

35

ve třetím kroku se baňka s roztokem ochráněného produktu metatéze v ethylacetátu a katalyzátoru Pd/C v množství 10 % hmotnostních za vydatného míchání evakuuje a posléze se naplní vodíkem, reakční směs se pak míchá přes noc, následně se přefiltruje přes filtrační křemelinu SiO₂ a po odstranění rozpouštědla za sníženého tlaku se vysoce účinnou chromatografií získají finální krystalické produkty.

40

3. Způsob výroby podle nároku 2, **vyznačující se tím**, že výsledná směs v kroku 1 se nejprve míchá při teplotě 65 °C po dobu 4 hodin před přidavkem olefinu a katalyzátoru.

4. Sloučeniny obecného vzorce I podle nároku 1 pro použití jako léčivo.

45

5. Sloučeniny obecného vzorce I podle nároku 1 pro použití k diagnostice a léčení estrogen–dependentních onemocnění.
6. Farmaceutický prostředek obsahující jako aktivní složku sloučeniny obecného vzorce I podle nároku 1.
7. Farmaceutický prostředek obsahující sloučeniny obecného vzorce I podle nároku 1 pro použití k diagnostice a léčení estrogen–dependentních onemocnění a poruch.
8. Farmaceutický prostředek obsahující sloučeniny obecného vzorce I podle nároku 1 pro použití k diagnostice a léčení estrogen–dependentních onemocnění, kterými jsou rakovina prsu, rakovina vaječníků, rakovina dělohy, endometrióza, adenomyóza, menoragie, metroragie, dysmenorea, děložní myomy, syndrom polycystických ovarií, fibrocystická nemoc prsu, rakovina prostaty, nemalobuněčný karcinom plic (NSCLC), spinocelulární karcinom, kolorektální karcinom, karcinom žaludku, akné, hirsutismus, pseudohermafroditismus, seboroická dermatitida, androgeny vyvolaná alopecie, hyperestrogenismus, k léčení neplodnosti, k navození předčasné menopauzy, k hormonální kastraci, nebo pro použití jako antikoncepce.
9. Použití sloučenin obecného vzorce I podle nároku 1 k výrobě farmaceutického prostředku pro diagnostiku a léčení estrogen–dependentních onemocnění, kterými jsou rakovina prsu, rakovina vaječníků, rakovina dělohy, endometrióza, adenomyóza, menoragie, metroragie, dysmenorea, děložní myomy, syndrom polycystických ovarií, fibrocystická nemoc prsu, rakovina prostaty, nemalobuněčný karcinom plic (NSCLC), spinocelulární karcinom, kolorektální karcinom, karcinom žaludku, akné, hirsutismus, pseudohermafroditismus, seboroická dermatitida, androgeny vyvolaná alopecie, hyperestrogenismus, k léčení neplodnosti, k navození předčasné menopauzy, k hormonální kastraci, nebo pro použití jako antikoncepce.

Konec dokumentu
