

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: 2020-579
(22) Přihlášeno: 23.10.2020
(40) Zveřejněno: 04.05.2022
(Věstník č. 18/2022)
(47) Uděleno: 27.09.2023
(24) Oznámení o udělení ve věstníku: 08.11.2023
(Věstník č. 45/2023)

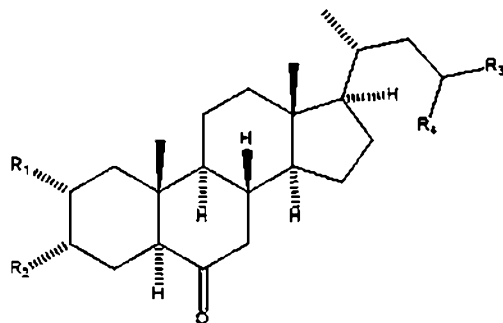
C07J 9/00 (2006.01)
C07J 11/00 (2006.01)
A61K 31/575 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)

(56) Relevantní dokumenty:
YANG, Ya-Xi, a kol. Synthesis of 5 α -cholestan-6-one derivatives and their inhibitory activities of NO production in activated microglia: Discovery of a novel neuroinflammation inhibitor. Bioorganic & medicinal chemistry letters, 2014, 24.4: 1222-1227, ISSN: 0960-894X; ISMAILI, Jihane, a kol. Brassinosteroids and analogs as neuroprotectors: Synthesis and structure-activity relationships. Steroids, 2012, 77.1-2: 91-99, ISSN: 0039-128X. WO 2013036835 A1; WO 2009024103 A2.

(73) Majitel patentu:
Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc, CZ
(72) Původce:
RNDr. Miroslav Kvasnica, Ph.D., Olomouc, Povel, CZ
Mgr. Gabriel Gonzalez, Vrbátky, CZ
Bc. Veronika Górová, Olšany u Prostějova, CZ
prof. Ing. Miroslav Strnad, CSc., DSc., Olomouc, Neředín, CZ
(74) Zástupce:
HARBER IP s.r.o., Dukelských hrdinů 567/52, 170 00 Praha 7, Holešovice

(54) Název vynálezu:
Sterolové deriváty, přípravky obsahující tyto deriváty a jejich použití

(57) Anotace:
Neurosterolové deriváty obecného vzorce I odvozené od brassinosteroidů, jejich použití pro léčbu neurodegenerativních chorob, zejména při léčbě a profylaxi Parkinsonovy choroby a Alzheimerovy choroby, a farmaceutické přípravky obsahující tyto deriváty.



Sterolové deriváty, přípravky obsahující tyto deriváty a jejich použití

Oblast techniky

Vynález se týká nových sterolových derivátů odvozených od rostlinných hormonů brasinosteroidů, jejich použití při ochraně proti buněčnému poškození a buněčné toxicitě, a přípravků obsahujících tyto deriváty.

Dosavadní stav techniky

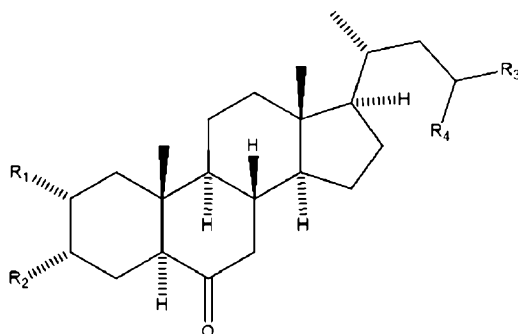
Parkinsonova choroba (PD) je druhé nejčastější a motoricky související neurodegenerativní onemocnění, s předpokládaným nárůstem v diagnostikovaných případech dosahujícím až 12 milionů pacientů do roku 2040 (Dorsey et al. J. Parkinson's Dis. 2018, 8, S3). PD je charakterizována motorickými příznaky spojenými se specifickou degenerací a ztrátou přibližně 30 až 70 % dopaminergních neuronů v substantia nigra pars compacta a jejich projekcemi na striatum (Rizek et al. CMAJ 2016, 188, 1157). Mezi mnoho molekulárních znaků PD patří zvýšený oxidační a nitrosativní stres (OS a NS), dysfunkce mitochondrií, excitotoxicita, dysfunkce ubikvitin/proteazomálního systému (UPS) a neurozánět (Dantuma a Bott, Front. Mol. Neurosci 2014, 7; Cookson a Bandmann, Human Mol Gen 2010, 19, R21). Vzhledem k nedostatku účinné a nejen symptomatické léčby PD je vývoj léčiv zaměřen na látky s účinným léčebným účinkem na degenerativní procesy PD. Jedním ze zdrojů jsou přírodní sloučeniny, které mají tendenci vykazovat méně vedlejších účinků.

Bioaktivní molekuly spojené s Parkinsonovou chorobou, zejména panaxatriolové saponiny z *Panax notoginseng*, vykazovaly dostatečnou neuroprotektici proti 1-methyl-4-fenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridinem (MPTP) indukované smrti PD neuronů a zhoršení chování *in vivo* (Luo a kol., J. Ethnopharmacol. 2011, 133, 448). Dalším příkladem jsou ginsenosidy, steroidní sloučeniny, které vykazovaly neuroprotektivní aktivitu v MPTP modelu PD. Také zvyšovaly hladiny DA ve striatu a substantia nigra modulací exprese několika genů (Bcl-2, Bcl, Bax, kaspáza 3 a tyrosinhydroxyláza) (Wang et al., Neurochem. Int. 2009, 54, 43). Zatímco kurkumin je jedním ze silných koření, které má široké spektrum antioxidačních a neuroprotektivních aktivit zodpovědných za anti-PD aktivity, jeho syntetický derivát kurkumin glukosid byl ještě účinnější, protože byl schopen inhibovat agregaci a toxicitu α -synukleinu způsobem závislým na dávce, bylo prokázáno snížení apoptózy (kaspáza 3 a 9), oxidačního stresu a mitochondriální dysfunkce v buňkách A53T α -synuklein PC12 (Liu a kol., Pharmacol. Res. 2011, 63, 439). Dalším zdrojem terapie modifikující PD na bázi rostlin je *Mucuna pruriens*, rostlinný druh bohatý na antioxidanty přírodního původu, jako je koenzym Q-10 (Co-Q10) a L-DOPA. Aplikace přirozené formy L-DOPA ve formě semen *Mucuna pruriens* prokázala účinnost při zlepšování symptomů PD, ale s lepším farmakokinetickým profilem než tradiční forma L-DOPA (Bega a Zadikoff, J. Mov. Dis. 2014, 7, 57). Konečně Co-Q10 a kreatin byly jedněmi z nejvíce studovaných přírodních sloučenin pro léčbu PD. Co-Q10 vykazoval širokou neuroprotektivní aktivitu v modelech PD založených na paraquat, rotenonu, 1-methyl-4-fenylpyridiniu (MPP+) a MPTP. Bylo také zjištěno, že zlepšují symptomy PD v preklinické studii na primátech a v několika klinických studiích (Shults a kol., Arch. Neur. 2002, 59, 1541; Exp. Neurol. 2004, 188, 491).

Předmětem předkládaného vynálezu je proto poskytnout novou generaci derivátů neurosterolů, které vykazují silné a selektivní ochranné vlastnosti na neuronálních buňkách a tkáních a mohou být použity při léčbě a profylaxi neurodegenerativních chorob, zejména Parkinsonovy choroby.

Podstata vynálezu

Předmětem tohoto vynálezu jsou neurosteroidové deriváty obecného vzorce **I**,



(I),

ve kterém

R1, R2 jsou nezávisle vybrány z vodíku nebo hydroxylové skupiny;

R3 je nezávisle vybrán ze skupiny zahrnující vodík, lineární a rozvětvený C1-C5 alkyl a C3-C6 cykloalkyl, přičemž cykloalkyl může být popřípadě substituován alespoň jedním substituentem, kterým je C1-C5 alkyl;

R4 je nezávisle vybrán ze skupiny sestávající z vodíku, methylu a ethylu;

nebo R3 a R4 společně tvoří bivalentní skupinu C2-C5 α,ω -alkylenu,

a kde následující sloučeniny jsou vyloučeny z obecného vzorce I:

2 α -hydroxy-5 α -cholestan-6-on, 3 α -hydroxy-5 α -cholestan-6-on, 2 α ,3 α -dihydroxy-5 α -cholestan-6-on, 3 α -hydroxy-5 α -campestan-6-on, 2 α ,3 α -dihydroxy-5 α -campestan-6-on.

S výhodou nejsou R3 a R4 zároveň vodík, tedy alespoň jeden z R3 a R4 je odlišný od vodíku.

V některých provedeních vynálezu nesou sloučeniny obecného vzorce I jako substituent R3 lineární C1-C5 alkyl, s výhodou vybraný ze skupiny zahrnující methylovou, ethylovou, *n*-propylovou, *n*-butylovou a *n*-pentylovou skupinu.

V některých provedeních vynálezu nesou sloučeniny obecného vzorce I jako substituent R3 rozvětvený C3-C5 alkyl, s výhodou vybraný ze skupiny, kterou tvoří isopropyl, isobutyl, *sek*-butyl, *terc*-butyl, 2-methylbut-2-yl, 2,2-dimethylpropyl, 3-methylbut-1-yl, pent-2-yl, pent-3-yl, 3-methylbut-2-yl a 2-methylbutyl.

V ještě některých provedeních vynálezu nesou sloučeniny obecného vzorce I jako substituent R3 cykloalkylovou skupinu, s výhodou vybranou ze skupiny zahrnující cyklopropyl, cyklobutyl, cyklopentyl, cyklohexyl, cyklopropylmethyl, cyklobutylmethyl, cyklopentylmethyl, cyklohexylmethyl, které mohou být popřípadě substituovány lineárním C1-C5 alkylem,

S výhodou je jeden z R3 nebo R4 atom vodíku, a druhý z nich není atom vodíku.

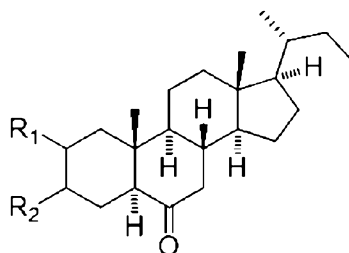
V některých provedeních vynálezu nesou sloučeniny obecného vzorce I jako substituenty R3 a R4 alkylenovou skupinu, která je vybrána ze skupiny zahrnující 1,2-ethylen, 1,3-trimethylen, 1,4-tetramethylen a 1,5-pentamethylen.

- 5 V některých provedeních vynálezu nesou sloučeniny obecného vzorce I v poloze R3 substituent mající chirální centrum, kde je absolutní konfigurace buď R, nebo S.

V některých provedeních vynálezu mají sloučeniny obecného vzorce I na uhlíku C-23 chirální centrum, kde je absolutní konfigurace buď R, nebo S.

10

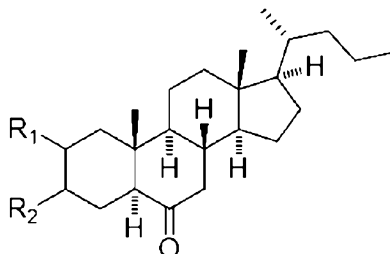
Jednotlivé sloučeniny popsané v příkladech představují jednotlivá výhodná provedení předloženého vynálezu. Výhodnými sloučeninami podle vynálezu jsou sterolové deriváty následujících vzorců, kde jeden nebo oba z R1, R2 jsou hydroxy substituenty:



15

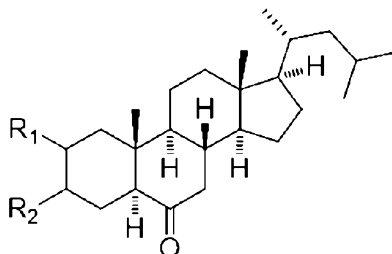
2 α -hydroxy-24-nor-5 α -cholan-6-on,
3 α -hydroxy-24-nor-5 α -cholan-6-on,
2 α ,3 α -dihydroxy-24-nor-5 α -cholan-6-on;

20



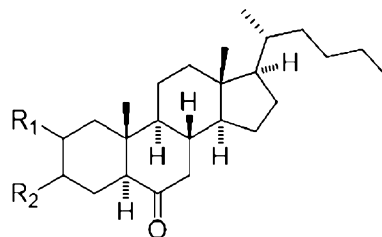
25

2 α -hydroxy-5 α -cholan-6-on,
3 α -hydroxy-5 α -cholan-6-on,
2 α ,3 α -dihydroxy-5 α -cholan-6-on;

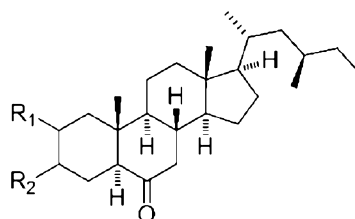


30

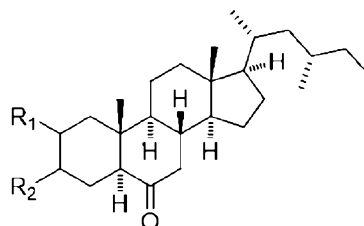
2 α -hydroxy-23-methyl-5 α -cholan-6-on,
3 α -hydroxy-23-methyl-5 α -cholan-6-on,
2 α ,3 α -dihydroxy-23-methyl-5 α -cholan-6-on;



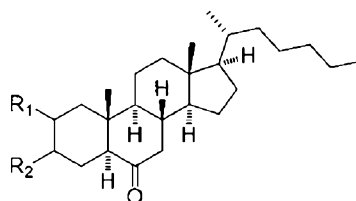
- 2α-hydroxy-26,27-dinor-5α-cholestan-6-on,
 3α-hydroxy-26,27-dinor-5α-cholestan-6-on,
 5 2α,3α-dihydroxy-26,27-dinor-5α-cholestan-6-on;



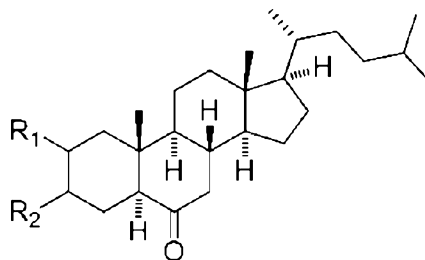
- (23*R*)-2α-hydroxy-23-ethyl-5α-cholan-6-on,
 10 (23*R*)-3α-hydroxy-23-ethyl-5α-cholan-6-on,
 (23*R*)-2α,3α-dihydroxy-23-ethyl-5α-cholan-6-on;



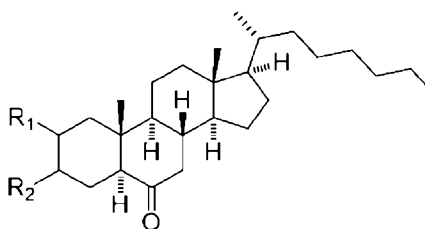
- 15 (23*S*)-2α-hydroxy-23-ethyl-5α-cholan-6-on,
 (23*S*)-3α-hydroxy-23-ethyl-5α-cholan-6-on,
 (23*S*)-2α,3α-dihydroxy-23-ethyl-5α-cholan-6-on;



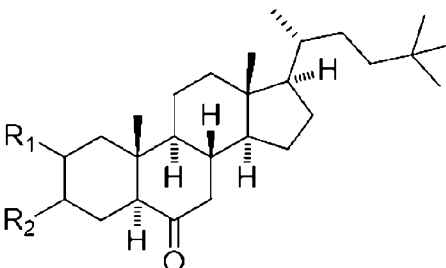
- 20 2α-hydroxy-27-nor-5α-cholestan-6-on,
 3α-hydroxy-27-nor-5α-cholestan-6-on,
 2α,3α-dihydroxy-27-nor-5α-cholestan-6-on;



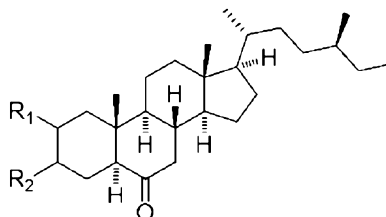
- 2 α -hydroxy-24,24-dimethyl-5 α -cholan-6-on,
 3 α -hydroxy-24,24-dimethyl-5 α -cholan-6-on,
 5 2 α ,3 α -dihydroxy-24,24-dimethyl-5 α -cholan-6-on;



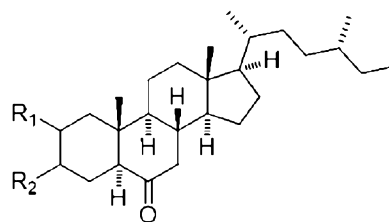
- 2 α -hydroxy-26a-homo-27-nor-5 α -cholestan-6-on,
 10 3 α -hydroxy-26a-homo-27-nor-5 α -cholestan-6-on,
 2 α ,3 α -dihydroxy-26a-homo-27-nor-5 α -cholestan-6-on;



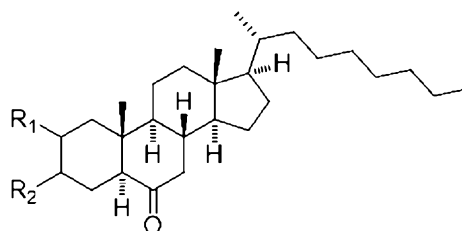
- 15 2 α -hydroxy-24,24,24-trimethyl-5 α -cholan-6-on,
 3 α -hydroxy-24,24,24-trimethyl-5 α -cholan-6-on,
 2 α ,3 α -dihydroxy-24,24,24-trimethyl-5 α -cholan-6-on;



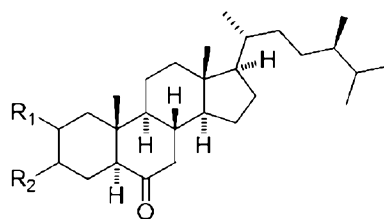
- 20 2 α -hydroxy-27-nor-5 α -campestan-6-on,
 3 α -hydroxy-27-nor-5 α -campestan-6-on,
 2 α ,3 α -dihydroxy-27-nor-5 α -campestan-6-on;



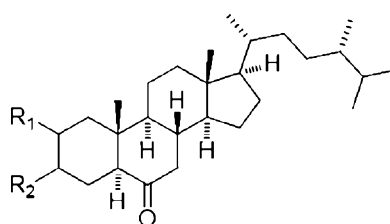
- 2 α -hydroxy-27-nor-5 α -ergostan-6-on,
 3 α -hydroxy-27-nor-5 α -ergostan-6-on,
 5 2 α ,3 α -dihydroxy-27-nor-5 α -ergostan-6-on;



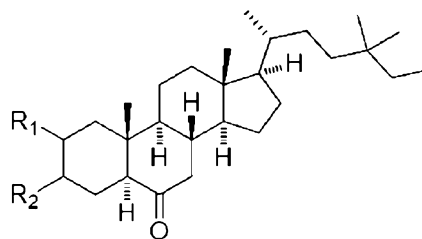
- 2 α -hydroxy-26a,26b-dihomo-27-nor-5 α -cholestan-6-on,
 10 3 α -hydroxy-26a,26b-dihomo-27-nor-5 α -cholestan-6-on,
 2 α ,3 α -dihydroxy-26a,26b-dihomo-27-nor-5 α -cholestan-6-on;



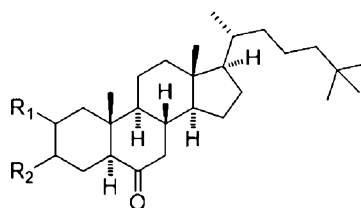
- 15 2 α -hydroxy-5 α -campestan-6-on;



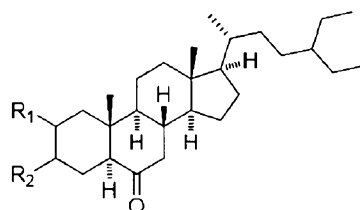
- 2 α -hydroxy-5 α -ergostan-6-on,
 20 3 α -hydroxy-5 α -ergostan-6-on,
 2 α ,3 α -dihydroxy-5 α -ergostan-6-on;



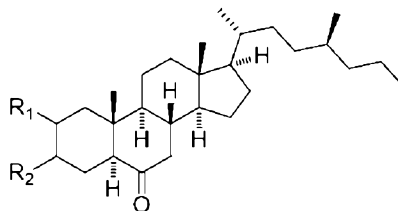
- 2 α -hydroxy-24-ethyl-24,24-dimethyl-5 α -cholan-6-on,
 3 α -hydroxy-24-ethyl-24,24-dimethyl-5 α -cholan-6-on,
 5 2 α ,3 α -dihydroxy-24-ethyl-24,24-dimethyl-5 α -cholan-6-on;



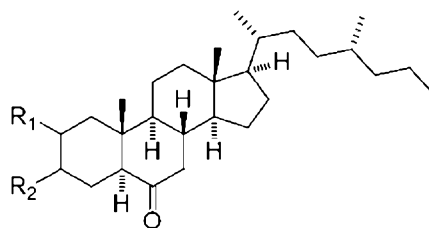
- 2 α -hydroxy-25-methyl-5 α -cholestan-6-on,
 10 3 α -hydroxy-25-methyl-5 α -cholestan-6-on,
 2 α ,3 α -dihydroxy-25-methyl-5 α -cholestan-6-on;



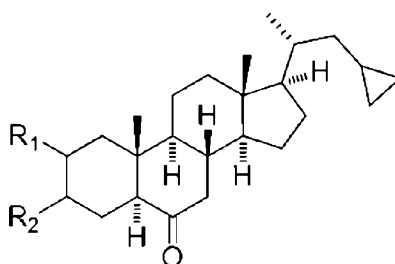
- 15 2 α -hydroxy-27-nor-5 α -stigmastan-6-on,
 3 α -hydroxy-27-nor-5 α -stigmastan-6-on,
 2 α ,3 α -dihydroxy-27-nor-5 α -stigmastan-6-on;



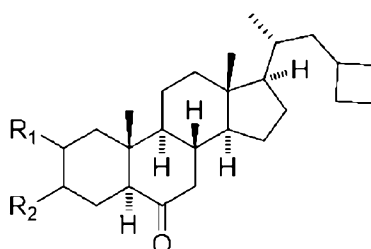
- 20 (24*S*)-2 α -hydroxy-26a-homo-27-nor-5 α -campestan-6-on,
 (24*S*)-3 α -hydroxy-26a-homo-27-nor-5 α -campestan-6-on,
 (24*S*)-2 α ,3 α -dihydroxy-26a-homo-27-nor-5 α -campestan-6-on;



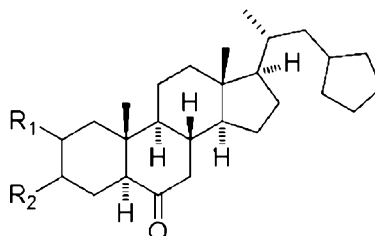
- (24*R*)-2α-hydroxy-26a-homo-27-nor-5α-ergostan-6-on,
 (24*R*)-3α-hydroxy-26a-homo-27-nor-5α-ergostan-6-on,
 5 (24*R*)-2α,3α-dihydroxy-26a-homo-27-nor-5α-ergostan-6-on;



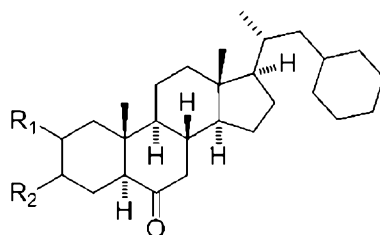
- 2α-hydroxy-22-cyklopropyl-23,24-dinor-5α-cholan-6-on,
 10 3α-hydroxy-22-cyklopropyl-23,24-dinor-5α-cholan-6-on,
 2α,3α-dihydroxy-22-cyklopropyl-23,24-dinor-5α-cholan-6-on;



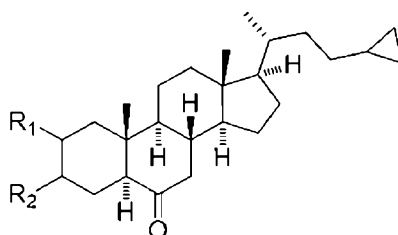
- 15 2α-hydroxy-22-cyklobutyl-23,24-dinor-5α-cholan-6-on,
 3α-hydroxy-22-cyklobutyl-23,24-dinor-5α-cholan-6-on,
 2α,3α-dihydroxy-22-cyklobutyl-23,24-dinor-5α-cholan-6-on;



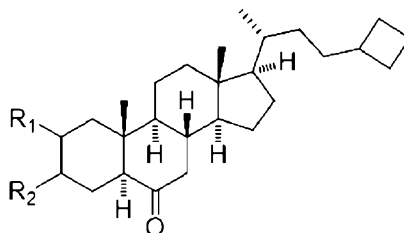
- 20 2α-hydroxy-22-cyklopentyl-23,24-dinor-5α-cholan-6-on,
 3α-hydroxy-22-cyklopentyl-23,24-dinor-5α-cholan-6-on,
 2α,3α-dihydroxy-22-cyklopentyl-23,24-dinor-5α-cholan-6-on;



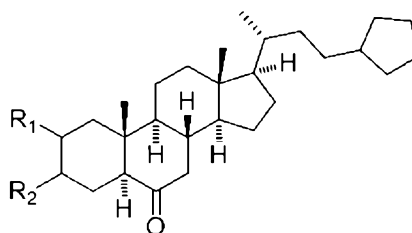
- 2 α -hydroxy-22-cyklohexyl-23,24-dinor-5 α -cholan-6-on,
 3 α -hydroxy-22-cyklohexyl-23,24-dinor-5 α -cholan-6-on,
 5 2 α ,3 α -dihydroxy-22-cyklohexyl-23,24-dinor-5 α -cholan-6-on;



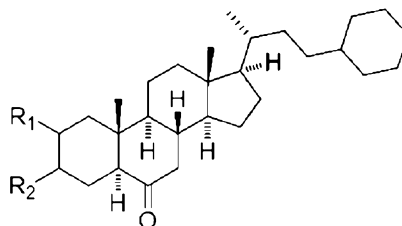
- 2 α -hydroxy-23-cyklopropyl-24-nor-5 α -cholan-6-on,
 10 3 α -hydroxy-23-cyklopropyl-24-nor-5 α -cholan-6-on,
 2 α ,3 α -dihydroxy-23-cyklopropyl-24-nor-5 α -cholan-6-on;



- 15 2 α -hydroxy-23-cyklobutyl-24-nor-5 α -cholan-6-on,
 3 α -hydroxy-23-cyklobutyl-24-nor-5 α -cholan-6-on,
 2 α ,3 α -dihydroxy-23-cyklobutyl-24-nor-5 α -cholan-6-on;



- 20 2 α -hydroxy-23-cyklopentyl-24-nor-5 α -cholan-6-on,
 3 α -hydroxy-23-cyklopentyl-24-nor-5 α -cholan-6-on,
 2 α ,3 α -dihydroxy-23-cyklopentyl-24-nor-5 α -cholan-6-on;

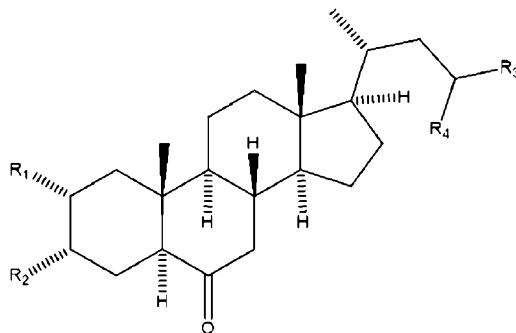


2 α -hydroxy-23-cyklohexyl-24-nor-5 α -cholan-6-on,
 3 α -hydroxy-23-cyklohexyl-24-nor-5 α -cholan-6-on,
 2 α ,3 α -dihydroxy-23-cyklohexyl-24-nor-5 α -cholan-6-on.

Výhodnými sloučeninami podle vynálezu jsou tyto deriváty obecného vzorce I: 2 α ,3 α -dihydroxy-24-nor-5 α -cholan-6-on, 2 α ,3 α -dihydroxy-5 α -cholan-6-on, 2 α ,3 α -dihydroxy-26,27-dinor-5 α -cholestan-6-on, 2 α ,3 α -dihydroxy-27-nor-5 α -cholestan-6-on, 2 α ,3 α -dihydroxy-5 α -cholestan-6-on, 2 α ,3 α -dihydroxy-23-methyl-5 α -cholan-6-on, 2 α ,3 α -dihydroxy-23-cyklohexyl-24-nor-5 α -cholan-6-on, 2 α ,3 α -dihydroxy-23-cyklopentyl-24-nor-5 α -cholan-6-on, 2 α ,3 α -dihydroxy-24,24-dimethyl-5 α -cholan-6-on.

Sloučeniny podle předkládaného vynálezu mají širokou škálu biologických aktivit, včetně aktivit při zvyšování životaschopnosti neuronálních buněk, snižování oxidačního stresu, neuroprotektivity a antiapoptotické aktivace, které jsou zvláště užitečné ve farmaceutických aplikacích k léčbě neurodegenerativních chorob a odpovídají spektru účinků požadovaných od léčiv určených pro takovou léčbu.

Předmětem tohoto vynálezu jsou dále neurosterolové deriváty obecného vzorce **Ia**,



(Ia),

ve kterém

R1, R2 jsou nezávisle vybrány z vodíku nebo hydroxylové skupiny;

R3 je nezávisle vybrán ze skupiny zahrnující vodík, lineární a rozvětvený C1-C5 alkyl a C3-C6 cykloalkyl, přičemž cykloalkyl může být popřípadě substituován alespoň jedním substituentem, kterým je C1-C5 alkyl;

R4 je nezávisle vybrán ze skupiny sestávající z vodíku, methylu a ethylu;

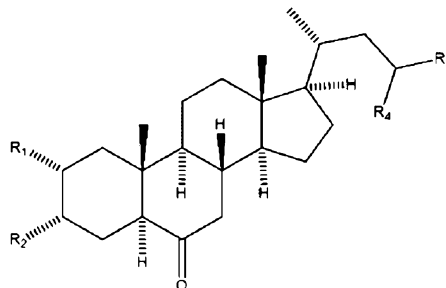
nebo R3 a R4 společně tvoří bivalentní skupinu C2-C5 α,ω -alkylenu,

a kde následující sloučeniny jsou vyloučeny z obecného vzorce Ia:

2 α -hydroxy-5 α -cholestan-6-on, 3 α -hydroxy-5 α -cholestan-6-on, 2 α ,3 α -dihydroxy-5 α -cholestan-6-on,

pro použití jako léčiva.

Předmětem tohoto vynálezu jsou sterolové deriváty obecného vzorce **Ib**,



(Ib),

ve kterém

R1, R2 jsou nezávisle vybrány z vodíku nebo hydroxylové skupiny;

R3 je nezávisle vybrán ze skupiny zahrnující vodík, lineární a rozvětvený C1-C5 alkyl a C3-C6 cykloalkyl, přičemž cykloalkyl může být popřípadě substituován alespoň jedním substituentem, kterým je C1-C5 alkyl;

R4 je nezávisle vybrán ze skupiny sestávající z vodíku, methylu a ethylu;

nebo R3 a R4 společně tvoří bivalentní skupinu C2-C5 α,ω -alkylenu;

pro použití při léčení a/nebo profylaxi neurodegenerativních onemocnění, kde neurodegenerativní onemocnění je s výhodou vybráno ze skupiny zahrnující amyotrofickou laterální sklerózu, Parkinsonovu chorobu, Alzheimerovu chorobu, Huntingtonovu chorobu, progresivní supranukleární paralýzu, kortikobazální degenerace, frontotemporální demence, demence s Lewyho tělísky, atrofie mnohočetného systému, chronické traumatické encefalopatie a spinocerebelární ataxie.

Předmětem tohoto vynálezu jsou ve výhodném provedení sterolové deriváty obecného vzorce **Ib** pro použití při léčbě a profylaxi Parkinsonovy nemoci.

Tento vynález dále poskytuje farmaceutické kompozice obsahující jeden nebo více sterolových derivátů obecného vzorce I společně s alespoň jedním farmaceuticky akceptovatelným nosičem.

Farmaceutické přípravky

Vhodné cesty pro systémovou aplikaci jsou orální, inhalační, injekční (intravazální, intramuskulární, subkutanní), bukální, sublinguální a nasální. Preferovaný způsob podání závisí na stavu pacienta a místě onemocnění, kromě ostatních ohledů známých klinikovi.

Farmaceutický přípravek obsahuje od 1 do 95 % aktivní látky, přičemž jednorázové dávky obsahují přednostně od 20 do 90 % aktivní látky a při způsobech aplikace, které nejsou jednorázové, obsahují přednostně od 5 do 20 % aktivní látky. Jednotkové dávkové formy jsou např. potahované tablety, tablety, ampule, lahvičky, čípky nebo tobolky. Jiné formy aplikace jsou

např. masti, krémy, pasty, pěny, tinktury, rtěnky, kapky, spreje, disperze atd. Příkladem jsou tobolky obsahující od 0,05 g do 1,0 g aktivní látky.

- 5 Farmaceutické přípravky podle předloženého vynálezu jsou připravovány známým způsobem, např. běžným mícháním, granulací, potahováním, rozpouštěcími nebo lyofilizačními procesy.

- 10 Přednostně jsou používány roztoky aktivních látek a dále také suspenze nebo disperze, obzvláště izotonické vodné roztoky, suspenze nebo disperze, které mohou být připraveny před použitím, např. v případě lyofilizovaných preparátů obsahujících aktivní látku samotnou nebo s nosičem jako je manitol. Farmaceutické přípravky mohou být sterilizovány a/nebo obsahují pomocné látky, např. konzervační přípravky, stabilizátory, zvlhčovačla a/nebo emulgátory, rozpouštěcí činidla, soli pro regulaci osmotického tlaku a/nebo pufry. Jsou připravovány známým způsobem, např. běžným rozpouštěním nebo lyofilizací. Zmíněné roztoky nebo suspenze mohou obsahovat látky zvyšující viskozitu, jako např. sodnou sůl karboxymethylcelulosy, dextran, 15 polyvinylpyrolidon nebo želatinu.

- Olejové suspenze obsahují jako olejovou složku rostlinné, syntetické nebo semisyntetické oleje obvyklé pro injekční účely. Oleje, které zde mohou být zmíněny, jsou obzvláště kapalně estery mastných kyselin, které obsahují jako kyselou složku mastnou kyselinu s dlouhým řetězcem 20 majícím 8 až 22, s výhodou pak 12 až 22 uhlíkových atomů, např. kyselinu laurovou, tridekanovou, myristovou, pentadekanovou, palmitovou, margarovou, stearovou, arachidonovou a behenovou, nebo odpovídající nenasycené kyseliny, např. kyselinu olejovou, alaidikovou, eurikovou, brasidovou a linoleovou, případně s přísadkou antioxidantů, např. vitaminu E, beta-karotenu nebo 3,5-di-*terc*-butyl-4-hydroxytoluenu. Alkoholová složka těchto esterů mastných kyselin nemá více než 6 uhlíkových atomů a je mono- nebo polyhydričká, např. mono-, di- nebo 25 trihydričké alkoholy jako metanol, etanol, propanol, butanol nebo pentanol a jejich isomery, ale hlavně glykol a glycerol. Estery mastných kyselin jsou s výhodou např. ethyl oleát, isopropyl myristát, isopropyl palmitát, „Labrafil M 2375“ (polyoxyethylen glycerol trioleát, Gattefoscé, Paříž), „Labrafil M 1944 CS“ (nenasycené polyglykolované glyceridy připravené alkoholýzou 30 oleje z meruňkových jader a složené z glyceridů a esterů polyetylén glykolu; Gattefoscé, Paříž), „Labrasol“ (nasycené polyglykolované glyceridy připravené alkoholýzou TCM a složené z glyceridů a esterů polyetylén glykolu; Gattefoscé, Paříž) a/nebo „Miglyol 812“ (triglycerid nasycených mastných kyselin s délkou řetězce C₈ až C₁₂ od Hüls AG, Německo) a zvláště rostlinné oleje jako bavlníkový olej, mandlový olej, olivový olej, ricinový olej, sezamový olej, 35 sójový olej a zejména olej z podzemnice olejné.

Příprava injekčního přípravku se provádí za sterilních podmínek obvyklým způsobem, např. plněním do ampulí nebo lahviček a uzavíráním obalů.

- 40 Např. farmaceutické přípravky pro orální použití se mohou získat smícháním aktivní látky s jedním nebo více tuhými nosiči, případnou granulací výsledné směsi, a pokud je to požadováno, zpracováním směsi nebo granulí do tablet nebo potahovaných tablet přísadou dalších neutrálních látek.
- 45 Vhodné nosiče jsou obzvláště plnidla jako cukry, např. laktóza, sacharóza, manitol nebo sorbitol, celulosové preparáty a/nebo fosforečnan vápníku, s výhodou fosforečnan vápenatý nebo hydrogen fosforečnan vápenatý, dále pojiva jako škroby, s výhodou kukuřičný, pšeničný, rýžový nebo bramborový škrob, methylcelulosa, hydroxypropylmethylcelulosa, sodná sůl karboxymethylcelulosy a/nebo polyvinylpyrolidin, a/nebo pokud požadováno desintegrátory jako 50 výše zmíněné škroby a dále karboxymethylový škrob, zesítený polyvinylpyrolidin, alginová kyselina a její soli, s výhodou alginát sodný. Další neutrální látky jsou regulátory toku a lubrikanty, s výhodou kyselina salicylová, talek, kyselina stearová a její soli jako stearát hořečnatý a/nebo vápenatý, polyetylén glykol nebo jeho deriváty.

- Jádra potahovaných tablet mohou být potažena vhodnými potahy, které mohou být odolné vůči žaludeční šťávě, přičemž používané potahy jsou mezi jinými koncentrované roztoky cukrů, které mohou obsahovat arabskou gumu, talek, polyvinylpyrolidin, polyetylén glykol a/nebo oxid titaničitý, dále potahovací roztoky ve vhodných organických rozpouštědlech nebo směsích rozpouštědel, či pro přípravu potahů odolných vůči žaludeční šťávě roztoky vhodných celulosových preparátů jako acetylcelulozaftalát nebo hydroxypropylmethylcelulozaftalát. Barviva nebo pigmenty jsou přimíchávány do tablet nebo potahovaných tablet např. pro identifikaci nebo charakterizaci různých dávek účinné složky.
- Farmaceutické přípravky, které mohou být užívány orálně, jsou také tvrdé tobolky ze želatiny nebo měkké uzavřené tobolky ze želatiny a změkčovadla jako glycerol nebo sorbitol. Tvrdé tobolky mohou obsahovat aktivní látku ve formě granulí, smíchanou např. s plnidly jako je kukuřičný škrob, pojivy nebo lubrikanty jako talek nebo stearát hořečnatý, a se stabilizátory. V měkkých tobolkách je aktivní látka přednostně rozpuštěna nebo suspendována ve vhodných kapalných látkách neutrální povahy jako mazací tuk, parafínový olej nebo kapalný polyetylén glykol či estery mastných kyselin a etylén nebo propylen glykolu, přičemž je také možno přidat stabilizátory a detergenty např. typu esterů polyetylén sorbitanových mastných kyselin.
- Další formy orálního podávání jsou např. sirupy připravované běžným způsobem, které obsahují aktivní složku, např. v suspendované formě a v koncentraci okolo 5 až 20 %, přednostně okolo 10 % nebo podobné koncentrace, která umožňuje vhodnou individuální dávku, např. když je měřeno 5 nebo 10 ml. Ostatní formy jsou např. práškové nebo kapalné koncentráty pro přípravu koktejlů, např. v mléce. Takovéto koncentráty mohou být také baleny v množství odpovídajícím jednotkové dávce.
- Farmaceutické přípravky, které mohou být používány rektálně, jsou např. čípky, které obsahují kombinaci aktivní látky se základem. Vhodné základy jsou např. přírodní nebo syntetické triglyceridy, parafínové uhlovodíky, polyetylén glykoly nebo vyšší alkoholy.
- Přípravky vhodné pro parenterální podání jsou vodné roztoky aktivní složky ve formě rozpustné ve vodě, např. ve vodě rozpustná sůl nebo vodná injekční suspenze, která obsahuje látky zvyšující viskozitu, např. sodnou sůl karboxymethylcelulose, sorbitol a/nebo dextran, a stabilizátory tam kde je to vhodné. Aktivní látka může být také přítomna ve formě lyofilizátu společně s pomocnými látkami, kde je to vhodné a může být rozpuštěna před parenterální aplikací přidáním vhodných rozpouštědel. Roztoky, které jsou použity pro parenterální aplikaci, mohou být použity např. i pro infuzní roztoky. Preferovaná konzervovadla jsou s výhodou antioxidanty jako kyselina askorbová, nebo mikrobicidy kyselina sorbová či benzoová.
- Masti jsou emulze oleje ve vodě, které obsahují ne více než 70 %, ale přednostně 20 až 50 % vody nebo vodné fáze. Tukovou fází tvoří zejména uhlovodíky, např. vazelína, parafínový olej nebo tvrdé parafiny, které přednostně obsahují vhodné hydroxysloučeniny jako mastné alkoholy a jejich estery, např. cetylalkohol, nebo alkoholy lanolinu, s výhodou lanolin pro zlepšení kapacity pro vázání vody. Emulgátory jsou odpovídající lipofilní sloučeniny jako sorbitanové estery mastných kyselin (Spany), s výhodou sorbitan oleát nebo sorbitan isostearát. Aditiva k vodné fázi jsou např. smáčedla jako polyalkoholy, např. glycerol, propylenglykol, sorbitol a/nebo polyetylenglykol, nebo konzervační prostředky či příjemně vonící látky.
- Mastné masti jsou nevodné a obsahují jako bázi hlavně uhlovodíky, např. parafin, vazelinu nebo parafínový olej, a dále přírodní nebo semisyntetické tuky, např. hydrogenované kokosové triglyceridy mastných kyselin nebo, s výhodou, hydrogenované oleje, např. hydrogenovaný ricínový olej nebo olej z podzemnice olejné, a dále částečné glycerolové estery mastných kyselin, např. glycerol mono- nebo distearát. Dále obsahují např. mastné alkoholy, emulgátory a/nebo aditiva zmíněná v souvislosti s mastmi, která zvyšují příjem vody.

- Krémy jsou emulze oleje ve vodě, které obsahují více než 50 % vody. Používané olejové báze jsou zejména mastné alkoholy, např. lauryl, cetyl nebo staryl alkoholy, mastné kyseliny, například palmitová nebo stearová kyselina, kapalné a pevné vosky, například isopropyl myristát, lanolin nebo včelí vosk, a/nebo uhlovodíky, například vazelína (petrolátum) nebo parafínový olej.
- 5 Emulgátory jsou povrchově aktivní sloučeniny s převážně hydrofilními vlastnostmi, jako jsou odpovídající neiontové emulgátory, např. estery mastných kyselin polyalkoholů nebo jejich ethylenoxy adukty, např. estery polyglycerických mastných kyselin nebo polyetylen sorbitanové estery (Tween), dále polyoxyethylenové estery mastných alkoholů nebo polyoxyethylenové estery mastných kyselin, nebo odpovídající iontové emulgátory, jako alkalické soli sulfátů mastných
- 10 alkoholů, s výhodou laurylsulfát sodný, cetylsulfát sodný nebo stearylsulfát sodný, které jsou obvykle používány v přítomnosti mastných alkoholů, např. cetyl stearyl alkoholu nebo stearyl alkoholu. Aditiva k vodné fázi jsou mimo jiné činidla, která chrání krémy před vyschnutím, např. polyalkoholy jako glycerol, sorbitol, propylenglykol a polyetylen glykol, a dále konzervační činidla a příjemně vonící látky.
- 15 Pasty jsou krémy nebo masti obsahující práškové složky absorbující sekreci jako jsou oxidy kovů, např. oxidy titanu nebo oxid zinečnatý, a dále talek či silikáty hliníku, které mají za úkol vázat přítomnou vlhkost nebo sekreci.
- 20 Pěny jsou aplikovány z tlakových nádob a jsou to kapalné emulze oleje ve vodě v aerosolové formě, přičemž jako hnací plyny jsou používány halogenované uhlovodíky, jako polyhalogenované alkany, např. dichlorfluormethan a dichlortetrafluorethan, nebo přednostně nehalogenované plynné uhlovodíky, vzduch, N₂O či oxid uhličitý. Používané olejové fáze jsou stejné jako pro masti a krémy a také jsou používána aditiva tam zmíněná.
- 25 Tinkтуры a roztoky obvykle obsahují vodně-etanolickou bázi, ke které jsou přimíchána zvlhčovačla pro snížení odpařování, jako jsou polyalkoholy, např. glycerol, glykoly a/nebo polyetylen glykol, dále promazávací látky jako estery mastných kyselin a nižších polyetylen glykolů, tj. lipofilní látky rozpustné ve vodné směsi nahrazující tukové látky odstraněné z kůže etanolem,
- 30 a pokud je to nutné, i ostatní pomocné látky a aditiva.
- Vynález se také vztahuje na procesy nebo metody pro léčení nemocí zmíněných výše. Látky mohou být podávány profylakticky nebo terapeuticky jako takové nebo ve formě farmaceutických přípravků, přednostně v množství, které je efektivní proti zmíněným nemocem,
- 35 přičemž u teplokrevných živočichů, např. člověka, vyžadujícího takovéto ošetření, je látka používána zejména ve formě farmaceutického přípravku. Na tělesnou hmotnost okolo 70 kg je aplikována denní dávka látky okolo 0,01 až 1,0 g, s výhodou 0,05 až 0,5 g.
- 40 Objasnění výkresů
- Obrázek 1 ukazuje neuroprotektivní účinek nových sloučenin v modelu oxidativního poškození indukovaného glutamátem na dopaminergních neuronových buňkách SH-SY5Y. Sloučeniny podle vynálezu při 0,1, 1 a 10 μM spolu s pozitivními kontrolami: kyselina R-lipoová (R-LA, 0,5, 5 a 50 μM) a deferoxamin (DFO, 1, 10 a 100 μM) byly použity při současném ošetření se
- 45 160 mM glutamátu (Glu) po dobu 24 hodin. Po 24 hodinách byla buněčná smrt kvantifikována barvením propidium jodidem. Buněčná smrt generovaná Glu byla považována za 100%, takže bylo pozorováno snížení buněčné smrti.
- 50 Všechny výsledky představují průměrnou hodnotu ± standardní chybu průměru (SEM) v triplicátu (trojnásobné opakování) experimentů (n=3) ve třech různých dnech. ANOVA, Bonferonni post hoc test; *, # P < 0.05; **, ## P < 0.01; ***, ### P < 0.001; * P porovnání s vzorkem s Glu 160mM, # P porovnání vzorku se skupinou bez Glu 160mM. Hodnota P < 0.05 je považována za statisticky signifikantní.
- 55

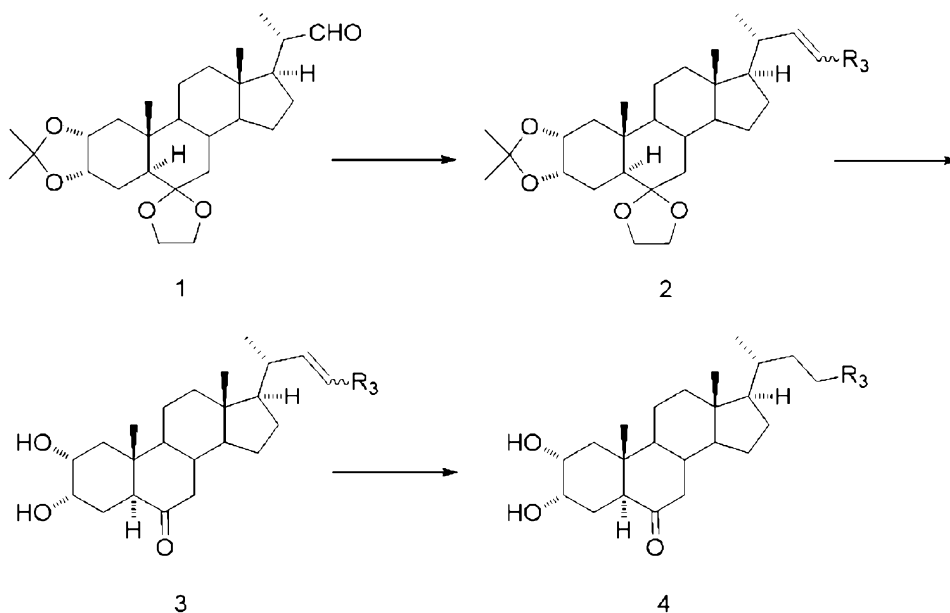
Obrázek 2 ukazuje glutamátem indukovaný oxidativní stres (OS) a OS-redukující aktivitu sloučenin podle vynálezu a pozitivní kontroly. Sloučeniny podle vynálezu při 0,1, 1 a 10 μM spolu s pozitivními kontrolami: kyselina R-lipoová (R-LA; 0,5, 5 a 50 μM) a deferoxamin (DFO; 1, 10 a 100 μM) byly použity při současném ošetření 160 mM Glu po dobu 4 hodin. Po 4 hodinách byla kvantifikace superoxidových radikálů jako markeru oxidačního stresu kvantifikována barvením dihydroethidiem. Oxidační stres generovaný Glu byl považován za 100%, takže bylo pozorováno snížení buněčné smrti. Všechny výsledky představují průměrnou hodnotu $\pm$ standardní chybu průměru (SEM) v triplicátu (trojnásobné opakování) experimentů ($n=3$) ve třech různých dnech.

Příklady uskutečnění vynálezu

Není-li uvedeno jinak, tak veškerá procenta a množství jsou založena na hmotnosti. Výchozí sloučeniny a činidla mohou být zakoupeny z komerčních zdrojů (Sigma, Aldrich, Fluka atd.) nebo mohou být připraveny, jak je uvedeno níže.

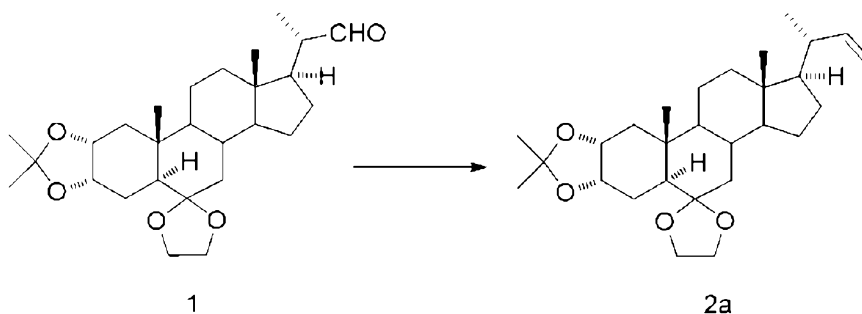
^1H a ^{13}C experimenty byly provedeny na přístroji JEOL JNM-ECA 500 (JEOL, Tokio, Japonsko; ^1H , 500 MHz; ^{13}C , 125 MHz) spektrometr vybaveného 5 mm JEOL Royal sondou, s použitím CDCl_3 , jako rozpouštědla (25 $^\circ\text{C}$). Chemické posuny (δ) byly referencovány na signál použitého rozpouštědla (CDCl_3) a jsou uváděny v částech na jeden milion (ppm). Štěpící konstanty (J) jsou uváděny v jednotkách Hertz (Hz). NMR spektra byly procesovány v programu ACD/NMR Processor Academic Edition 12.01 nebo JEOL Delta v5.0.5.1. HRMS analýza byla provedena na spektrometru Synapt G2-Si Mass Spectrometer (Waters, Manchester, UK) s API ionizací. Spektra byla měřena v pozitivním modu v rozmezí 100 až 1000 m/z . Vzorčky byly rozpuštěny v CHCl_3 a použity pro přímý nástřik. Průběh reakce byl sledován pomocí TLC Kieselgel 60 F_{254} desek (Merck) s detekcí postřikem 10% vodným roztokem H_2SO_4 a zahřátím na 400 $^\circ\text{C}$. Čištění sloučenin bylo provedeno použitím sloupcové chromatografie na silikagelu Silica gel 60 (Merck 7734).

Výchozí steroidní derivát **1** pro olefinaci reakci byl připraven z komerčně dostupného stigmasterolu podle literatury (Heterocycles 1982, 17, 301). Všechny sloučeniny popsané v tomto vynálezu byly připraveny podle následujícího schématu:



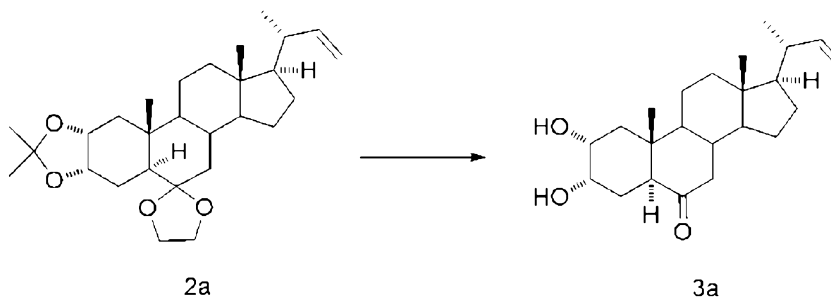
Syntéza nových sterolových derivátů

Příklad 1

**2a,3a-(Isopropylidendioxy)-6,6-(ethylenedioxy)-24-nor-5a-chol-22-en (sloučenina 2a)**

Do roztoku methyltrifenylfosfonium bromidu (48 mg; 0,134 mmol) v bezvodém tetrahydrofuranu (3 ml) byl přidán roztok n-butyllithia v hexanu (1,6 M; 85 μ l; 0,134 mmol). Reakce byla míchána při 0 °C po dobu 30 minut. Poté byl přidán roztok aldehydu **1** (30 mg; 0,067 mmol) v bezvodém tetrahydrofuranu (3 ml) a reakce byla pomalu ohřívána na teplotu místnosti a míchána další 2 hodiny. Po ukončení reakce byla směs zředěna ethyl-acetátem a extrahována dvakrát vodou. Organická fáze byla vysušena chloridem vápenatým. Rozpouštědla byla odpařena za sníženého tlaku a surový produkt byl čištěn sloupcovou chromatografií (7% ethylacetát v cyklohexanu). Byla získána sloučenina **2a**.

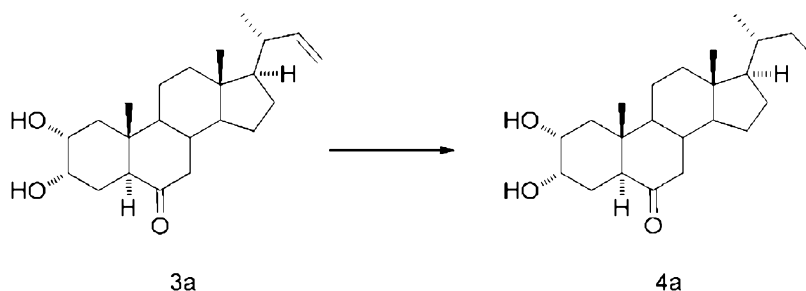
Bezbarvý olej, chemický vzorec: $C_{28}H_{44}O_4$, výtěžek: 25 mg, 84 %, 1H NMR ($CDCl_3$, 500 MHz) δ , ppm: δ 0,69 (s, 3H, CH_3); 0,84 (s, 3H, CH_3); 1,02 (d, 3H, $J = 6,4$ Hz, CH_3); 1,32 (s, 3H, CH_3); 1,47 (s, 3H, CH_3); 1,92 (dd, 1H, $J = 12,7$ a 6,9 Hz); 1,97 (dt, 1H, $J = 12,7$ a 3,2 Hz); 2,06 (m, 1H); 2,16 (m, 1H); 3,75 (m, 1H, CH_2O); 3,88-3,97 (m, 3H, CH_2O); 4,10 (m, 1H, H-2 β); 4,27 (m, 1H, H-3 β); 4,81 (dd, 1H, $J = 10,2$ a 1,9 Hz, H-23a); 4,90 (dd, 1H, $J = 17,1$ a 1,9 Hz, H-23b); 5,65 (ddd, 1H, $J = 17,1$, 10,2 a 8,7 Hz, H-22). ^{13}C NMR δ 12,14, 13,35, 20,04, 20,70, 21,94, 24,14, 26,55, 28,30, 28,59, 32,84, 37,98, 39,51, 41,01, 41,19, 42,43, 42,68, 45,47, 52,95, 55,37, 55,90, 64,15, 65,46, 72,82, 72,93, 107,51, 109,65, 111,54, 145,16. HRMS (API): m/z vypočteno pro $C_{28}H_{45}O_4$ $[M+H]^+$ 445,3318, nalezeno 445,3319.

**2a,3a-Dihydroxy-24-nor-5a-chol-22-en-6-on (sloučenina 3a)**

1M vodný roztok kyseliny chlorovodíkové (0,5 ml) byl přidán do roztoku sloučeniny **2a** (20 mg; 0,045 mmol) v tetrahydrofuranu (4 ml) a reakce byla zahřívána na 40 °C 4 hodiny. Poté byla reakce zředěna ethyl-acetátem a vytřepána dvakrát vodou. Organická fáze byla vysušena chloridem vápenatým. Rozpouštědla byla odpařena za snížené tlaku a surový produkt byl čištěn

sloupcovou chromatografií na silikagelu (60% ethylacetát v cyklohexanu). Byla získána sloučenina **3a**.

Bílý prášek, chemický vzorec: $C_{23}H_{36}O_3$, výtěžek: 15 mg, 93 %, 1H NMR ($CDCl_3$, 500 MHz) δ , ppm: δ 0,69 (s, 3H, CH_3); 0,76 (s, 3H, CH_3); 1,04 (d, 3H, $J = 6,7$ Hz, CH_3); 1,91 (dd, 1H, $J = 15,0$ a 3,1 Hz); 1,97-2,11 (m, 2H); 2,29 (dd, 1H, $J = 13,3$ a 4,4 Hz); 2,68 (dd, 1H, $J = 12,5$ a 2,8 Hz); 3,77 (m, 1H, H-2 β); 4,05 (m, 1H, H-3 β); 4,83 (dd, 1H, $J = 10,1$ a 1,9 Hz, H-23a); 4,91 (dd, 1H, $J = 17,1$ a 1,1 Hz, H-23b); 5,65 (ddd, 1H, $J = 17,1$, 10,1 a 8,6 Hz, H-22). ^{13}C NMR δ 12,17, 13,54, 20,04, 21,14, 23,90, 26,26, 28,15, 37,62, 39,24, 40,13, 41,11, 42,57, 42,88, 46,71, 50,67, 53,68, 55,25, 56,64, 68,24, 68,35, 111,84, 144,85, 212,23. HRMS (API): m/z vypočteno pro $C_{23}H_{37}O_3$ $[M+H]^+$ 361,2743, nalezeno 361,2741.



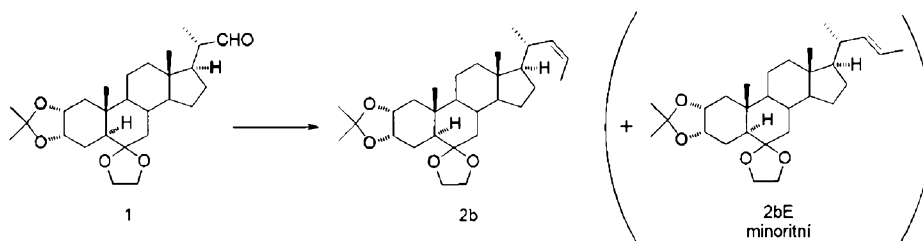
15 **2 α ,3 α -Dihydroxy-24-nor-5 α -cholan-6-on (sloučenina 4a)**

Palladium na uhlí (12 mg) bylo přidáno do roztoku sloučeniny **3a** (12 mg; 0,033 mmol) v tetrahydrofuranu (3 ml) a ethanolu (1 ml). Vzduch z reakční baňky byl evakuován a do reakce byl přidán vodík z balonku. Takto byla reakce míchána 18 hodin. Poté bylo palladium na uhlí odfiltrováno, rozpouštědla odpařena za sníženého tlaku a surový produkt čištěn sloupcovou chromatografií na silikagelu (60% ethylacetát v cyklohexanu). Byla získána sloučenina **4a**.

Bílý prášek, chemický vzorec: $C_{23}H_{38}O_3$, výtěžek: 11 mg, 91 %. 1H NMR ($CDCl_3$, 500 MHz) δ , ppm: δ 0,66 (s, 3H, CH_3); 0,75 (s, 3H, CH_3); 0,83 (t, 3H, $J = 7,2$ Hz, CH_3); 0,91 (d, 3H, $J = 6,4$ Hz, CH_3); 1,91 (dd, 1H, $J = 15,2$ a 3,0 Hz); 1,96-2,08 (m, 2H); 2,30 (dd, 1H, $J = 13,3$ a 4,5 Hz); 2,68 (dd, 1H, $J = 12,5$ a 2,7 Hz); 3,76 (m, 1H, H-2 β); 4,05 (m, 1H, H-3 β). ^{13}C NMR δ 10,29, 11,98, 13,53, 17,98, 21,16, 23,92, 26,26, 28,17, 30,27, 36,88, 37,67, 39,35, 40,14, 42,58, 42,86, 46,77, 50,69, 53,69, 55,49, 56,62, 68,27, 68,37, 212,34. HRMS (API): m/z vypočteno pro $C_{23}H_{39}O_3$ $[M+H]^+$ 363,2899, nalezeno 363,2902.

30

Příklad 2



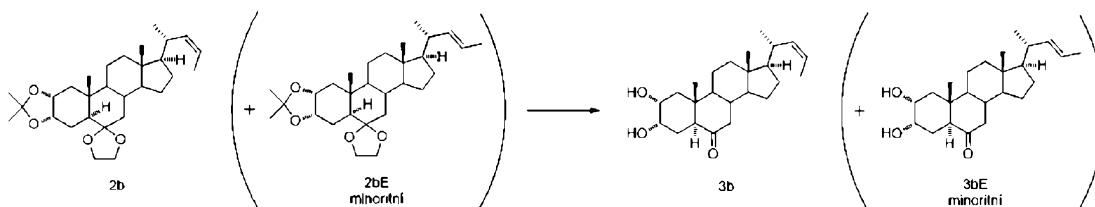
35

(22Z)-2 α ,3 α -(Isopropylidendioxy)-6,6-(ethylenedioxy)- 5 α -chol-22-en (sloučenina 2b)

Do roztoku ethyltrifenylfosfonium bromidu (50 mg; 0,134 mmol) v bezvodém tetrahydrofuranu (3 ml) byl přidán roztok *n*-butyllithia v hexanu (1,6 M; 85 μ l; 0,134 mmol). Reakce byla míchána

při 0 °C po dobu 30 minut. Poté byl přidán roztok aldehydu **1** (30 mg; 0,067 mmol) v bezvodém tetrahydrofuranu (3 ml) a reakce byla pomalu ohřívána na teplotu místnosti a míchána další 2 hodiny. Po ukončení reakce byla směs zředěna ethylacetátem a extrahována dvakrát vodou. Organická fáze byla vysušena chloridem vápenatým. Rozpouštědla byla odpařena za sníženého tlaku a surový produkt byl čištěn sloupcovou chromatografií (7% ethylacetát v cyklohexanu). Byla získána sloučenina **2b** převážně jako *Z* izomer (přibližně 5 % *E* izomeru (**2bE**) je pozorovatelné v ¹H NMR).

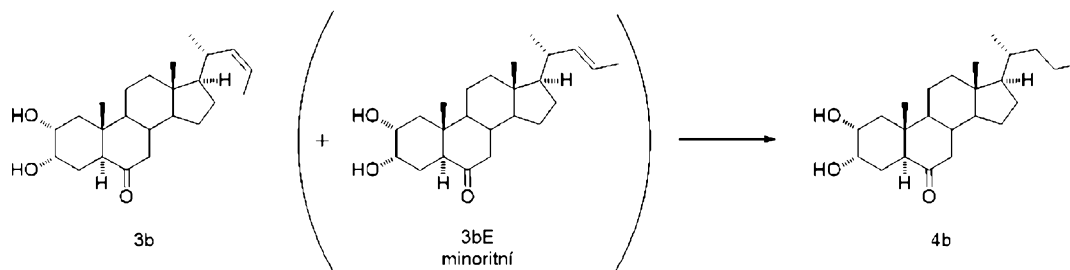
Bezbarvý olej, chemický vzorec: C₂₉H₄₆O₄, výtěžek: 27 mg, 87 %. ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz) δ, ppm: δ 0,71 (s, 3H, CH₃); 0,839 (s, 3H, CH₃); 0,95 (d, 3H, J = 6,7 Hz, CH₃); 1,32 (s, 3H, CH₃); 1,47 (s, 3H, CH₃); 1,60 (dd, 3H, J = 6,7 a 1,5 Hz, CH₃); 1,93 (dd, 1H, J = 12,7 a 6,9 Hz); 1,97 (m, 1H); 2,15 (m, 1H); 2,46 (m, 1H); 3,75 (m, 1H, CH₂O); 3,88-3,97 (m, 3H, CH₂O); 4,10 (m, 1H, H-2β); 4,27 (m, 1H, H-3β); 5,15 (m, 1H, H-22); 5,25 (m, 1H, H-23). ¹³C NMR δ 12,25, 13,10, 13,37, 20,42, 20,71, 21,95, 24,13, 26,55, 27,88, 28,60, 32,85, 33,70, 38,00, 39,55, 41,03, 42,37, 42,70, 45,48, 53,01, 55,95, 56,16, 64,15, 65,47, 72,84, 72,95, 107,51, 109,67, 120,29, 137,50. HRMS (API): *m/z* vypočteno pro C₂₉H₄₇O₄ [M+H]⁺ 459,3474, nalezeno 459,3475. Vybrané ¹H NMR píky pro 22*E*-izomer (**2bE**): δ 0,67 (s, 3H, CH₃); 0,833 (s, 3H, CH₃); 0,98 (d, 3H, J = 6,7 Hz, CH₃); 5,29 (m, 1H).



(22*Z*)-2*a*,3*a*-Dihydroxy-5*a*-chol-22-en-6-on (sloučenina **3b**)

1M vodný roztok kyseliny chlorovodíkové (0,55 ml) byl přidán do roztoku sloučeniny **2b** (20 mg; 0,045 mmol) v tetrahydrofuranu (4 ml) a reakce byla zahřívána na 40 °C 4 hodiny. Poté byla reakce zředěna ethylacetátem a vytřepána dvakrát vodou. Organická fáze byla vysušena chloridem vápenatým. Rozpouštědla byla odpařena za snížené tlaku a surový produkt byl čištěn sloupcovou chromatografií na silikagelu (60% ethylacetát v cyklohexanu). Byla získána sloučenina **3b** (díky přítomnosti minoritního *E*-izomeru **2bE** ve výchozí sloučenině je v ¹H NMR pozorovatelný i izomer **3bE** v množství cca 5 %).

Bílý prášek, chemický vzorec: C₂₄H₃₈O₃, výtěžek: 15 mg, 92 %. ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz) δ, ppm: δ 0,71 (s, 3H, CH₃); 0,764 (s, 3H, CH₃); 0,97 (d, 3H, J = 6,7 Hz, CH₃); 1,60 (dd, 3H, J = 6,7 a 1,5 Hz, CH₃); 1,92 (dd, 1H, J = 15,1 a 3,2 Hz); 1,97-2,06 (m, 2H); 2,30 (dd, 1H, J = 13,1 a 4,5 Hz); 2,47 (m, 1H); 2,69 (dd, 1H, J = 12,5 a 2,8 Hz); 3,78 (m, 1H, H-2β); 4,05 (m, 1H, H-3β); 5,15 (m, 1H, H-22); 5,28 (m, 1H, H-23). ¹³C NMR δ 12,28, 13,13, 13,55, 20,40, 21,16, 23,89, 26,26, 27,75, 33,65, 37,65, 39,27, 40,17, 42,60, 42,83, 46,74, 50,68, 53,74, 56,04, 56,68, 68,26, 68,36, 120,58, 137,20, 212,22. HRMS (API): *m/z* vypočteno pro C₂₄H₃₉O₃ [M+H]⁺ 375,2899, nalezeno 375,2897. Vybrané ¹H NMR píky pro 22*E*-izomer (**3bE**): δ 0,67 (s, 3H, CH₃); 0,757 (s, 3H, CH₃); 1,00 (d, 3H, J = 6,7 Hz, CH₃); 5,34 (m, 1H).

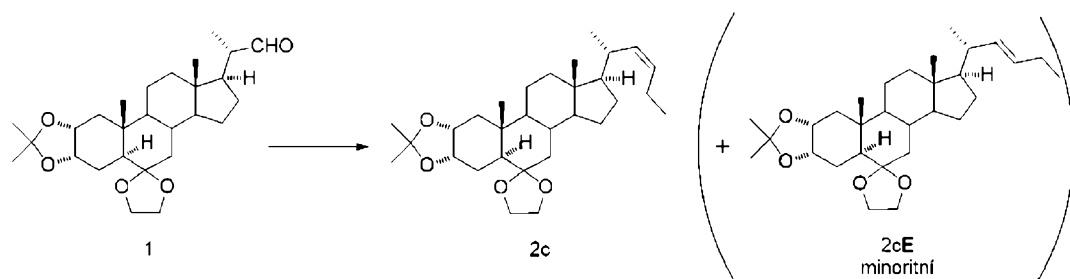


2 α ,3 α -Dihydroxy-5 α -cholan-6-on (sloučenina 4b)

- 5 Palladium na uhlí (12 mg) bylo přidáno do roztoku sloučeniny **3b** s minoritním izomerem **3bE** (12 mg; 0,033 mmol) v tetrahydrofuranu (3 ml) a ethanolu (1 ml). Vzduch z reakční baňky byl evakuován a do reakce byl přidán vodík z balonku. Takto byla reakce míchána 18 hodin. Poté bylo palladium na uhlí odfiltrováno, rozpouštědla odpařena za sníženého tlaku a surový produkt
- 10 čistěn sloupcovou chromatografií na silikagelu (60% ethylacetát v cyklohexanu). Byla získána sloučenina **4b**.

- Bílý prášek, chemický vzorec: C₂₄H₄₀O₃, výtěžek: 10 mg, 83 %. ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz) δ , ppm: δ 0,66 (s, 3H, CH₃); 0,76 (s, 3H, CH₃); 0,87 (t, 3H, J = 7,0 Hz, CH₃); 0,91 (d, 3H, J = 6,4 Hz, CH₃); 1,92 (dd, 1H, J = 15,2 a 3,3 Hz); 1,97-2,08 (m, 2H); 2,30 (dd, 1H, J = 13,2 a 4,6 Hz); 2,68 (dd, 1H, J = 12,6 a 2,9 Hz); 3,77 (m, 1H, H-2 β); 4,05 (m, 1H, H-3 β). ¹³C NMR δ
- 15 11,98, 13,54, 14,52, 18,56, 19,19, 21,18, 23,93, 26,26, 28,01, 35,49, 37,68, 38,20, 39,38, 40,17, 42,60, 42,92, 46,78, 50,69, 53,70, 56,05, 56,66, 68,29, 68,38, 212,26. HRMS (API): m/z vypočteno pro C₂₄H₃₉O₂ [(M-H₂O)+H]⁺ 359,2950, nalezeno 359,2948.

20 Příklad 3

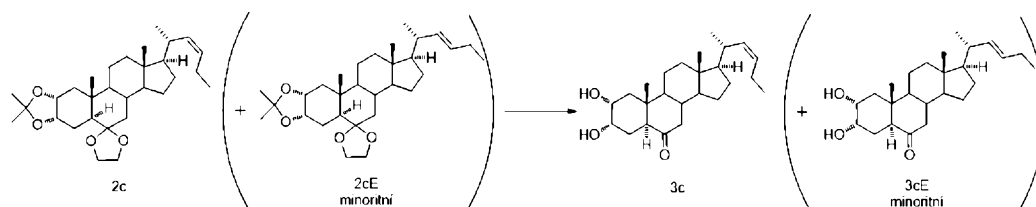


25 (22Z)-2 α ,3 α -(Isopropylidendioxy)-6,6-(ethylenedioxy)-26,27-dinor-5 α -cholest-22-en (sloučenina 2c)

- Do roztoku propyltrifenylfosfonium bromidu (52 mg; 0,135 mmol) v bezvodém tetrahydrofuranu (3 ml) byl přidán roztok *n*-butyllithia v hexanu (1,6 M; 85 μ l; 0,134 mmol). Reakce byla míchána při 0 °C po dobu 30 minut. Poté byl přidán roztok aldehydu **1** (30 mg; 0,067 mmol) v bezvodém
- 30 tetrahydrofuranu (3 ml) a reakce byla pomalu ohřívána na teplotu místnosti a míchána další 2 hodiny. Po ukončení reakce byla směs zředěna ethylacetátem a extrahována dvakrát vodou. Organická fáze byla vysušena chloridem vápenatým. Rozpouštědla byla odpařena za sníženého tlaku a surový produkt byl čistěn sloupcovou chromatografií (7% ethylacetát v cyklohexanu). Byla získána sloučenina **2c** převážně jako *Z* izomer (přibližně 7 % *E* izomeru (**2cE**) je pozorovatelné v ¹H NMR).
- 35

Bezbarvý olej, chemický vzorec: C₃₀H₄₈O₄, výtěžek: 28 mg, 88 %. ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz) δ , ppm: δ 0,70 (s, 3H, CH₃); 0,841 (s, 3H, CH₃); 0,95 (t, 3H, J = 7,4 Hz, CH₃); 0,96 (d, 3H, J =

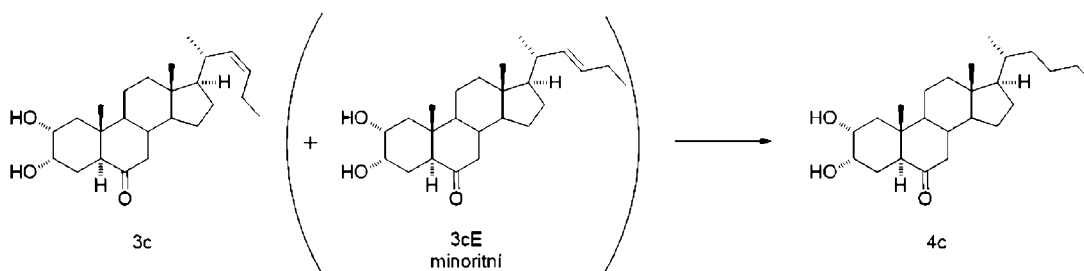
6,7 Hz, CH₃); 1,33 (s, 3H, CH₃); 1,48 (s, 3H, CH₃); 1,91-1,99 (m, 2H); 2,00-2,09 (m, 2H); 2,16 (m, 1H); 2,42 (m, 1H); 3,75 (m, 1H, CH₂O); 3,88-3,97 (m, 3H, CH₂O); 4,11 (m, 1H, H-2β); 4,27 (m, 1H, H-3β); 5,09 (m, 1H, H-22); 5,18 (m, 1H, H-23). ¹³C NMR δ 12,26, 13,38, 14,49, 20,71, 20,80, 20,86, 21,96, 24,13, 26,56, 28,06, 28,61, 32,86, 34,15, 38,00, 39,56, 41,03, 42,37, 42,70, 45,48, 53,01, 55,97, 56,02, 64,16, 65,48, 72,84, 72,95, 107,52, 109,68, 128,22, 135,93. HRMS (API): *m/z* vypočteno pro C₃₀H₄₉O₄ [M+H]⁺ 473,3631, nalezeno 473,3633. Vybrané ¹H NMR píky pro 22*E*-izomer (**2cE**): δ 0,67 (s, 3H, CH₃); 0,838 (s, 3H, CH₃); 0,99 (d, 3H, J = 6,7 Hz, CH₃); 5,33 (m, 1H).



(22*Z*)-2α,3α-Dihydroxy-26,27-dinor-5α-cholest-22-en-6-on (sloučenina 3c)

1M vodný roztok kyseliny chlorovodíkové (0,5 ml) byl přidán do roztoku sloučeniny **2c** (20 mg; 0,042 mmol) v tetrahydrofuranu (4 ml) a reakce byla zahřívána na 40 °C 4 hodiny. Poté byla reakce zředěna ethylacetátem a vytřepána dvakrát vodou. Organická fáze byla vysušena chloridem vápenatým. Rozpouštědla byla odpařena za snížené tlaku a surový produkt byl čistěn sloupcovou chromatografií na silikagelu (60% ethylacetát v cyklohexanu). Byla získána sloučenina **3c** (díky přítomnosti minoritního *E*-izomeru **2cE** ve výchozí sloučenině je v ¹H NMR pozorovatelný i izomer **3cE** v množství cca 7 %).

Bílý prášek, chemický vzorec: C₂₅H₄₀O₃, výtěžek: 15 mg, 91 %. ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz) δ, ppm: δ 0,70 (s, 3H, CH₃); 0,76 (s, 3H, CH₃); 0,95 (t, 3H, J = 7,4 Hz, CH₃); 0,97 (d, 3H, J = 6,7 Hz, CH₃); 1,91 (dd, 1H, J = 15,3 a 3,1 Hz); 1,97-2,07 (m, 2H); 2,29 (dd, 1H, J = 13,1 a 4,6 Hz); 2,43 (m, 1H); 2,68 (dd, 1H, J = 12,5 a 2,8 Hz); 3,77 (m, 1H, H-2β); 4,05 (m, 1H, H-3β); 5,09 (m, 1H, H-22); 5,19 (m, 1H, H-23). ¹³C NMR δ 12,40, 13,68, 14,60, 20,89, 21,00, 21,28, 24,02, 26,40, 28,07, 34,22, 37,78, 39,41, 40,28, 42,73, 42,94, 46,87, 50,80, 53,85, 56,02, 56,82, 68,37, 68,47, 128,61, 135,74, 212,39. HRMS (API): *m/z* vypočteno pro C₂₅H₄₁O₃ [M+H]⁺ 389,3056, nalezeno 389,3053. Vybrané ¹H NMR píky pro 22*E*-izomer (**3bE**): δ 0,67 (s, 3H, CH₃); 0,74 (s, 3H, CH₃); 1,00 (d, 3H, J = 6,7 Hz, CH₃); 5,35 (m, 1H).



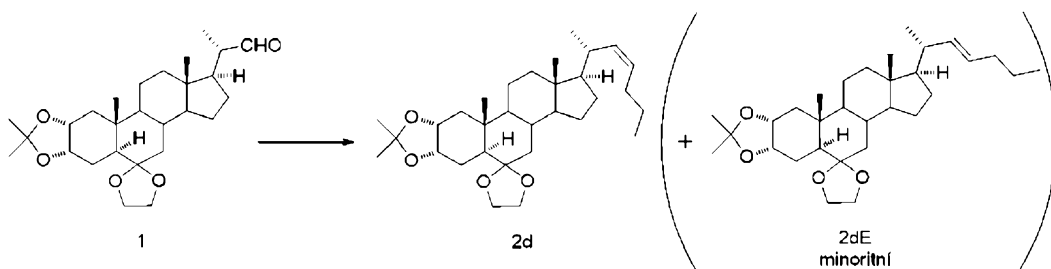
2α,3α-Dihydroxy-26,27-dinor-5α-cholestan-6-on (sloučenina 4c)

Palladium na uhlí (12 mg) bylo přidáno do roztoku sloučeniny **3c** s minoritním izomerem **3cE** (12 mg; 0,031 mmol) v tetrahydrofuranu (3 ml) a ethanolu (1 ml). Vzduch z reakční baňky byl evakuován a do reakce byl přidán vodík z balonku. Takto byla reakce míchána 18 hodin. Poté bylo palladium na uhlí odfiltrováno, rozpouštědla odpařena za snížené tlaku a surový produkt

čištění sloupcovou chromatografií na silikagelu (60% ethylacetát v cyklohexanu). Byla získána sloučenina **4c**.

Bílý prášek, chemický vzorec: $C_{25}H_{42}O_3$, výtěžek: 10 mg, 83 %. 1H NMR ($CDCl_3$, 500 MHz) δ , ppm: δ 0,66 (s, 3H, CH_3); 0,75 (s, 3H, CH_3); 0,89 (t, 3H, $J = 7,0$ Hz, CH_3); 0,91 (d, 3H, $J = 6,4$ Hz, CH_3); 1,91 (dd, 1H, $J = 15,2$ a 3,3 Hz); 1,96-2,07 (m, 2H); 2,30 (dd, 1H, $J = 13,2$ a 4,6 Hz); 2,68 (dd, 1H, $J = 12,6$ a 3,0 Hz); 3,76 (m, 1H, H-2 β); 4,05 (m, 1H, H-3 β). ^{13}C NMR δ 11,98, 13,53, 14,17, 18,61, 21,17, 23,11, 23,92, 26,26, 27,99, 28,28, 30,28, 35,50, 37,68, 39,37, 40,16, 42,59, 42,90, 46,78, 50,69, 53,70, 55,97, 56,65, 68,28, 68,38, 212,32. HRMS (API): m/z vypočteno pro $C_{25}H_{43}O_2 [(M-H_2O)+H]^+$ 391,3212, nalezeno 391,3209.

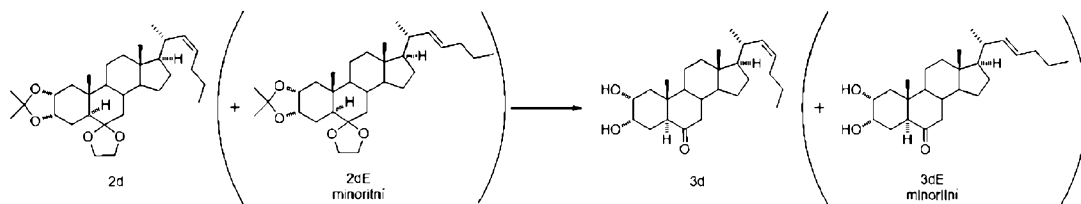
Příklad 4



(22Z)-2 α ,3 α -(Isopropylidendioxy)-6,6-(ethylenedioxy)-27-nor-5 α -cholest-22-en (sloučenina **2d**)

Do roztoku butyltrifenyfosfonium bromidu (54 mg; 0,135 mmol) v bezvodém tetrahydrofuranu (3 ml) byl přidán roztok n-butyllithia v hexanu (1,6 M; 85 μ l; 0,134 mmol). Reakce byla míchána při 0 °C po dobu 30 minut. Poté byl přidán roztok aldehydu **1** (30 mg; 0,067 mmol) v bezvodém tetrahydrofuranu (3 ml) a reakce byla pomalu ohřívána na teplotu místnosti a míchána další 2 hodiny. Po ukončení reakce byla směs zředěna ethylacetátem a extrahována dvakrát vodou. Organická fáze byla vysušena chloridem vápenatým. Rozpouštědla byla odpařena za sníženého tlaku a surový produkt byl čištěn sloupcovou chromatografií (7% ethylacetát v cyklohexanu). Byla získána sloučenina **2d** převážně jako *Z* izomer (20 % *E* izomeru (**2dE**) je pozorovatelné v 1H NMR).

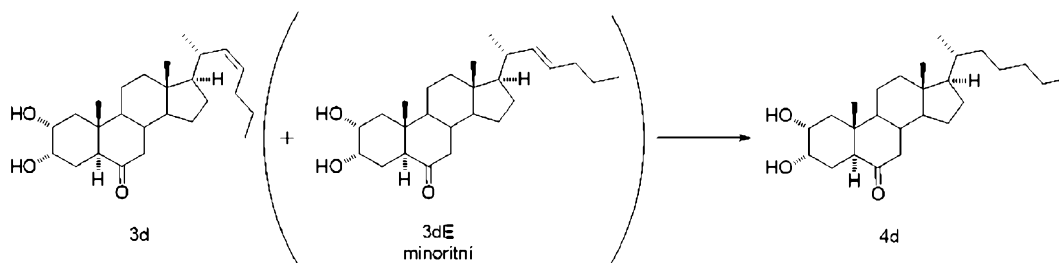
Bezbarvý olej, chemický vzorec: $C_{31}H_{50}O_4$, výtěžek: 27 mg, 82 %. 1H NMR ($CDCl_3$, 500 MHz) δ , ppm: δ 0,70 (s, 3H, CH_3); 0,84 (s, 3H, CH_3); 0,89 (t, 3H, $J = 7,0$ Hz, CH_3); 0,91 (d, 3H, $J = 6,7$ Hz, CH_3); 1,33 (s, 3H, CH_3); 1,48 (s, 3H, CH_3); 1,89-2,09 (m, 5H); 2,15 (m, 1H); 2,42 (m, 1H); 3,75 (m, 1H, CH_2O); 3,88-3,97 (m, 3H, CH_2O); 4,10 (m, 1H, H-2 β); 4,28 (m, 1H, H-3 β); 5,11-5,20 (m, 2H H-22, H-23). ^{13}C NMR δ 12,28, 13,39, 13,91, 20,72, 20,74, 21,97, 22,98, 24,14, 26,57, 28,03, 28,61, 29,67, 32,86, 34,19, 38,01, 39,57, 41,03, 42,37, 42,71, 45,49, 53,02, 55,97, 56,10, 64,17, 65,48, 72,84, 72,96, 107,52, 109,68, 126,44, 136,64. HRMS (API): m/z vypočteno pro $C_{31}H_{51}O_4 [M+H]^+$ 487,3787, nalezeno 487,3783. Vybrané 1H NMR píky pro 22*E*-izomer (**2dE**): δ 0,68 (s, 3H, CH_3); 0,84 (s, 3H, CH_3); 0,87 (t, 3H, $J = 7,0$ Hz, CH_3); 1,00 (d, 3H, $J = 6,7$ Hz, CH_3); 5,28 (m, 1H).



(22*Z*)-2*α*,3*α*-Dihydroxy-27-nor-5*α*-cholest-22-en-6-on (sloučenina 3d)

- 5 1M vodný roztok kyseliny chlorovodíkové (0,5 ml) byl přidán do roztoku sloučeniny **2d** (20 mg; 0,041 mmol) v tetrahydrofuranu (4 ml) a reakce byla zahřívána na 40 °C 4 hodiny. Poté byla reakce zředěna ethylacetátem a vytřepána dvakrát vodou. Organická fáze byla vysušena chloridem vápenatým. Rozpouštědla byla odpařena za snížené tlaku a surový produkt byl čistěn sloupcovou chromatografií na silikagelu (60% ethylacetát v cyklohexanu). Byla získána
- 10 sloučenina **3d** (díky přítomnosti minoritního *E*-izomeru **2dE** ve výchozí sloučenině je v ¹H NMR pozorovatelný i izomer **3dE** v množství 20 %).

- Bílý prášek, chemický vzorec: C₂₅H₄₀O₃, výtěžek: 15 mg, 91 %. ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz) δ, ppm: δ 0,70 (s, 3H, CH₃); 0,764 (s, 3H, CH₃); 0,91 (t, 3H, J = 7,4 Hz, CH₃); 0,97 (d, 3H, J = 6,7 Hz, CH₃); 1,92 (m, 1H); 1,96-2,07 (m, 4H); 2,29 (dd, 1H, J = 13,1 a 4,4 Hz); 2,44 (m, 1H); 2,69 (dd, 1H, J = 12,6 a 2,7 Hz); 3,78 (m, 1H, H-2β); 4,05 (m, 1H, H-3β); 5,11-5,24 (m, 2H, H-22, H-23). ¹³C NMR δ 12,29, 13,56, 13,91, 20,71, 21,16, 22,96, 23,90, 26,26, 27,91, 29,68, 34,14, 37,66, 39,28, 40,16, 42,60, 42,81, 46,74, 50,67, 53,74, 55,97, 56,69, 68,26, 68,35, 126,72, 136,33, 212,25. HRMS (API): *m/z* vypočteno pro C₂₆H₄₃O₃ [M+H]⁺ 403,3212, nalezeno 403,3211. Vybrané ¹H NMR píky pro 22*E*-izomer (**3bE**): δ 0,67 (s, 3H, CH₃); 0,758 (s, 3H, CH₃); 0,87 (t, 3H, J = 7,0 Hz, CH₃); 1,01 (d, 3H, J = 6,7 Hz, CH₃); 5,30 (m, 1H).

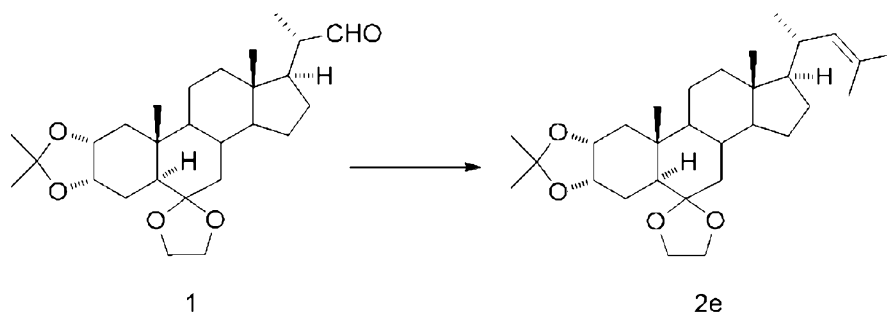


2*α*,3*α*-Dihydroxy-27-nor-5*α*-cholestan-6-on (sloučenina 4d)

- 25 Palladium na uhlí (12 mg) bylo přidáno do roztoku sloučeniny **3d** s minoritním izomerem **3dE** (12 mg; 0,030 mmol) v tetrahydrofuranu (3 ml) a ethanolu (1 ml). Vzduch z reakční baňky byl evakuován a do reakce byl přidán vodík z balonku. Takto byla reakce míchána 18 hodin. Poté bylo palladium na uhlí odfiltrováno, rozpouštědla odpařena za sníženého tlaku a surový produkt čistěn sloupcovou chromatografií na silikagelu (60% ethylacetát v cyklohexanu). Byla získána sloučenina **4d**.

- Bílý prášek, chemický vzorec: C₂₆H₄₄O₃, výtěžek: 10 mg, 83 %. ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz) δ, ppm: δ 0,66 (s, 3H, CH₃); 0,76 (s, 3H, CH₃); 0,89 (t, 3H, J = 7,0 Hz, CH₃); 0,91 (d, 3H, J = 6,4 Hz, CH₃); 1,92 (dd, 1H, J = 15,2 a 3,3 Hz); 1,96-2,07 (m, 2H); 2,30 (dd, 1H, J = 13,2 a 4,6 Hz); 2,68 (dd, 1H, J = 12,6 a 3,0 Hz); 3,77 (m, 1H, H-2β); 4,05 (m, 1H, H-3β). ¹³C NMR δ 11,98, 13,54, 14,13, 18,61, 21,17, 22,73, 23,93, 25,70, 26,26, 27,99, 30,28, 35,64, 35,77, 37,68, 39,37, 40,16, 42,59, 42,91, 46,78, 50,69, 53,70, 55,98, 56,65, 68,29, 68,38, 212,27. HRMS (API): *m/z* vypočteno pro C₂₆H₄₃O₂ [(M-H₂O)+H]⁺ 387,3263, nalezeno 387,3260.

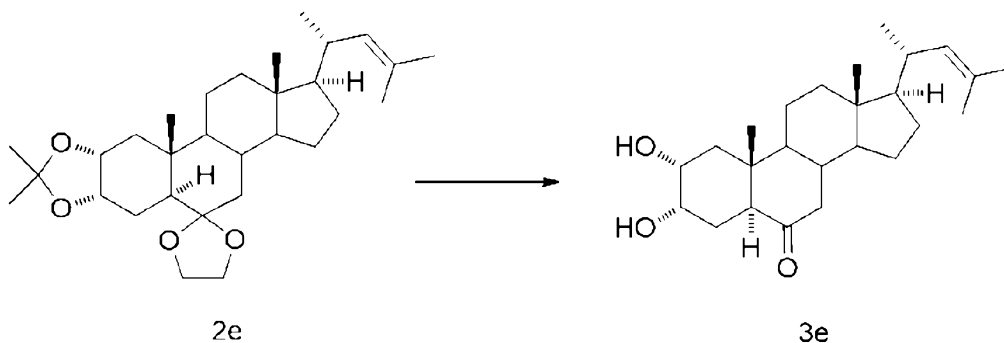
Příklad 5



5 **2 α ,3 α -(Isopropylidendioxy)-6,6-(ethylenedioxy)-23-methyl-5 α -chol-22-en (compound 2e)**

Do roztoku isopropyltrifenylfosfonium bromidu (52 mg; 0,135 mmol) v bezvodém tetrahydrofuranu (3 ml) byl přidán roztok *n*-butyllithia v hexanu (1,6 M; 85 μ l; 0,134 mmol). Reakce byla míchána při 0 °C po dobu 30 minut. Poté byl přidán roztok aldehydu **1** (30 mg; 0,067 mmol) v bezvodém tetrahydrofuranu (3 ml) a reakce byla pomalu ohřívána na teplotu místnosti a míchána další 2 hodiny. Po ukončení reakce byla směs zředěna ethylacetátem a extrahována dvakrát vodou. Organická fáze byla vysušena chloridem vápenatým. Rozpouštědla byla odpařena za sníženého tlaku a surový produkt byl čištěn sloupcovou chromatografií (7% ethylacetát v cyklohexanu). Byla získána sloučenina **2e**.

15 Bezbarvý olej, chemický vzorec: C₃₀H₄₈O₄, výtěžek: 25 mg, 79 %. ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz) δ , ppm: δ 0,70 (s, 3H, CH₃); 0,84 (s, 3H, CH₃); 0,93 (d, 3H, J = 6,4 Hz, CH₃); 1,33 (s, 3H, CH₃); 1,48 (s, 3H, CH₃); 1,60 (d, 3H, J = 0,9 Hz, CH₃); 1,64 (d, 3H, J = 0,7 Hz, CH₃); 1,91-1,99 (m, 2H); 2,15 (m, 1H); 2,31 (m, 1H); 3,74 (m, 1H, CH₂O); 3,88-3,98 (m, 3H, CH₂O); 4,10 (m, 1H, H-2 β); 4,27 (m, 1H, H-3 β); 4,89 (d, 1H, J = 9,6 Hz, H-22). ¹³C NMR δ 12,25, 13,38, 18,08, 20,63, 20,73, 21,96, 24,10, 25,75, 26,57, 27,93, 28,62, 32,86, 35,01, 38,01, 39,56, 41,04, 42,32, 42,71, 45,49, 53,03, 55,99, 56,67, 64,16, 65,48, 72,85, 72,97, 107,53, 109,70, 127,57, 131,90. HRMS (API): *m/z* vypočteno pro C₃₀H₄₉O₄ [M+H]⁺ 473,3631, nalezeno 473,3629.



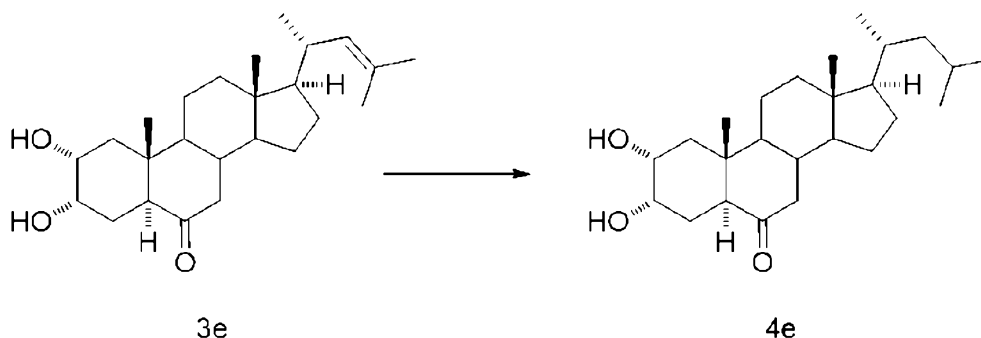
25

2 α ,3 α -Dihydroxy-23-methyl-5 α -chol-22-en-6-on (sloučenina 3e)

1M vodný roztok kyseliny chlorovodíkové (0,5 ml) byl přidán do roztoku sloučeniny **2e** (20 mg; 0,042 mmol) v tetrahydrofuranu (4 ml) a reakce byla zahřívána na 40 °C 4 hodiny. Poté byla reakce zředěna ethylacetátem a vytřepána dvakrát vodou. Organická fáze byla vysušena chloridem vápenatým. Rozpouštědla byla odpařena za snížené tlaku a surový produkt byl čištěn sloupcovou chromatografií na silikagelu (60% ethylacetát v cyklohexanu). Byla získána sloučenina **3e**.

35

Bílý prášek, chemický vzorec: $C_{25}H_{40}O_3$, výtěžek: 13 mg, 79 %. 1H NMR ($CDCl_3$, 500 MHz) δ , ppm: δ 0,69 (s, 3H, CH_3); 0,75 (s, 3H, CH_3); 0,93 (d, 3H, J = 6,7 Hz, CH_3); 1,59 (s, 3H, CH_3); 1,65 (s, 3H, CH_3); 1,87-2,04 (m, 4H); 2,20-2,36 (m, 3H); 2,68 (dd, 1H, J = 12,5 and 2,7 Hz); 3,77 (m, 1H, H-2 β); 4,04 (m, 1H, H-3 β); 4,88 (d, 1H, J = 9,6 Hz, H-22). ^{13}C NMR δ 12,26, 13,55, 18,08, 20,62, 21,16, 23,85, 25,74, 27,76, 29,67, 34,92, 37,67, 39,27, 40,13, 42,61, 42,76, 46,75, 50,69, 53,74, 56,53, 56,70, 68,23, 68,33, 127,87, 131,57, 212,39. HRMS (API): m/z vypočteno pro $C_{25}H_{41}O_3$ $[M+H]^+$ 389,3056, nalezeno 389,3059.

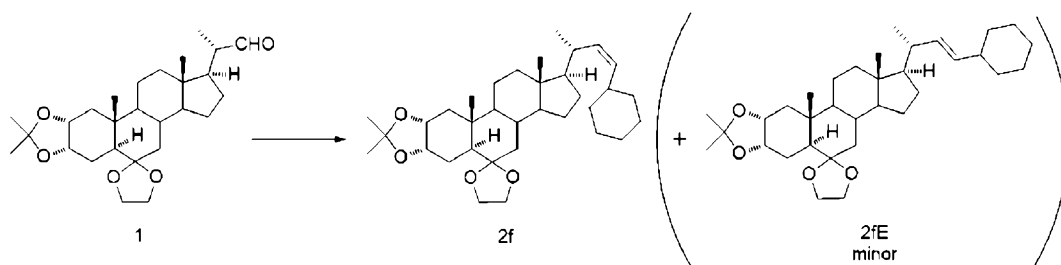


2 α ,3 α -Dihydroxy-23-methyl-5 α -cholan-6-on (sloučenina 4e)

Palladium na uhlí (12 mg) bylo přidáno do roztoku sloučeniny **3e** (12 mg; 0,031 mmol) v tetrahydrofuranu (3 ml) a ethanolu (1 ml). Vzduch z reakční baňky byl evakuován a do reakce byl přidán vodík z balonku. Takto byla reakce míchána 48 hodin. Poté bylo palladium na uhlí odfiltrováno, rozpouštědla odpařena za sníženého tlaku a surový produkt čištěn sloupcovou chromatografií na silikagelu (60% ethylacetát v cyklohexanu). Byla získána sloučenina **4e**.

Bílý prášek, chemický vzorec: $C_{25}H_{40}O_3$, výtěžek: 11 mg, 91 %. 1H NMR ($CDCl_3$, 500 MHz) δ , ppm: δ 0,68 (s, 3H, CH_3); 0,76 (s, 3H, CH_3); 0,81 (d, 3H, J = 6,4 Hz, CH_3); 0,87 (d, 3H, J = 6,7 Hz, CH_3); 0,89 (d, 3H, J = 6,7 Hz, CH_3); 1,84-1,93 (m, 2H); 2,00 (t, 1H, J = 2,7 Hz); 2,07 (m, 1H); 2,30 (dd, 1H, J = 13,1 and 4,6 Hz); 2,68 (bd, 1H, J = 12,2 Hz); 3,80 (vbs, 1H, H-2 β); 4,05 (bs, 1H, H-3 β). ^{13}C NMR δ 12,01, 13,55, 18,53, 21,17, 21,32, 23,92, 24,54, 24,85, 28,25, 33,79, 37,66, 39,43, 40,15, 42,59, 43,00, 45,64, 46,76, 50,66, 53,69, 56,69, 56,95, 68,20, 68,29, 212,26. HRMS (API): m/z vypočteno pro $C_{25}H_{41}O_3$ $[M+H]^+$ 389,3056, nalezeno 389,3059.

Příklad 6

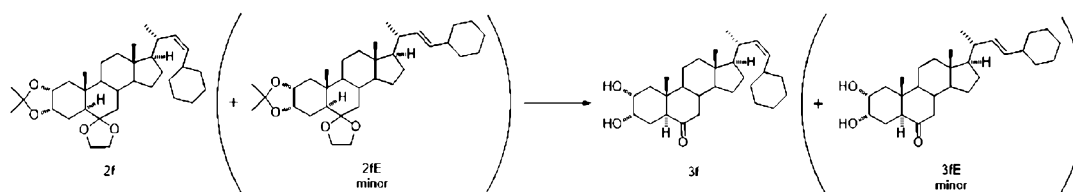


(22Z)-23-Cyklohexyl-2 α ,3 α -(Isopropylidendioxy)-6,6-(ethylenedioxy)-24-nor-5 α -chol-22-en (sloučenina 2f)

Do roztoku (cyklohexyl)methyltrifenylfosfonium bromidu (59 mg; 0,134 mmol) v bezvodém tetrahydrofuranu (3 ml) byl přidán roztok *n*-butyllithia v hexanu (1,6 M; 85 μ l; 0,134 mmol). Reakce byla míchána při 0 °C po dobu 30 minut. Poté byl přidán roztok aldehydu **1** (30 mg; 0,067 mmol) v bezvodém tetrahydrofuranu (3 ml) a reakce byla pomalu ohřívána na teplotu

místnosti a míchána další 2 hodiny. Po ukončení reakce byla směs zředěna ethylacetátem a extrahována dvakrát vodou. Organická fáze byla vysušena chloridem vápenatým. Rozpouštědla byla odpařena za sníženého tlaku a surový produkt byl čištěn sloupcovou chromatografií (7% ethylacetát v cyklohexanu). Byla získána sloučenina **2f** převážně jako *Z* izomer (přibližně 5 % *E* izomeru (**2fE**) je pozorovatelné v ¹H NMR).

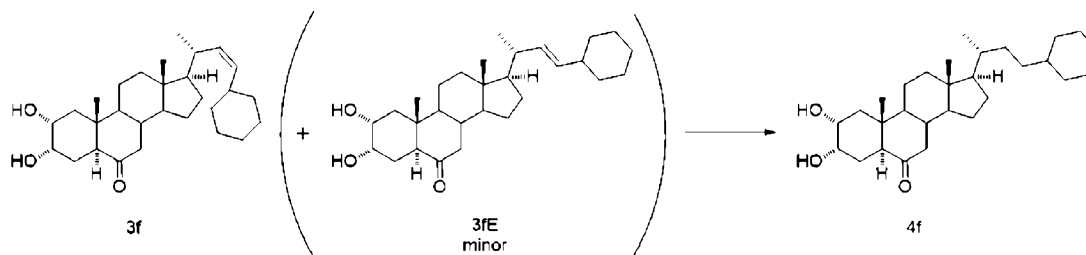
Bezbarvý olej, chemický vzorec: C₃₄H₅₄O₄, výtěžek: 28 mg, 79 %. ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz) δ, ppm: δ 0,71 (s, 3H, CH₃); 0,85 (s, 3H, CH₃); 0,96 (t, 3H, J = 6,9 Hz, CH₃); 1,33 (s, 3H, CH₃); 1,48 (s, 3H, CH₃); 1,91-2,00 (m, 2H); 2,12-2,29 (m, 2H); 2,40 (m, 1H); 3,75 (m, 1H, CH₂O); 3,89-3,98 (m, 3H, CH₂O); 4,10 (m, 1H, H-2β); 4,27 (m, 1H, H-3β); 4,97-5,05 (m, 2H, H-22, H-23). ¹³C NMR δ 12,32, 13,41, 20,74, 21,27, 21,97, 24,16, 25,95, 26,06, 26,57, 26,87, 28,26, 28,62, 29,69, 32,87, 33,26, 33,71, 34,62, 36,57, 38,02, 39,60, 41,03, 42,37, 42,72, 45,50, 53,03, 56,01, 64,18, 65,49, 72,86, 72,97, 107,54, 109,70, 132,75, 134,59. HRMS (API): *m/z* vypočteno pro C₃₄H₅₅O₄ [M+H]⁺ 527,4100, nalezeno 527,4098. Vybrané ¹H NMR píky pro 22*E*-izomer (**2fE**): δ 0,67 (s, 3H, CH₃); 0,84 (s, 3H, CH₃); 1,00 (d, 3H, J = 6,7 Hz, CH₃); 5,35 (m, 1H).



(22*Z*)-23-Cyklohexyl-2*a*,3*a*-dihydroxy-24-nor-5*a*-chol-22-en-6-on (sloučenina **3f**)

1M vodný roztok kyseliny chlorovodíkové (0,5 ml) byl přidán do roztoku sloučeniny **2f** (20 mg; 0,038 mmol) v tetrahydrofuranu (4 ml) a reakce byla zahřívána na 40 °C 4 hodiny. Poté byla reakce zředěna ethyl-acetátem a vytřepána dvakrát vodou. Organická fáze byla vysušena chloridem vápenatým. Rozpouštědla byla odpařena za snížené tlaku a surový produkt byl čištěn sloupcovou chromatografií na silikagelu (60% ethylacetát v cyklohexanu). Byla získána sloučenina **3f** (díky přítomnosti minoritního *E*-izomeru **2fE** ve výchozí sloučenině je v ¹H NMR pozorovatelný i izomer **3fE** v množství 5 %).

Bílý prášek, chemický vzorec: C₂₉H₄₆O₃, výtěžek: 12 mg, 71 %. ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz) δ, ppm: δ 0,71 (s, 3H, CH₃); 0,76 (s, 3H, CH₃); 0,98 (d, 3H, J = 6,7 Hz, CH₃); 1,91 (m, 1H); 1,96-2,07 (m, 3H); 2,22 (m, 1H); 2,28 (dd, 1H, J = 13,1 and 4,5 Hz); 2,41 (m, 1H); 2,68 (dd, 1H, J = 12,7 and 2,6 Hz); 3,78 (m, 1H, H-2β); 4,05 (m, 1H, H-3β); 4,98-5,05 (m, 2H, H-22, H-23). ¹³C NMR δ 12,31, 13,56, 21,16, 21,21, 23,91, 25,91, 26,02, 28,17, 29,67, 30,27, 33,22, 33,68, 34,59, 36,59, 37,66, 39,30, 40,15, 42,61, 42,79, 46,74, 50,69, 53,73, 55,85, 56,72, 68,25, 68,32, 132,98, 134,27, 212,30. HRMS (API): *m/z* vypočteno pro C₂₉H₄₇O₃ [M+H]⁺ 443,3525, nalezeno 443,3522. Vybrané ¹H NMR píky pro 22*E*-izomer (**3fE**): δ 0,67 (s, 3H, CH₃); 0,75 (s, 3H, CH₃); 1,00 (d, 3H, J = 6,7 Hz, CH₃); 5,35 (m, 1H).



23-Cyklohexyl-2 α ,3 α -dihydroxy-24-nor-5 α -cholan-6-on (sloučenina 4f)

- Palladium na uhlí (12 mg) bylo přidáno do roztoku sloučeniny **3f** s minoritním izomerem **3df** (12 mg; 0,027 mmol) v tetrahydrofuranu (3 ml) a ethanolu (1 ml). Vzduch z reakční baňky byl evakuován a do reakce byl přidán vodík z balonku. Takto byla reakce míchána 18 hodin. Poté bylo palladium na uhlí odfiltrováno, rozpouštědla odpařena za sníženého tlaku a surový produkt čištěn sloupcovou chromatografií na silikagelu (60% ethylacetát v cyklohexanu). Byla získána sloučenina **4f**.
- Bílý prášek, chemický vzorec: C₂₉H₄₈O₃, výtěžek: 11 mg, 91 %. ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz) δ , ppm: δ 0,66 (s, 3H, CH₃); 0,76 (s, 3H, CH₃); 0,91 (d, 3H, J = 6,7 Hz, CH₃); 1,91 (m 1H); 1,97-2,07 (m, 2H); 2,30 (dd, 1H, J = 13,1 a 4,6 Hz); 2,68 (bd, 1H, J = 12,4 Hz); 3,79 (m, 1H, H-2 β); 4,06 (m, 1H, H-3 β).
- ¹³C NMR δ 11,99, 13,55, 18,65, 21,18, 23,94, 25,59, 26,42, 26,47, 26,77, 27,97, 32,92, 33,19, 33,71, 33,88, 35,80, 37,68, 38,06, 39,37, 40,16, 42,59, 42,91, 46,78, 50,68, 53,72, 55,89, 56,64, 68,27, 68,36, 212,22. HRMS (API): *m/z* vypočteno pro C₂₉H₄₈O₃ [M+H]⁺ 445,3682, nalezeno 445,3680.

Tabulka 1. Sterolové deriváty vzorce I připravené analogicky na základě výše uvedených postupů

	substituenty				CH analýza	MS analýza
	R1	R2	R3	R4	[%C, %H] [vypoč./nalezeno]	[M+H] ⁺
4	H	OH	H	H	79,71/79,68, 11,05/11,08	347
5	OH	H	H	H	79,71/79,69, 11,05/11,06	347
6	OH	OH	H	H	76,20/76,18, 10,56/10,59	363
13	H	OH	methyl	H	79,94/79,91, 11,18/11,21	361
14	OH	H	methyl	H	79,94/79,93, 11,18/11,20	361
15	OH	OH	methyl	H	76,55/76,51, 10,71/10,74	377
19	H	OH	methyl	methyl	80,16/80,14, 11,30/11,33	375
20	OH	H	methyl	methyl	80,16/80,13, 11,30/11,33	375
21	OH	OH	methyl	methyl	76,87/76,85, 10,84/10,88	391
28	H	OH	ethyl	H	80,16/80,14, 11,30/11,33	375
29	OH	H	ethyl	H	80,16/80,15, 11,30/11,34	375
30	OH	OH	ethyl	H	76,87/76,85, 10,84/10,86	391
34	H	OH	ethyl	ethyl	80,54/80,53, 11,51/11,52	403
35	OH	H	ethyl	ethyl	80,54/80,52, 11,51/11,51	403
36	OH	OH	ethyl	ethyl	77,46/77,44, 11,07/11,09	419
43	H	OH	ethyl	(23R)-methyl	80,35/80,31, 11,41/11,46	389
44	OH	H	ethyl	(23R)-methyl	80,35/80,30, 11,41/11,46	389
45	OH	OH	ethyl	(23R)-methyl	77,18/77,15, 10,96/10,99	405
46	H	OH	ethyl	(23S)-methyl	80,35/80,30, 11,41/11,47	389
47	OH	H	ethyl	(23S)-methyl	80,35/80,30, 11,41/11,47	389
48	OH	OH	ethyl	(23S)-methyl	77,18/77,14, 10,96/11,01	405
55	H	OH	n-propyl	H	80,35/80,31, 11,41/11,45	389

56	OH	H	n-propyl	H	80,35/80,32, 11,41/11,43	389
57	OH	OH	n-propyl	H	77,18/77,16, 10,96/11,00	405
64	H	OH	isopropyl	H	80,35/80,33, 11,41/11,43	389
65	OH	H	isopropyl	H	80,35/80,33, 11,41/11,45	389
66	OH	OH	isopropyl	H	77,18/77,15, 10,96/10,99	405
73	H	OH	n-butyl	H	80,54/80,52, 11,51/11,54	403
74	OH	H	n-butyl	H	80,54/80,53, 11,51/11,52	403
75	OH	OH	n-butyl	H	77,46/77,44, 11,07/11,09	419
82	H	OH	(<i>R</i>)-but-2-yl	H	80,54/80,53, 11,51/11,52	403
83	OH	H	(<i>R</i>)-but-2-yl	H	80,54/80,51, 11,51/11,55	403
84	OH	OH	(<i>R</i>)-but-2-yl	H	77,46/77,45, 11,07/11,08	419
91	H	OH	(<i>S</i>)-but-2-yl	H	80,54/80,52, 11,51/11,53	403
92	OH	H	(<i>S</i>)-but-2-yl	H	80,54/80,52, 11,51/11,54	403
93	OH	OH	(<i>S</i>)-but-2-yl	H	77,46/77,45, 11,07/11,09	419
100	H	OH	<i>terc</i> -butyl	H	80,54/80,52, 11,51/11,54	403
101	OH	H	<i>terc</i> -butyl	H	80,54/80,53, 11,51/11,54	403
102	OH	OH	<i>terc</i> -butyl	H	77,46/77,45, 11,07/11,08	419
109	H	OH	isobutyl	H	80,54/80,51, 11,51/11,55	403
110	OH	H	isobutyl	H	80,54/80,53, 11,51/11,53	403
111	OH	OH	isobutyl	H	77,46/77,44, 11,07/11,10	419
118	H	OH	n-pentyl	H	80,71/80,68, 11,61/11,65	417
119	OH	H	n-pentyl	H	80,71/80,67, 11,61/11,66	417
120	OH	OH	n-pentyl	H	77,72/77,70, 11,18/11,21	433
127	H	OH	3-methylbut-1-yl	H	80,71/80,69, 11,61/11,64	417
128	OH	H	3-methylbut-1-yl	H	80,71/80,68, 11,61/11,65	417
129	OH	OH	3-methylbut-1-yl	H	77,72/77,70, 11,18/11,20	433
136	H	OH	(<i>R</i>)-2-methyl-but-1-yl	H	80,71/80,68, 11,61/11,64	417
137	OH	H	(<i>R</i>)-2-methyl-but-1-yl	H	80,71/80,69, 11,61/11,63	417
138	OH	OH	(<i>R</i>)-2-methyl-but-1-yl	H	77,72/77,69, 11,18/11,21	433
145	H	OH	(<i>S</i>)-2-methyl-but-1-yl	H	80,71/80,68, 11,61/11,64	417
146	OH	H	(<i>S</i>)-2-methyl-but-1-yl	H	80,71/80,68, 11,61/11,63	417
147	OH	OH	(<i>S</i>)-2-methyl-but-1-yl	H	77,72/77,69, 11,18/11,22	433
154	H	OH	(<i>R</i>)-3-methyl-but-2-yl	H	80,71/80,67, 11,61/11,65	417
155	OH	H	(<i>R</i>)-3-methyl-but-2-yl	H	80,71/80,68, 11,61/11,64	417
156	OH	OH	(<i>R</i>)-3-methyl-but-2-yl	H	77,72/77,70, 11,18/11,20	433
163	H	OH	(<i>S</i>)-3-methyl-but-2-yl	H	80,71/80,69, 11,61/11,64	417
164	OH	H	(<i>S</i>)-3-methyl-but-2-yl	H	80,71/80,70, 11,61/11,63	417
165	OH	OH	(<i>S</i>)-3-methyl-but-2-yl	H	77,72/77,69, 11,18/11,23	433
172	H	OH	(<i>R</i>)-pent-2-yl	H	80,71/80,69, 11,61/11,64	417
173	OH	H	(<i>R</i>)-pent-2-yl	H	80,71/80,68, 11,61/11,64	417
174	OH	OH	(<i>R</i>)-pent-2-yl	H	77,72/77,70, 11,18/11,22	433

181	H	OH	(S)-pent-2-yl	H	80,71/80,69, 11,61/11,65	417
182	OH	H	(S)-pent-2-yl	H	80,71/80,67, 11,61/11,66	417
183	OH	OH	(S)-pent-2-yl	H	77,72/77,68, 11,18/11,23	433
190	H	OH	pent-3-yl	H	80,71/80,67, 11,61/11,66	417
191	OH	H	pent-3-yl	H	80,71/80,67, 11,61/11,65	417
192	OH	OH	pent-3-yl	H	77,72/77,70, 11,18/11,22	433
196	H	OH	1,2-ethylen		80,59/80,55, 10,82/10,83	373
197	OH	H	1,2-ethylen		80,59/80,54, 10,82/10,79	373
198	OH	OH	1,2-ethylen		77,27/77,30, 10,38/10,40	389
202	H	OH	trimethylen		80,77/80,74, 10,95/10,96	387
203	OH	H	trimethylen		80,77/80,75, 10,95/10,98	387
204	OH	OH	trimethylen		77,56/77,52, 10,51/10,53	403
208	H	OH	tetramethylen		80,94/80,92, 11,07/11,10	401
209	OH	H	tetramethylen		80,94/80,93, 11,07/11,09	401
210	OH	OH	tetramethylen		77,83/77,81, 10,64/10,66	417
214	H	OH	pentamethylen		81,10/81,08, 11,18/11,20	415
215	OH	H	pentamethylen		81,10/81,06, 11,18/11,22	415
216	OH	OH	pentamethylen		78,09/78,05, 10,77/10,79	431
223	H	OH	cyklopropyl	H	80,77/80,74, 10,95/11,00	387
224	OH	H	cyklopropyl	H	80,77/80,73, 10,95/11,02	387
225	OH	OH	cyklopropyl	H	77,56/77,51, 10,51/10,56	403
232	H	OH	cyklobutyl	H	80,94/80,92, 11,07/11,10	401
233	OH	H	cyklobutyl	H	80,94/80,90, 11,07/11,11	401
234	OH	OH	cyklobutyl	H	77,83/77,80, 10,64/10,67	417
241	H	OH	cyklopentyl	H	81,10/81,04, 11,18/11,23	415
242	OH	H	cyklopentyl	H	81,10/81,06, 11,18/11,21	415
243	OH	OH	cyklopentyl	H	78,09/78,06, 10,77/10,81	431
250	H	OH	cyklohexyl	H	81,25/81,20, 11,29/11,34	429
251	OH	H	cyklohexyl	H	81,25/81,19, 11,29/11,35	429
252	OH	OH	cyklohexyl	H	78,33/78,28, 10,88/10,92	445

Příklad 6 – Test životaschopnosti na neuronům podobných lidských buňkách SH-SY5Y

- Lidská neuroblastomová linie SH-SY5Y (ATCC® CRL-2266), získána z ECACC (The European Collection of Authenticated Cell Cultures) byla kultivována v Eaglově médiu modifikovaném podle Dulbecca a Hamově F12 Nutrient mixu (Dulbecco's modified Eagle's Medium and Ham's F12 Nutrient Mixture (DMEM:F-12, 1:1) s 1% penicilin/streptomycin mixu v inkubátoru při 37 °C v 5% CO₂, 95% vzduch a humifikované atmosféře, Test byl proveden v 96-jamkové desce se 7000 buňkami SH-SY5Y na jamku, Další den SH-SY5Y buňky podstoupily diferenciační proceduru pomocí all-trans retinové kyseliny (ATRA) po dobu 48 h (ATRA 10 µM), Po 48 h, bylo staré DMEM/F12 médium zaměněno čerstvým médiem obsahujícím testované látky v koncentracích 0,1, 1 a 10 µM po dobu 24 h, Testované látky byly rozpuštěny v DMSO a přidány do média, Maximální koncentrace DMSO v médiu byla udržována pod 0,1 % (v/v), Viabilita byla měřena pomocí Calcein AM (1mg/ml, ThermoFisher) viabilitního testu, Roztok Calcein AM v PBS (0,75 µM) byl napipetován k buňkám a inkubován po dobu 50 min, Poté byla

měření fluorescence při 488/517 nm (excitace/emise) pomocí mikrodestičkového readeru Infinite M200 (TECAN), Calcein AM test viability je založen na štěpení nefluoreskujícího barviva (Calcein-AM) pomocí intracelulárních esteráz živých buněk na fluoreskující barvivo (Calcein), zatímco umírající buňky tuto schopnost ztrácí, Hodnoty v tabulce 2 ukazují % viability (životaschopnosti), vztažené ke kontrole pro všechny testované sloučeniny, Kontrola (médium s DMSO, <0,1 % (obj./obj.)) byla postulována jako 100% viability (viz první řádek tabulky), Jak je uvedeno v tabulce 2, bylo prokázáno, že žádné deriváty neindukují snížení viability,

Tabulka 2. Účinek nových sloučenin na viabilitu lidské neuroblastomové linie SH-SY5Y (neuronům-podobný fenotyp) po 24 hodinách aplikace, Data jsou vyjádřena jako procenta DMSO kontroly jako průměr $\pm$ SEM dvou nezávislých experimentů v triplicátu,

Viabilita (% DMSO kontroly)						
DMSO kontrola	průměr: 100			SEM $\pm$: 0,95		
Sloučenina	0,1 μ M	SEM $\pm$	1 μ M	SEM $\pm$	10 μ M	SEM $\pm$
57	105,90	2,86	108,90	3,93	117,10	3,31
30	99,41	3,13	102,30	4,14	104,70	3,13
15	98,20	2,53	106,40	1,82	120,60	2,26
111	106,90	4,19	107,80	3,02	109,90	1,37
6	101,30	3,94	104,80	4,84	122,10	4,86
R-LA	0,5 μ M	SEM $\pm$	5 μ M	SEM $\pm$	50 μ M	SEM $\pm$
	96,12	2,68	96,93	3,59	101,2	2,09
DFO	1 μ M	SEM $\pm$	10 μ M	SEM $\pm$	100 μ M	SEM $\pm$
	105,7	8,48	105,5	8,49	109,5	5,92

*DMSO – dimethylsulfoxid; R-LA – kyselina R-lipoová; DFO – deferoxamin, Látky byly testovány v neuroprotektivně aktivních koncentracích,

Příklad 17 Neuroprotektivní efekt látek na glutamát-indukovaném oxidativním poškození lidských neuronálních SH-SY5Y buňkách

Podobně jako v předchozím testu byl test proveden v 96-jamkových mikrodestičkách s 20 000 buňkami na jamku, Den po vysetí buněk, SH-SY5Y byly podrobeny 48-hodinové diferenciaci pomocí all trans retinové kyseliny (ATRA) (ATRA 10 μ M), Po 48 hodinách bylo staré médium DMEM / F12 zaměněno čerstvým médiem obsahujícím 160 mM glutamátu (Glu) bez nebo s testovanými sloučeninami v koncentracích 0,1, 1 a 10 μ M, Jako pozitivní kontroly byla použita kyselina R-lipoová (R-LA) při 0,5, 5, 50 μ M a deferoxamin (DFO) při 1, 10 a 100 μ M, Po 24 hodinách byla buněčná smrt kvantifikována barvením propidium jodidem (PI) podle literatury (Stone et al., BMC Cell Biol, 2003, 4, 1) s modifikacemi.

Obecně je barvení PI spojeno s poškozenou buněčnou membránou nebo přítomností umírajících buněk (Stone et al., BMC Cell Biol, 2003, 4, 1), Kvůli ztrátě adherence byly poškozené nebo mrtvé buňky barveny roztokem PI přímo v médiu v konečné koncentraci 1,5 μ M a inkubovány při pokojové teplotě po dobu 15 až 25 minut při pokojové teplotě, Buňky barvené PI byly kvantifikovány při 535/617 nm (excitace/emise) pomocí čtečky mikrodestiček Infinite M200 Pro (Tecan), Buněčná smrt generovaná 160 mM Glu byla považována za 100 % buněčné smrti (tj, kontrola, se kterou je srovnáváno v tabulce 3), takže bylo pozorováno snížení buněčné smrti (neuroprotektivní účinek), Aplikace 160 mM Glu vedlo k přibližně 5-krát vyšší buněčné smrti ve srovnání s kontrolou DMSO, Jak je vidět z tabulky 3 a obr, 1, všechny testované sloučeniny při 10 μ M prokázaly srovnatelný nebo vyšší neuroprotektivní účinek než pozitivní kontroly, Konkrétně byl nejvyšší účinek pozorován v případě sloučenin **15** a **6** při 10 μ M s dvojnásobným

neuroprotektivním účinkem než R-LA, Dále sloučeniny vykazovaly vyšší účinnost než pozitivní kontroly kvůli skutečnosti, že neuroprotektivního účinku bylo dosaženo při řádově nižších koncentracích (5 až 10krát),

5 **Tabulka 3. Neuroprotektivní účinek nových sloučenin na lidské neuroblastomové linii SH-SY5Y (neuronální fenotyp)**

Sloučenina	Neuroprotektivní efekt (% snížení buněčné smrti oproti kontrole)			p hodnota
	0,5 μ M	5 μ M	50 μ M	
R-LA	N/A	N/A	13,49	>0,001
	1 μM	10 μM	100 μM	
DFO	N/A	19,94	23,55	>0,001
	0,1 μM	1 μM	10 μM	
57	N/A	15,99	24,88	>0,001
30	N/A	N/A	23,17	>0,001
15	N/A	N/A	30,08	>0,001
111	N/A	N/A	26,52	>0,001
6	N/A	15,00	33,70	>0,001

N/A = žádná protekce; Data jsou vyjádřena jako rozdíl mezi průměry skupin 160mM Glu a co-treatmentu (sloučeniny), se statistickou významností (ANOVA, Tukey post hoc test),

10

Příklad 18 Měření oxidačního stresu na buněčné linii lidského neuroblastomu SH-SY5Y - model PD indukovaný glutamátem

Podobně jako v předchozím testu, buňky rostoucí na 96-jamkových mikrodestičkách v denzitě 20000 buňkami na jamku podstoupily diferenciaci a testovací proceduru pro glutamátový model, Po 4 hodinách společného ošetření s glutamátem byla kvantifikována tvorba superoxidových radikálů jakožto marker oxidačního stresu (dle Kim et al, 2017, J, Med, Food, 20, 140–151 s drobnými modifikacemi), Stručně, neuronům-podobné SH-SY5Y buňky byly centrifugovány při 500 g po dobu 5 minut a 30 sekund, poté bylo médium vyměněno za roztok 10 μ M dihydroethidia (DHE) v fosfátovém pufru (PBS) a ponecháno při pokojové teplotě po dobu 30 minut, Po 30 minutách bylo DHE měřeno při 500 nm/580 nm (excitace/emise) pomocí Infinite M200 Pro (Tecan) mikrodestičkového readeru,

DHE je barvivo propustné pro buňky, které je selektivní vůči detekci superoxidových radikálů, Celkový oxidační stres dosažený 160 mM Glu byl považován za 100%, takže bylo pozorováno snížení oxidačního stresu (OS redukční efekt), Jak je uvedeno v tabulce 4 a na obr, 2, 160 mM Glu vyvolalo 2,6-násobné zvýšení tvorby superoxidových radikálů, Co je důležitější, že všechny příklady při 10 μ M prokázaly srovnatelný nebo mírně lepší účinek snížení oxidačního stresu než antioxidant R-LA, zatímco úplně překonaly DFO, Dohromady všechny příklady ukázaly vyšší účinnost než pozitivní kontroly z hlediska koncentrací odpovědných za aktivitu snižující OS (5 až 10krát účinnější než pozitivní kontroly),

30

Tabulka 4, Oxidativní stress indukovaný glutamátem a aktivita nových sloučenin ve snížení oxidativního stresu, testováno na neuronálních SH-SY5Y buňkách,

Tvorba superoxidových radikálů (oxidativní stres), % kontroly (Glu 160 mM)				
	Průměr		±SEM	
DMSO negativní kontrola	38,18		0,74	
Glu 160 mM kontrola	100		1,52	
Sloučeniny	1 μM	±SEM	10 μM	±SEM
57	93,34	3,83	83,99	5,33
30	84,54	3,88	81,08	3,25
15	98,27	4,65	85,61	3,28
111	89,17	4,8	80,21	3,31
6	85,36	3,38	80,19	2,95
R-LA	5 μM	±SEM	50 μM	±SEM
	86,72	5,07	83,91	4,33
DFO	10 μM	±SEM	100 μM	±SEM
	87,06	2,39	92,61	2,2

Data představují procenta 160 mM Glu kontroly, průměr ± SEM tři nezávislých experimentů,

5

Příklad 19 – Farmaceutické přípravky

Farmaceutické přípravky pro obvykle obsahují 0,1 až 99 % z hmotnosti, obzvláště 0,1 až 95 % hmotnosti, účinných látek obsahujících sterolový derivát podle tohoto vynálezu, 1 až 99,9 % hmotnosti alespoň jednoho pevného nebo kapalné pomocné látky, a od 0 do 25 % hmotnosti, obzvláště 0,1 až 25 % hmotnosti, povrchově aktivního činidla, Tyto prostředky mohou také obsahovat další přísady, jako jsou stabilizátory, například rostlinné oleje nebo epoxidované rostlinné oleje, činidla proti pění, například silikonový olej, konzervační látky, regulátory viskozity, pojidla, látky způsobující lepivost a nebo jiné aktivní složky, Výhodné formulace mají zejména následující složení: (% = hmotnostní procenta):

15

F1: Suché kapsle

5000 Tobolek, z nichž každá obsahuje 0,25 g sterolového derivátu, se připraví následujícím způsobem:

20

Složení: Léčivá látka: 1250 g; Talek 180 g; Pšeničný škrob: 120 g; Stearát hořečnatý: 80 g; Laktóza 20 g,

Postup přípravy: Rozetřené látky jsou tlačeny přes síto s velikostí ok 0,6 mm, Dávka 0,33 g směsi je přenesena do želatinové tobolky pomocí stroje na plnění tobolek,

25

F2: Měkké tobolky

5000 měkkých želatinových tobolek, z nichž každá obsahuje 0,05 g neurosterolového derivátu jako účinnou látku, se připraví následujícím způsobem:

30

Složení: 250 g Účinná látka + 2l g Lauroglycol

Postup přípravy: Prášková aktivní složka je suspendována v Lauroglykol® (propylenglykol laurát, Gattefossé SA, Saint Priest, Francie) a rozetřena ve vlhkém pulverizátoru na velikost částic asi 1 až 3 mm, Dávka o velikosti 0,419 g směsi je potom přenesena do měkkých želatinových tobolek pomocí přístroje na plnění tobolek,

F3: Měkké tobolky

5000 měkkých želatinových tobolek, z nichž každá obsahuje 0,05 g neurosterolového derivátu jako účinnou látku, se připraví následujícím způsobem:

Složení: 250 g účinné složky v 1 l PEG 400, 1 litr Tween 80,

Postup přípravy: Prášková aktivní složka je suspendována v PEG 400 (polyethylenglykol o mh mezi 380 a 420, Sigma, Fluka, Aldrich, USA) a Tween 80 (polyoxyethylen sorbitan monolaurát, Atlas Chem Inc, Inc, USA, dodává Sigma, Fluka, Aldrich, USA) a rozetřena ve vlhkém pulverizátoru na velikost částic asi 1 až 3 mm, Dávka o velikosti 0,43 g směsi je potom přenesena do měkkých želatinových tobolek pomocí přístroje na plnění tobolek,

Příklad 20 – Formulace tablety s řízeným uvolňováním

Jedna tableta obsahuje například 300 až 350 mg neurosterolového derivátu jako účinnou látku, Pomocná látka se známým účinkem: Jedna tableta obsahuje 150 až 200 mg retardující složky (Methocel, Parateck® SRP 80, Kollidon® SR, Kollidon 25, chitosan, alginát), dále lubrikantu (stearát hořečnatý), účinné látky (VH), pojiva (Prosolv SMCC 90),

Lékovou formou je tableta s řízeným uvolňováním,

Příprava tabletoviny: Tablety jsou připraveny přímým lisováním, Nejprve je naváženo vypočtené množství retardující složky (Methocel, Parateck® SRP 80, Kollidon® SR, Kollidon 25, chitosan, alginát), dále lubrikantu (stearát hořečnatý), účinné látky (VH), pojiva (Prosolv SMCC 90), Následně je vzniklá směs homogenizována v homogenizátoru (Retsch MM200 – Retsch GmbH, Haan), Homogenizaci se doporučuje provádět ve třech frekvencích: 10 kmitů/s, 13 a 15 kmitů/s vždy po dobu 1 minuty, Tabletovina je poté převedena do ručního lisu, Tablety jsou lisovány při zatížení 8 kN po dobu 5 minut, Zatížení je zvoleno s ohledem na požadovanou pevnost tablet 0,8 až 0,8 MPa, Hmotnost tablet činí 500 ±5 mg,

Hydrofilní matricové tablety s hypromelosou

Tablety jsou připraveny metodou přímého lisování dle postupu uvedeného výše,

Hmotnost tablet byla 500 ±5 mg, Složení hydrofilních tablet s hypromelosou v %:

Formulace	A1	A2	A3
Prosolv SMCC 90	49 %	49 %	49 %
Methocel K4M	-	30 %	-
Methocel K15M	30 %	-	-
Methocel K100M	-	-	30 %
Účinná látka	20 %	20 %	20 %
Stearát hořečnatý	1 %	1 %	1 %

Hydrofilní matricové tablety s retardující složkou Kollidon 25, Kollidon® SR, Parateck® SRP 80

Tablety jsou připraveny metodou přímého lisování dle postupu uvedeného výše,

Hmotnost tablet byla 500 ± 5 mg, Složení hydrofilních tablet v %:

Formulace	F1	F2	F3	F4	F5
Prosolv® SMCC 90	49 %	49 %	49 %	49 %	49 %
Kollidon 25	30 %	20 %	10 %	-	-
Kollidon® SR	-	-	-	30 %	-
Parreck® SRP 80	-	-	-	-	30 %
Účinná látka	20 %	30 %	40 %	20 %	20 %
Stearát hořečnatý	1 %	1 %	1 %	1 %	1 %

Hydrofilní matricové tablety obsahující LubriTose™ MCC, Methocel K15M nebo Methocel K4M

5

Tablety jsou připraveny metodou přímého lisování dle postupu uvedeného výše,

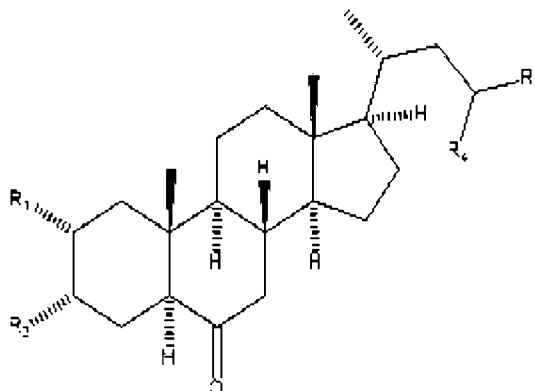
Hmotnost tablet byla 500 ± 5 mg, Složení hydrofilních tablet v %:

Formulace	A1	A2
LubriTose™ MCC	50 %	50 %
Methocel K15M	30 %	-
Methocel K4M	-	30 %
Účinná látka	20 %	20 %

10

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Neurosterolový derivát obecného vzorce I,



(I),

ve kterém

R1, R2 jsou nezávisle vybrány z vodíku nebo hydroxylové skupiny;

R3 je nezávisle vybrán ze skupiny zahrnující vodík, lineární a rozvětvený C1-C5 alkyl a C3-C6 cykloalkyl, přičemž cykloalkyl může být popřípadě substituován alespoň jedním substituentem, kterým je C1-C5 alkyl;

R4 je nezávisle vybrán ze skupiny sestávající z vodíku, methylu a ethylu;

nebo R3 a R4 společně tvoří bivalentní skupinu C2-C5 α,ω -alkylenu,

a kde následující sloučeniny jsou vyloučeny z obecného vzorce I:

2 α -hydroxy-5 α -cholestan-6-on, 3 α -hydroxy-5 α -cholestan-6-on, 2 α ,3 α -dihydroxy-5 α -cholestan-6-on, 3 α -hydroxy-5 α -campestan-6-on, 2 α ,3 α -dihydroxy-5 α -campestan-6-on.

2. Neurosterolový derivát podle nároku 1, kde substituentem R3 je lineární C1-C5 alkyl, s výhodou vybraný ze skupiny zahrnující methylovou, ethylovou, *n*-propylovou, *n*-butylovou a *n*-pentylovou skupinu.

3. Neurosterolový derivát podle nároku 1, kde substituentem R3 je rozvětvený C3-C5 alkyl, s výhodou vybraný ze skupiny, kterou tvoří isopropyl, isobutyl, *sek*-butyl, *terc*-butyl, 2-methylbut-2-yl, 2,2-dimethylpropyl, 3-methylbut-1-yl, pent-2-yl, pent-3-yl, 3-methylbut-2-yl a 2-methylbutyl.

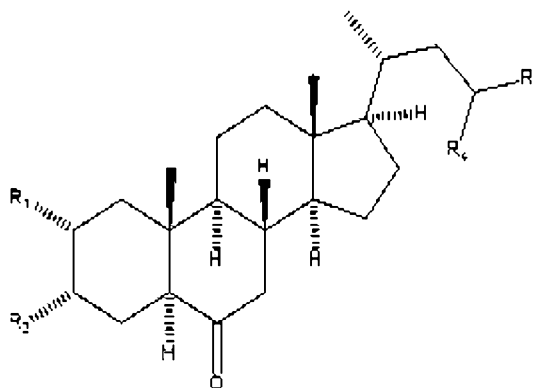
4. Neurosterolový derivát podle nároku 1, kde substituentem R3 je cykloalkylová skupina, s výhodou vybraná ze skupiny zahrnující cyklopropyl, cyklobutyl, cyklopentyl, cyklohexyl, cyklopropylmethyl, cyklobutylmethyl, cyklopentylmethyl, cyklohexylmethyl, které mohou být popřípadě substituovány lineárním C1-C5 alkylem, s výhodou C1-C3 lineárním alkylem.

5. Neurosterolový derivát podle kteréhokoliv z nároků 1 až 4, kde substituenty R3 a R4 dohromady tvoří alkylenovou skupinu, která je vybrána ze skupiny zahrnující 1,2-ethylen, 1,3-trimethylen, 1,4-tetramethylen a 1,5-pentamethylen.

6. Neurosterolový derivát podle kteréhokoliv z nároků 1 až 5, kde v poloze R3 a/nebo na uhlíku C-23 je chirální centrum.

7. Neurosterolový derivát podle nároku 1, vybraný ze skupiny zahrnující 2 α -hydroxy-24-nor-5 α -cholan-6-on, 3 α -hydroxy-24-nor-5 α -cholan-6-on, 2 α ,3 α -dihydroxy-24-nor-5 α -cholan-6-on, 2 α -hydroxy-5 α -cholan-6-on, 3 α -hydroxy-5 α -cholan-6-on, 2 α ,3 α -dihydroxy-5 α -cholan-6-on, 2 α -hydroxy-23-methyl-5 α -cholan-6-on, 3 α -hydroxy-23-methyl-5 α -cholan-6-on, 2 α ,3 α -dihydroxy-23-methyl-5 α -cholan-6-on, 2 α -hydroxy-26,27-dinor-5 α -cholestan-6-on, 3 α -hydroxy-26,27-dinor-5 α -cholestan-6-on, 2 α ,3 α -dihydroxy-26,27-dinor-5 α -cholestan-6-on, (23*R*)-2 α -hydroxy-23-ethyl-5 α -cholan-6-on, (23*R*)-3 α -hydroxy-23-ethyl-5 α -cholan-6-on, (23*R*)-2 α ,3 α -dihydroxy-23-ethyl-5 α -cholan-6-on, (23*S*)-2 α -hydroxy-23-ethyl-5 α -cholan-6-on, (23*S*)-3 α -hydroxy-23-ethyl-5 α -cholan-6-on, (23*S*)-2 α ,3 α -dihydroxy-23-ethyl-5 α -cholan-6-on, 2 α -hydroxy-27-nor-5 α -cholestan-6-on, 3 α -hydroxy-27-nor-5 α -cholestan-6-on, 2 α ,3 α -dihydroxy-27-nor-5 α -cholestan-6-on, 2 α -hydroxy-24,24-dimethyl-5 α -cholan-6-on, 3 α -hydroxy-24,24-dimethyl-5 α -cholan-6-on, 2 α ,3 α -dihydroxy-24,24-dimethyl-5 α -cholan-6-on, 2 α -hydroxy-26a-homo-27-nor-5 α -cholestan-6-on, 3 α -hydroxy-26a-homo-27-nor-5 α -cholestan-6-on, 2 α ,3 α -dihydroxy-26a-homo-27-nor-5 α -cholestan-6-on, 2 α -hydroxy-24,24,24-trimethyl-5 α -cholan-6-on, 3 α -hydroxy-24,24,24-trimethyl-5 α -cholan-6-on, 2 α ,3 α -dihydroxy-24,24,24-trimethyl-5 α -cholan-6-on, 2 α -hydroxy-27-nor-5 α -campestan-6-on, 3 α -hydroxy-27-nor-5 α -campestan-6-on, 2 α ,3 α -dihydroxy-27-nor-5 α -campestan-6-on, 2 α -hydroxy-27-nor-5 α -ergostan-6-on, 3 α -hydroxy-27-nor-5 α -ergostan-6-on, 2 α ,3 α -dihydroxy-27-nor-5 α -ergostan-6-on; 2 α -hydroxy-26a,26b-dihomo-27-nor-5 α -cholestan-6-on, 3 α -hydroxy-26a,26b-dihomo-27-nor-5 α -cholestan-6-on, 2 α ,3 α -dihydroxy-26a,26b-dihomo-27-nor-5 α -cholestan-6-on, 2 α -hydroxy-5 α -campestan-6-on, 2 α -hydroxy-5 α -ergostan-6-on, 3 α -hydroxy-5 α -ergostan-6-on, 2 α ,3 α -dihydroxy-5 α -ergostan-6-on, 2 α -hydroxy-24-ethyl-24,24-dimethyl-5 α -cholan-6-on, 3 α -hydroxy-24-ethyl-24,24-dimethyl-5 α -cholan-6-on, 2 α ,3 α -dihydroxy-24-ethyl-24,24-dimethyl-5 α -cholan-6-on, 2 α -hydroxy-25-methyl-5 α -cholestan-6-on, 3 α -hydroxy-25-methyl-5 α -cholestan-6-on, 2 α ,3 α -dihydroxy-25-methyl-5 α -cholestan-6-on, 2 α -hydroxy-27-nor-5 α -stigmastan-6-on, 3 α -hydroxy-27-nor-5 α -stigmastan-6-on, 2 α ,3 α -dihydroxy-27-nor-5 α -stigmastan-6-on, (24*S*)-2 α -hydroxy-26a-homo-27-nor-5 α -campestan-6-on, (24*S*)-3 α -hydroxy-26a-homo-27-nor-5 α -campestan-6-on, (24*S*)-2 α ,3 α -dihydroxy-26a-homo-27-nor-5 α -campestan-6-on, (24*R*)-2 α -hydroxy-26a-homo-27-nor-5 α -ergostan-6-on, (24*R*)-3 α -hydroxy-26a-homo-27-nor-5 α -ergostan-6-on, (24*R*)-2 α ,3 α -dihydroxy-26a-homo-27-nor-5 α -ergostan-6-on, 2 α -hydroxy-22-cyklopropyl-23,24-dinor-5 α -cholan-6-on, 3 α -hydroxy-22-cyklopropyl-23,24-dinor-5 α -cholan-6-on, 2 α ,3 α -dihydroxy-22-cyklopropyl-23,24-dinor-5 α -cholan-6-on, 2 α -hydroxy-22-cyklobutyl-23,24-dinor-5 α -cholan-6-on, 3 α -hydroxy-22-cyklobutyl-23,24-dinor-5 α -cholan-6-on, 2 α ,3 α -dihydroxy-22-cyklobutyl-23,24-dinor-5 α -cholan-6-on, 2 α -hydroxy-22-cyklopentyl-23,24-dinor-5 α -cholan-6-on, 3 α -hydroxy-22-cyklopentyl-23,24-dinor-5 α -cholan-6-on, 2 α ,3 α -dihydroxy-22-cyklopentyl-23,24-dinor-5 α -cholan-6-on, 2 α -hydroxy-22-cyklohexyl-23,24-dinor-5 α -cholan-6-on, 3 α -hydroxy-22-cyklohexyl-23,24-dinor-5 α -cholan-6-on, 2 α ,3 α -dihydroxy-22-cyklohexyl-23,24-dinor-5 α -cholan-6-on, 2 α -hydroxy-23-cyklopropyl-24-nor-5 α -cholan-6-on, 3 α -hydroxy-23-cyklopropyl-24-nor-5 α -cholan-6-on, 2 α ,3 α -dihydroxy-23-cyklopropyl-24-nor-5 α -cholan-6-on, 2 α -hydroxy-23-cyklobutyl-24-nor-5 α -cholan-6-on, 3 α -hydroxy-23-cyklobutyl-24-nor-5 α -cholan-6-on, 2 α ,3 α -dihydroxy-23-cyklobutyl-24-nor-5 α -cholan-6-on, 2 α -hydroxy-23-cyklopentyl-24-nor-5 α -cholan-6-on, 3 α -hydroxy-23-cyklopentyl-24-nor-5 α -cholan-6-on, 2 α ,3 α -dihydroxy-23-cyklopentyl-24-nor-5 α -cholan-6-on, 2 α -hydroxy-23-cyklohexyl-24-nor-5 α -cholan-6-on, 3 α -hydroxy-23-cyklohexyl-24-nor-5 α -cholan-6-on, 2 α ,3 α -dihydroxy-23-cyklohexyl-24-nor-5 α -cholan-6-on.

8. Neurosterolový derivát obecného vzorce Ia,



(Ia),

ve kterém

R₁, R₂ jsou nezávisle vybrány z vodíku nebo hydroxylové skupiny;

R₃ je nezávisle vybrán ze skupiny zahrnující vodík, lineární a rozvětvený C1-C5 alkyl a C3-C6 cykloalkyl, přičemž cykloalkyl může být popřípadě substituován alespoň jedním substituentem, kterým je C1-C5 alkyl;

R₄ je nezávisle vybrán ze skupiny sestávající z vodíku, methylu a ethylu;

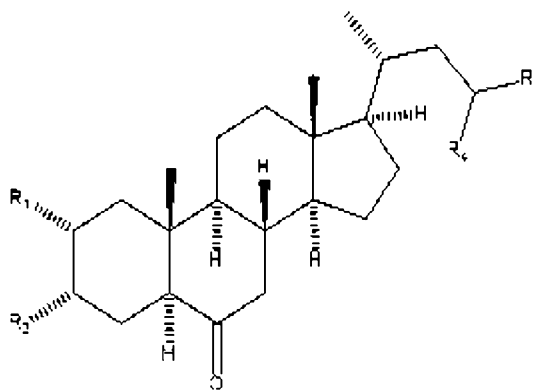
nebo R₃ a R₄ společně tvoří bivalentní skupinu C2-C5 α,ω -alkylenu,

a kde následující sloučeniny jsou vyloučeny z obecného vzorce Ia:

2 α -hydroxy-5 α -cholestan-6-on, 3 α -hydroxy-5 α -cholestan-6-on, 2 α ,3 α -dihydroxy-5 α -cholestan-6-on,

pro použití jako léčiva.

9. Neurosterolový derivát obecného vzorce Ib,



(Ib),

ve kterém

R₁, R₂ jsou nezávisle vybrány z vodíku nebo hydroxylové skupiny;

R₃ je nezávisle vybrán ze skupiny zahrnující vodík, lineární a rozvětvený C1-C5 alkyl a C3-C6 cykloalkyl, přičemž cykloalkyl může být popřípadě substituován alespoň jedním substituentem, kterým je C1-C5 alkyl;

R₄ je nezávisle vybrán ze skupiny sestávající z vodíku, methylu a ethylu;

nebo R₃ a R₄ společně tvoří bivalentní skupinu C2-C5 α,ω -alkylenu;

pro použití při léčení a/nebo profylaxi neurodegenerativních onemocnění.

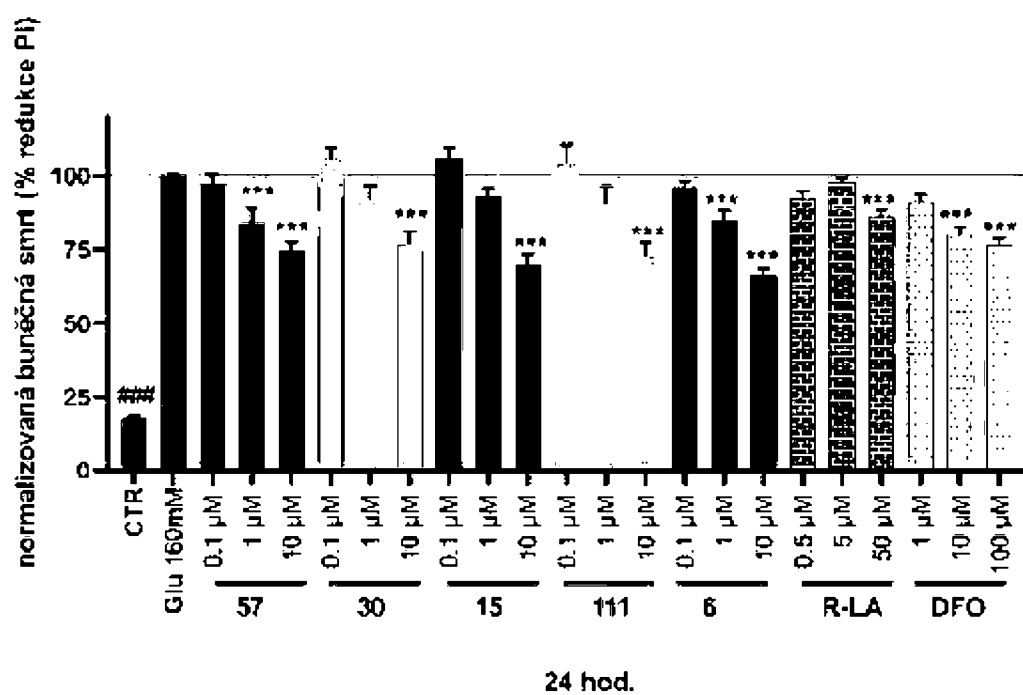
10. Neurosterolový derivát pro použití podle nároku 9, kde neurodegenerativní onemocnění je vybráno ze skupiny zahrnující amyotrofickou laterální sklerózu, Parkinsonovu chorobu, Alzheimerovu chorobu, Huntingtonovu chorobu, progresivní supranukleární paralýzu,

kortikobazální degenerace, frontotemporální demence, demence s Lewyho tělísky, atrofie mnohočetného systému, chronické traumatické encefalopatie a spinocerebelární ataxie.

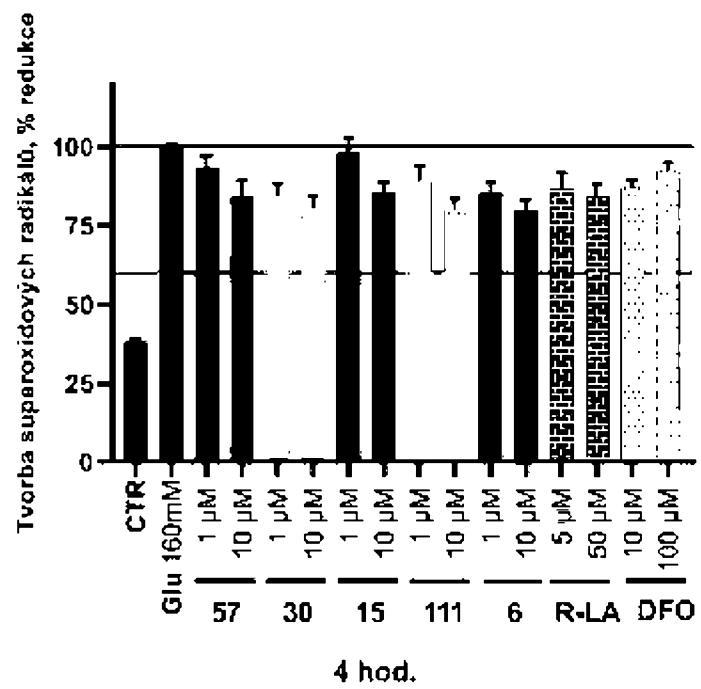
11. Farmaceutická kompozice, **vyznačená tím**, že obsahuje jeden nebo více neurosterolových derivátů podle kteréhokoliv z nároků 1 až 7 a alespoň jeden farmaceuticky akceptovatelný nosič.

5

2 výkresy



Obr. 1



Obr. 2