

Univerzita Karlova

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Chemie

Studijní obor: Medicinální chemie



Adéla Vaculčíková

Syntéza a charakterizace neurosteroidních proléčiv
Synthesis and characterization of neurosteroid prodrugs

Bakalářská práce

Vedoucí závěrečné práce/Školitel: RNDr. Eva Kudová PhD.

Praha, 2024

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 21.5.2024

Podpis

Abstrakt

Tématem bakalářské práce je příprava neurosteroidních proléčiv za účelem optimalizace jejich fyzikálně-chemických a metabolických vlastností s cílem usnadnit jejich transport membránami, zejména průchod přes hematoencefalickou bariéru. Neurosteroidy jsou endogenní látky, které vznikají v mozku z cholesterolu. Jejich charakteristickou funkční skupinou je hydroxylový substituent v poloze C-3. Tento substituent je významným strukturním rysem podmiňujícím biologickou aktivitu (např. alosterickou modulaci receptorů kyseliny γ -aminomáselné). Je však zároveň velmi snadno metabolizován a volná hydroxylová skupina v molekule neurosteroidu zvyšuje její hydrofilicitu a prostup membránou omezuje. V průběhu práce budou připraveny: 1) neurosteroidy s různými skelety jako výchozí látky a 2) analogy neurosteroidů s esterovou skupinou v poloze 3 jako proléčiva. Substituenty byly vybrány na základě literární rešerše esterových proléčiv ovlivňujících průnik přes hematoencefalickou bariéru. Pro nově připravené látky budou stanoveny jejich metabolické a fyzikálně-chemické vlastnosti, jako například rozpustnost, permeabilita a metabolická stabilita v rámci spolupráce na Ústavu organické chemie a biochemie, Akademie věd České republiky.

Klíčová slova: *neurosteroidy, proléčiva, permeabilita, stabilita*

Abstract

This bachelor thesis explores various methods for neurosteroid prodrugs synthesis. The thesis aims to optimize the physicochemical and metabolic properties of neurosteroids to facilitate their transport across membranes, in particular the permeability of the blood-brain barrier. Neurosteroids are endogenous compounds that are synthesized in the brain from cholesterol. Their characteristic functional group is the hydroxyl substituent at the C-3 position. This substituent is a significant structural feature for biological activity (e.g., allosteric modulation of γ -aminobutyric acid receptors). However, the C-3 hydroxyl group can be easily metabolized. Moreover, the free hydroxyl group in the neurosteroid molecule increases its hydrophilicity which can limit the transport across the membrane. Therefore, within this thesis: 1) neurosteroids with different skeletons and 2) analogs of neurosteroids with ester group in C-3 position, will be prepared. The C-3 substituents have been selected based on literature research identifying ester prodrugs targeting improved blood-brain barrier permeability. For newly prepared substances, their metabolic and physicochemical properties, such as solubility, permeability, and metabolic stability will be determined within the collaboration at the Institute of Organic Chemistry and Biochemistry of the Czech Academy of Sciences.

Key words: neurosteroids, prodrugs, permeability, stability

Obsah

1	Úvod.....	7
2	Cíle práce	8
3	Teoretická část.....	9
3.1	Syntéza neurosteroidů.....	9
3.2	Struktura neurosteroidů	10
3.3	Mechanismus účinku neurosteroidů	10
3.4	FDA schválené neurosteroidy	11
3.5	Syntéza esterů.....	12
3.6	Proléčiva.....	13
3.7	Esterová skupina na hydroxylové funkci jako proléčivo	14
3.7.1	Estery kyseliny octové	15
3.7.2	Estery aminokyselin.....	15
3.7.3	Estery kyseliny nikotinové	17
3.7.4	Další příklady léčiv s esterovou skupinou	18
4	Výsledky a diskuse	20
4.1	Syntetická strategie.....	20
4.2	Příprava výchozích látek	20
4.2.1	Dehydroepiandrosteron	20
4.2.2	Allopregnanolon	20
4.3	Příprava steroidních C-3 acetátů	22
4.4	Příprava chráněných derivátů aminokyselin.....	23
4.5	Příprava C-3 steroidních nikotinátů	24
4.6	Čistota látek	24
4.6.1	Parametry měření čistoty	26
4.7	Farmakologické vlastnosti steroidních derivátů	26
5	Experimentální část	29
5.1	Obecné postupy a chemikálie	29
5.2	Syntéza derivátů	30
6	Závěr	37
7	Poděkování	38
8	Literatura	39

Použité zkratky

ACE inhibitory	inhibitory angiotensin konvertujícího enzymu
ALLO	allopregnanolon
APCI	chemická ionizace za atmosférického tlaku
AMK	aminokyselina/y
BBB	hematoencefalická bariéra (blood-brain barrier)
b.t.	bod tání
CNS	centrální nervová soustava
DHEA	dehydroepiandrosteron
DIAD	diisopropylazodikarboxylát
DIPEA	N,N-diisopropylethylamin
DMAP	4-(dimethylamino)pyridin
DMSO	dimethylsulfoxid
EDCI · HCl	ethyl(dimethylaminopropyl)karbodiimid hydrochlorid
ESI	ionizace elektrosprejem
ekv.	ekvivalent
ELSD	odpařovací detektor rozptylu světla
EtOAc	ethyl acetát
FDA	Úřad pro kontrolu potravin a léčiv (Food and Drug Administration)
GABA	kyselina γ -aminomáselná
grad.	gradient
HR-MS	hmotností spektrometrie s vysokým rozlišením
IČ	infračervená spektroskopie
LC-MS	kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií
NMDA	N-methyl-D-asparagová kyselina
NMR	nukleární magnetická rezonance
NS	neurosteroid/y
<i>m/z</i>	poměr hmotnosti iontu a jeho náboje
PPD	poporodní deprese (postpartum depression)
PPh ₃	trifenylfosfin
TFA	trifluoroctová kyselina
TLC	chromatografie na tenké vrstvě (thin layer chromatography)

1 Úvod

Mozek je jednou z nejdůležitějších částí našeho organismu. Není divu, že musí být dostatečně chráněn před cizorodými látkami, které by při kontaktu s ním mohly výrazně ovlivnit jeho funkci a životní úroveň pacienta.

Hematoencefalická bariéra (BBB) je hlavní membránou regulující výměnu molekul mezi krví a mozkem. Hlavní složkou membrány jsou endoteliální buňky, spojené těsnými spoji do sítě kapilár, která proniká do samotného mozku a míchy. Společně s pericyty a astrocyty tvoří endoteliální buňky neurovaskulární jednotku, která brání krevním buňkám a patogenům v průchodu do mozku.¹

Jednou z nejdůležitějších rolí BBB je chránit mozek před změnou koncentrace krevních proteinů, aminokyselin, peptidů a dalších molekul. Zároveň zaručuje správnou funkci neuronů rychlou dodávkou živin a kyslíku, ochranou mozku před patogeny a přísnou regulací průchodu molekul.¹

Lze definovat několik typů průchodu látek přes BBB. Nejjednodušší typ transportu je difúze, kterou dále dělíme na paracelulární a transcelulární. Paracelulární difúze je transport ve vodě rozpustných molekul prostorem mezi dvěma endoteliálními buňkami. Naopak transcelulární transport je termín pro difúzi skrz endoteliální buňku a využívají ho molekuly rozpustné v lipidech jako je kyslík, alkoholy nebo oxid uhličitý. Glukóza a aminokyseliny se do mozku transportují pomocí nativních transportních proteinů, přítomných v mozkových kapilárách.

Jelikož je transport molekul do mozku přísně regulován, je nutné navrhnout léčiva, která jsou schopna snadného průchodu přes BBB a zároveň i aktivního působení v cílovém místě. Léčiva mohou do mozku procházet napojena na transportní proteiny pod podmínkou, že vyhovují jejich strukturním charakteristikám. Častější metodou transportu léčiva je receptorem řízená transcytóza, kdy se účinná látka naváže na receptor a společně vytvoří intracelulární váček v membráně. Takto lze transportovat například i inzulin nebo transferin.²

Jednou z kategorií léčiv, která mohou pozitivně ovlivňovat CNS jsou neurosteroidy, které jsou již několik let předmětem výzkumu jako potenciální léčiva neurologických onemocnění, jako například epilepsie, ischemie, poporodní deprese a další.³

V naší laboratoři se zabýváme syntézou neurosteroidních molekul, které mohou ovlivňovat funkci receptorů kyseliny γ -aminomáselné, popřípadě kyseliny *N*-methyl-D-asparagové. Nazýváme je jako tzv. SMART molekuly (Steroidal Molecules As Rapid-acting Therapeutics).

2 Cíle práce

Cílem této bakalářské práce je studium přípravy neuroaktivních steroidů, které mohou být potenciálně využity jako proléčiva. S využitím vhodných výchozích látek budou syntetizována esterová proléčiva modifikací hydroxylové skupiny v poloze C-3. U připravených látek bude testována jejich kinetická a termodynamická rozpustnost, stabilita v mikrosomech a schopnost prostupovat přes membrány (tzv. permeabilita). Výsledky této práce budou sloužit jako zdrojová data pro design a syntézu nových látek ovlivňujících centrální nervový systém.

3 Teoretická část

3.1 Syntéza neurosteroidů

Neurosteroidy (NS) jsou přirozeně se vyskytující steroidy, schopné modulace excitability neuronů prostřednictvím rychlého negenomického účinku v centrální či periferní nervové soustavě.³

Neurosteroidy se biosyntetizují z cholesterolu a ostatních steroidních prekurzorů *de novo* v mozku a periferních nervových tkáních. Proces neurosteroidogeneze začíná transportem molekul cholesterolu do mitochondrií katalyzovaným translokačním a steroidním akutním regulačním proteinem. Následně dochází k přeměně cholesterolu na pregnenolon, který opouští mitochondrie a metabolizuje se na progesteron, popřípadě na 17-hydroxypregnenolon, z něhož vzniká dehydroepiandrosteron (DHEA). Jak DHEA, tak pregnenolon podléhají metabolizaci na androstendion, který se transformuje na testosteron a je následně aromatizován na 17 β -estradiol.³ Proces je znázorněn ve **Schématu 1**.

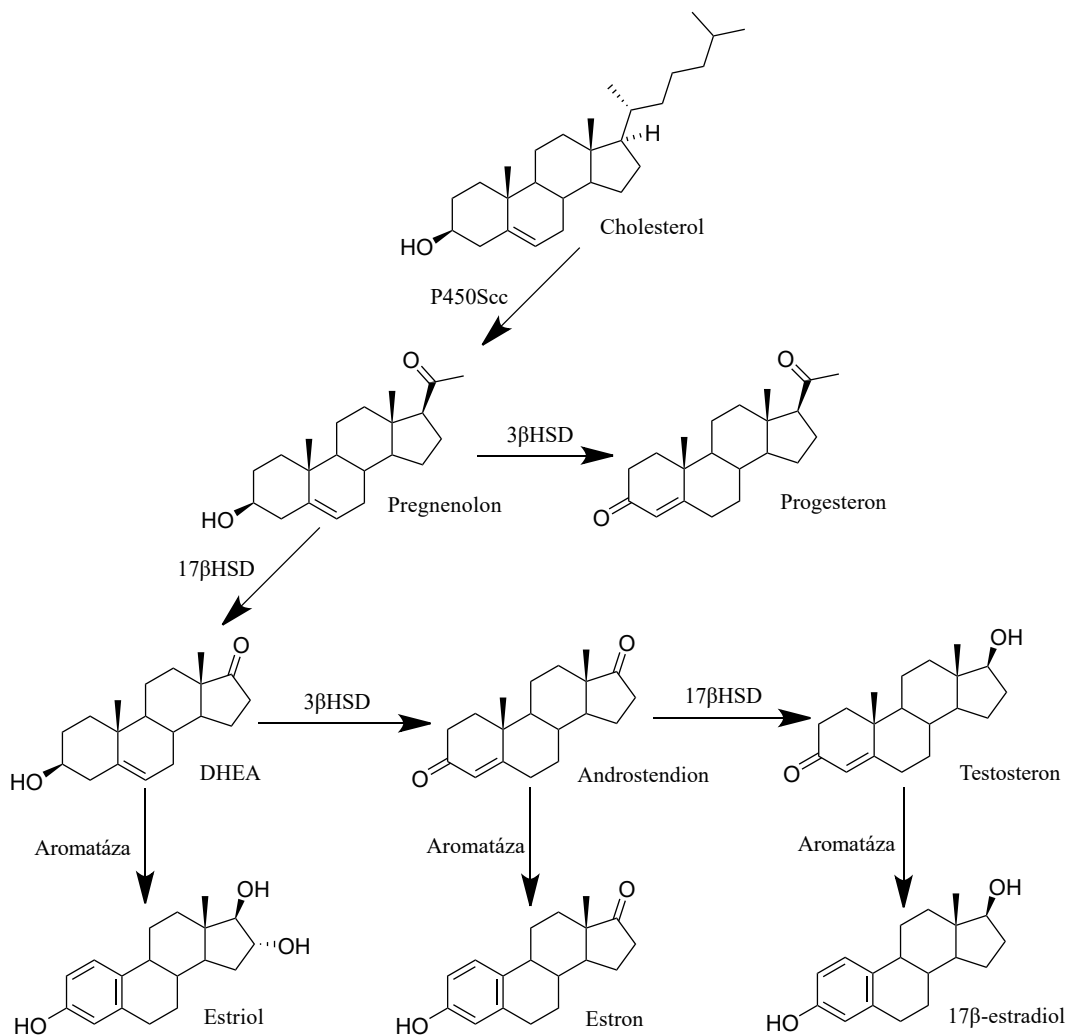


Schéma 1. Schéma hlavních drah neurosteroidogeneze. Převzato a upraveno.⁴

Proces biosyntézy NS probíhá především v neuronech a neurogliích. Na základě výzkumu *in vitro* bylo zjištěno, že zároveň v oligodendrocytech probíhá syntéza pregnanolonu, androstendionu a progesteronu.⁵ Astrocyty poté produkují také DHEA, testosteron a estradiol. Vzhledem ke způsobu provedení výzkumu ovšem nelze přesně definovat odlišnost syntézy steroidních látek *in vivo*.⁵

3.2 Struktura neurosteroidů

Základní kostrou NS je velmi stabilní steranový skelet nazývaný také jako cyklopentanoperhydrofenantrenový skelet. NS lze rozdělit do několika kategorií v závislosti na strukturních charakteristikách. Nejvýznamnější jsou pregnanové NS, mezi které patří například allopregnanolon (ALLO). Pregnanové steroidy mají charakteristický ethylový substituent v poloze C-17. Druhou významnou skupinu utváří androstanové NS, mezi které lze zařadit například dehydroepiandrosteron. Androstanové steroidy mají charakteristickou substituci v poloze C-17. Další strukturní skupiny jsou estrany (aromatický A-kruh), cholestany (alkylový substituent v poloze C-17), steroidy s heterocyklickým substituentem v poloze C-17, žlučové kyseliny (karboxylová skupina) a v neposlední řadě kortikosteroidy (hydroxylová substituce v polohách C-11, C-17, C-20, či jejich kombinace).⁶

V organismu se steroidy metabolizují hlavně v podobě sulfátových a glukuronidových konjugátů přes hydroxylovou skupinu. Zajímavostí je, že sulfáty kromě úlohy metabolické, působí také jako neuromodulátory. Jinými slovy, přítomnost a charakteristika daných skupin může významně ovlivnit stabilitu, metabolismus, ale i funkci neurosteroidního proléčiva v organismu.

Jako příklady lze uvést pregnenolon sulfát (PES) a dehydroepiandrosteron sulfát (DHEAS). Ty působí jako negativní modulátory GABA_A receptorů nebo pozitivní modulátory NMDA receptorů.⁶

3.3 Mechanismus účinku neurosteroidů

Již několik desetiletí je efekt a mechanismus účinků NS předmětem výzkumu. Dnes je již známo, že NS se vyznačují především svým specifickým nengenomickým efektem přímo či modulačně na iontově řízené membránové kanály, napětově závislé receptory či receptory spřažené s G-proteinem. Tento mechanismus účinku je odlišuje od steroidních hormonů, které ovlivňují nukleární receptory genomickým účinkem.

U většiny neurosteroidů bylo prokázáno, že tato interakce spočívá v regulaci účinků neurotransmiterů. Účinkují konkrétně na ionotropní GABA_A receptory, ligandem řízené chloridové kanály nacházející se v nervových buňkách a na NMDA receptory.⁷

NS jsou pozitivní alosterické modulátory synaptických i extrasynaptických GABA_A receptorů. Vazbou na specifické vazebné místo v receptoru ho mohou NS aktivovat, popřípadě ovlivňovat dobu trvání otevření chloridového kanálu. Funkci GABA_A receptorů ovlivňují i další látky jako například benzodiazepiny či barbituráty, ty mají ovšem jiné vazebné místo než NS.⁸

NS jsou také schopny regulovat aktivitu NMDA receptorů. NMDA receptory jsou podtypem glutamátových ionotropních receptorů, umožňují pozitivně nabitým iontům procházet skrz membránu a hrají významnou roli pro synaptickou plasticitu a utváření paměti.⁹

Modulace NMDA receptorů funguje na principu kontaktu steroidní molekuly s místem účinku v membránové části receptoru, čímž dochází k ovlivnění otevření či zavření iontového kanálu. Dle studií ovšem nebyl zpozorován žádný efekt NS na dobu otevření zmíněných kanálů.⁹

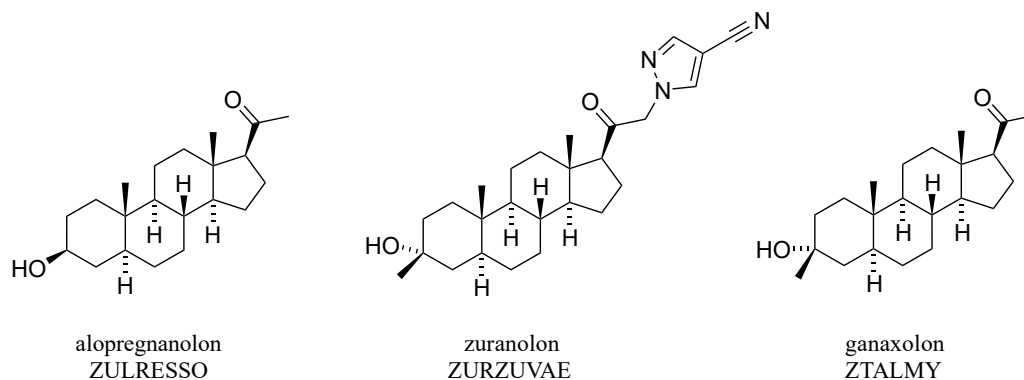
Obecně mohou NS být pozitivními nebo negativními neuromodulátory.¹⁰

3.4 FDA schválené neurosteroidy

V roce 2019 byl na trh uveden lék ZULRESSO jako první FDA schválené léčivo na poporodní deprese, jinak známý také jako brexanolon či allopregnanolon. To se stalo pro léčbu PPD velkým průlomem, jelikož předchozí dostupnou variantou léčby byla pouze antidepresiva a psychoterapie.¹¹ Poporodní deprese je mentální porucha postihující přibližně 13 – 19 % žen již od třetího trimestru těhotenství a představuje vysoké zdravotní riziko jak pro matku, tak i pro dítě. Jako běžné indikace onemocnění se uvádí neschopnost matky se postarat o sebe či potomka, depresivní epizody či nesprávný behaviorální a emoční vývoj dítěte.¹² Zulresso se podává intravenózně a v mozku působí na GABA_A receptory, které jsou údajně zodpovědné za projevy PPD.¹³

Způsob podání, a především i vyšší cena brexanolonu ovšem limitovala dostupnost léku pro pacienty. Proto bylo v roce 2023 firmou Sage Therapeutics vyvinuto nové inovativní terapeutikum zuranolon, známé komerčně jako ZURZUVAE, které je modifikováno pro perorální podání.¹⁴ V současné době je zuranolon předmětem dalších výzkumů pro svou potenciální schopnost léčit i klinickou depresi a insomni. Tyto studie se bohužel zatím nepotvrdily.¹⁵ Jak ZULRESSO tak i novější ZURZUVAE slouží k potlačení projevů PPD, nikoliv její léčbě.

Dalším schváleným neurosteroidním terapeutikem je ganaxolon (ZTALMY), který byl vyvinut farmaceutickou společností Marinus Pharmaceuticals. Byl schválen v roce 2022 pro léčbu epilepsie související s poruchou cyklin-dependentní kinázy. Ganaxolon patří mezi pozitivní alosterické modulátory, ovlivňující GABA_A receptory.¹⁶



Obrázek 1. Struktury FDA schválených neurosteroidů

3.5 Syntéza esterů

Estery řadíme mezi funkční deriváty karboxylových kyselin s acylovou skupinou vázanou na elektronegativní atom molekuly. Existuje několik způsobů přípravy esterů. Nejjednodušší je reakce karboxylátového aniontu s primárním alkylhalogenidem, probíhající S_N2 mechanismem. Mnohem častější je ovšem Fischerova esterifikace, nukleofilní acylová substituce karboxylových kyselin a alkoholů. Tento postup navrhl Emil Fischer v roce 1895, když si všiml že estery lze připravit zahřátím karboxylových kyselin s nadbytkem alkoholů, za přítomnosti vhodného katalyzátoru.¹⁷ Jako katalyzátor se využívá silná kyselina (nejčastěji HCl, H₂SO₄), která zvýší reaktivitu karboxylové kyseliny tak, že protonuje kyslík v karbonylové skupině. Následně dochází k nukleofilnímu útoku a substituce hydroxylové skupiny za vzniku esteru.¹⁷ Schéma Fischerovy esterifikace je znázorněno ve **Schématu 2**.

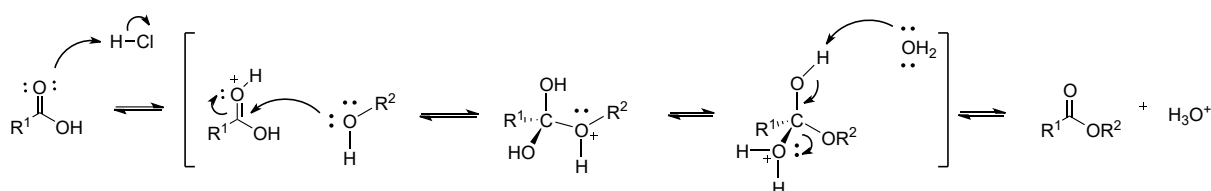


Schéma 2. Mechanismus Fischerovy esterifikace. Převzato a upraveno.¹⁷

Syntéza esterů ovšem může probíhat i acylací alkoholů pomocí chloridů či anhydridů kyselin. Alifatické acylhalogenidy jsou velmi reaktivní a s alkoholy reagují spontánně. Vzniklý halogenvodík se obvykle zachytává bází, jako je triethylamin nebo pyridin.

Naopak anhydridy jsou méně reaktivní než halogenidy a jejich reakce musí být katalyzována. Reakce cyklických anhydridů s alkoholy mohou vést k tvorbě diesterů nebo monoesterů, v závislosti na podmínkách reakce. V případě přidání katalyzátoru jako je 4-(dimethylamino)pyridin (DMAP) dochází k mnohonásobnému zvýšení rychlosti reakce oproti reakci nekatalyzované.¹⁸

Protichůdnou reakcí je hydrolýza, kdy dochází ke vzniku karboxylové kyseliny a alkoholu. Reakce probíhá dvoukrokovým adičně-eliminačním mechanismem. Nejdříve vzniká karboxylát reakcí esteru s hydroxidovým aniontem, který je poté protonován silnou kyselinou za vzniku požadovaného produktu.¹⁹

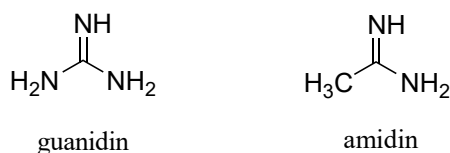
3.6 Proléčiva

Definice termínu proléčivo dle IUPAC je následující: „Proléčivo je jakákoliv látka, podléhající biotransformaci před tím, než se projeví její farmakologický účinek.“²⁰

Proléčiva lze charakterizovat jako neaktivní, chemicky modifikované verze farmakologicky účinných látek, které *in vivo* podléhají přeměně za účelem uvolnění účinného léčiva. Jsou to obvykle jednoduché molekuly a jejich přeměna vyžaduje jeden až dva transformační kroky.

Primárním účelem využití proléčiva je tedy snaha o zlepšení charakteristik původního léčiva, ať už jde o fyzikální, farmakodynamické nebo farmakokinetické aspekty. To může zahrnovat například zvýšení rozpustnosti ve vodě pomocí zavedení polárních nebo ionizovatelných skupin do molekuly léčiva. Zároveň může být také žádoucí i maskování přítomných polárních a ionizovatelných skupin za účelem zvýšení lipofility původního léčiva.²¹

Mezi běžně modifikované funkční skupiny patří karboxylové kyseliny, aminy, hydroxyly a karbonyly. Tyto skupiny mohou být upraveny například syntézou esterů, které umožňují léčivu projít biologickými membránami. Mezi další modifikovatelné funkční skupiny patří guanidiny a amidiny, které jsou silně bazické a proto je průchod léčiva, jež je obsahuje umožněn vlivem ionizace.²²



Obrázek 2. Struktura guanidinu a amidinu

Úpravami struktury je také možné ovlivnit biologický poločas léčiva nebo snížit jeho toxicitu. Proléčiva se aktivují až ve specifických tkáních, což umožňuje tkáňově specifická enzymatická aktivita.²³

Pro správný účinek proléčiva v organismu je ovšem žádoucí jeho efektivita, která je podmíněna několika faktory. Vazby v neaktivní části molekuly proléčiva musí být kovalentní, ale zároveň snadno štěpitelné hydrolytickými reakcemi, což umožňuje uvolnění aktivní látky až v biologicky relevantním čase. Další neméně důležitou podmínkou je, aby žádná část molekuly proléčiva nevykazovala toxické vlastnosti a nepodléhala za fyziologického stavu nežádoucím biotransformacím.²⁴

Ideální modelové proléčivo vykazuje velmi dobrou schopnost absorpce, distribuce, metabolismu, eliminace a toxicity, známo také pod zkratkou ADMET, která mu dodává výhodu oproti mateřskému léčivu.²⁵

Proléčiva nacházejí uplatnění mimo jiné i v doručování účinných látek do CNS, která je díky hematoencefalické bariéře jedním z nejméně dostupných orgánů.²⁶ Účinným přístupem ke zvýšení koncentrace léčiva v CNS je zvýšení lipofility mateřského léčiva. Aby byl tento přístup úspěšný, musí mít proléčivo schopnost snadného průniku do mozku, biokonverze zpět na mateřské léčivo musí být selektivní a dostatečně rychlá, a mateřské léčivo musí vykazovat dlouhodobou retenci v mozku.²⁷

3.7 Esterová skupina na hydroxylové funkci jako proléčivo

Jak již bylo zmíněno, proléčiva nacházejí využití v případech, kdy účinná forma léku nespĺňuje žádoucí charakteristiky pro efektivní doručení do cílové tkáňe. Řada léčiv vykazuje nízkou biologickou dostupnost nebo necílí na poškozené buňky. Tyto faktory mohou mimo jiné vést i k poškození zdravých buněk či lékové rezistenci.²⁸

Studie z roku 2018 uvedla, že přibližně 10 % léčiv na trhu lze považovat za proléčiva, což odpovídá více než 12 % všech FDA schválených nízkomolekulárních účinných látek.²¹

Pro mnohá léčiva je žádoucí přítomnost karboxylové, hydroxylové nebo thiolové funkční skupiny, ovšem díky jejich vysoké polaritě nelze taková proléčiva využít pro orální podání. V tenkém střevě při pH 5-7 jsou totiž částečně ionizovány, což brání průchodu přes střevní stěnu.²⁹ Aby se tomuto zabránilo, využívá se maskování esterifikací molekuly. Uvádí se, že zhruba 49 % všech proléčiv tvoří estery.²³

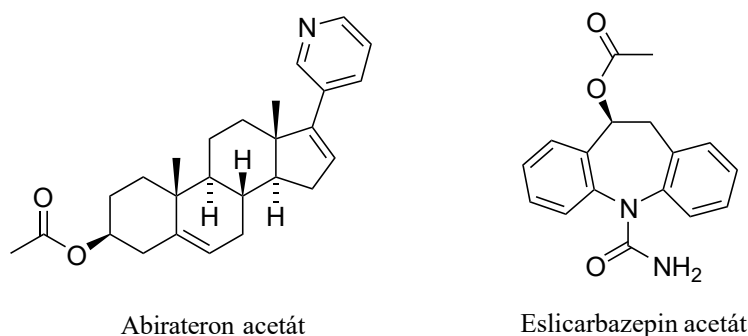
Po účinné absorpci v organismu dochází k aktivaci proléčiva esterázami přítomnými v krvi, játrech a dalších tkáních. Mezi běžné esterázy se řadí například karboxylesterázy nebo acetylcholinesterázy.²³

3.7.1 Estery kyseliny octové

I přesto, že se acetáty řadí mezi nejjednodušší estery, jsou mezi proléčivý hojně zastoupené. Jako významného představitele acetátových steroidních proléčiv lze zmínit abirateron acetát (ZYTIGA, iCeutica Inc.), který je využíváný k léčbě metastatického nádoru prostaty. *In vivo* dochází k hydrolyze na aktivní látku abirateron, která je klíčovým inhibitorem při syntéze androgenů, což následně efektivně zabraňuje vývoji nádoru.³⁰

Abirateron acetát má lepší perorální dostupnost, zvýšenou stabilitu a absorpci oproti samotnému abirateronu, který navíc velmi ochotně podléhá hydrolyze esterázami.³¹

Mezi antiepileptika pro humánní medicínu se řadí acetátové proléčivo eslicarbazepin acetát, na trhu známé pod názvy jako APTIOM (Sunovion Pharmaceuticals Inc.) nebo ZEBINIX (Bial). Své uplatnění našlo při léčbě parciálních epileptických záchvatů. Transformuje se na aktivní látku eslicarbazepin, která inhibuje napětově řízené iontové kanály nacházející se v mozku. Iontové kanály jsou pak méně náchylné k excitabilitě, což tlumí projevy záchvatů.³²



Obrázek 3. Struktury acetátových proléčiv – Abirateron acetátu a Eslicarbazepin acetátu

3.7.2 Estery aminokyselin

Proléčiva mohou být tvořena i esterem AMK, navázáním její α -karboxylové nebo α -aminové skupiny na hydroxylovou funkci.

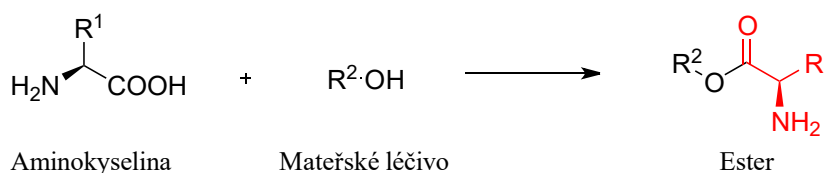


Schéma 3. Syntéza esteru z α -aminokyseliny a alkoholu

AMK jsou klíčové především díky rozmanitosti svých funkčních skupin (např. thio, hydroxylová, karboxylová skupina), které mohou být užitečné při návrhu proléčiv. AMK obsahují ve své struktuře amonný kation a karboxylový anion. To zvyšuje rozpustnost ve vodě daného proléčiva až o několik řádů, což je výhodné pro orální podání.³³

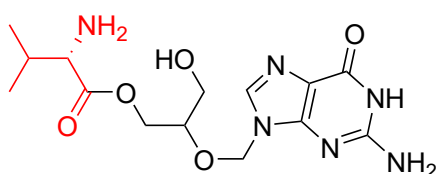
Většina α -aminokyselinových proléčiv má jednu z těchto skupin navázanou na mateřské léčivo, což ruší funkci zwitteriontu. Nicméně existují i situace, kde α -AMK obsahují funkční skupinu ve svém postranním řetězci, jako je například $-SH$ v cysteinu, $-OH$ v tyrosinu, $-NH_2$ v lysinu nebo $-COOH$ v kyselině asparagové, a tím pádem si udrží svůj dvojitý náboj.³³

Lze říct, že rozpustnost proléčiva je funkcí polární nebo nepolární povahy postranního řetězce AMK a že zvýšení obsahu uhlíků rozpustnost ve vodě snižuje.³³

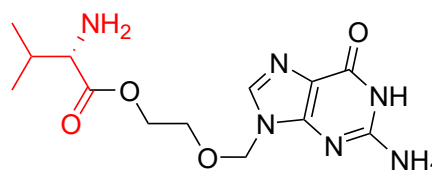
I přesto, že jsou AMK součástí všech buněčných membrán, je nutné k jejich transportu využít speciální přenašeče, které lze klasifikovat na základě různých faktorů jako je pH nebo substrátová afinita.²⁸

Mezi významné transportéry AMK patří například LAT1 a LAT2, odpovídající za přenos velkých neutrálních molekul z extracelulárního prostoru do intracelulárního. Konkrétně LAT1 je transmembránový protein, který je exprimovaný na BBB a zprostředkovává transport hydrofobních kyselin z krve do mozku. Mezi jeho substráty se řadí L-leucin, L-tryptofan a L-fenylalanin. LAT1 tedy nachází možné uplatnění v přenosu proléčiv do CNS.²⁸

Praktické využití našly estery AMK, typicky valin, také v léčivech proti virům acikloviru a gancikloviru. Jejich účinek spočívá ve zlepšení perorální biologické dostupnosti účinné látky. Zlepšení absorpce proléčiva je způsobeno především transportem za pomoci PEPT1, dipeptidového transportéru. Zajímavostí je, že transport je stereoselektivní, dochází tedy k přenosu pouze L-valinu.³⁴



Valganciklovir



Valaciclovir

Obrázek 4. Struktury Valgancikloviru a Valacicloviru – proléčiv gancikloviru a acikloviru

Ke zlepšení vlastností kyseliny oleanové byly taktéž využity AMK. Kyselina oleanová je triterpenoid s protizánětlivými a analgetickými účinky. Díky své nízké rozpustnosti ve vodě má ale velmi nízkou biologickou dostupnost. Bylo prokázáno, že zavedením AMK na karboxylovou skupinu lze zlepšit její rozpustnost. Nejvíce rozpustné byly propylen-glykolové deriváty, které vykazovaly zároveň i stabilitu, biologickou dostupnost a zvýšenou afinitu k transportnímu enzymu PEPT1.³⁵ Ve **Schématu 4** je vyobrazeno porovnání rozpustnosti ethylen-glykolového derivátu s propylen-glykolovým derivátem.

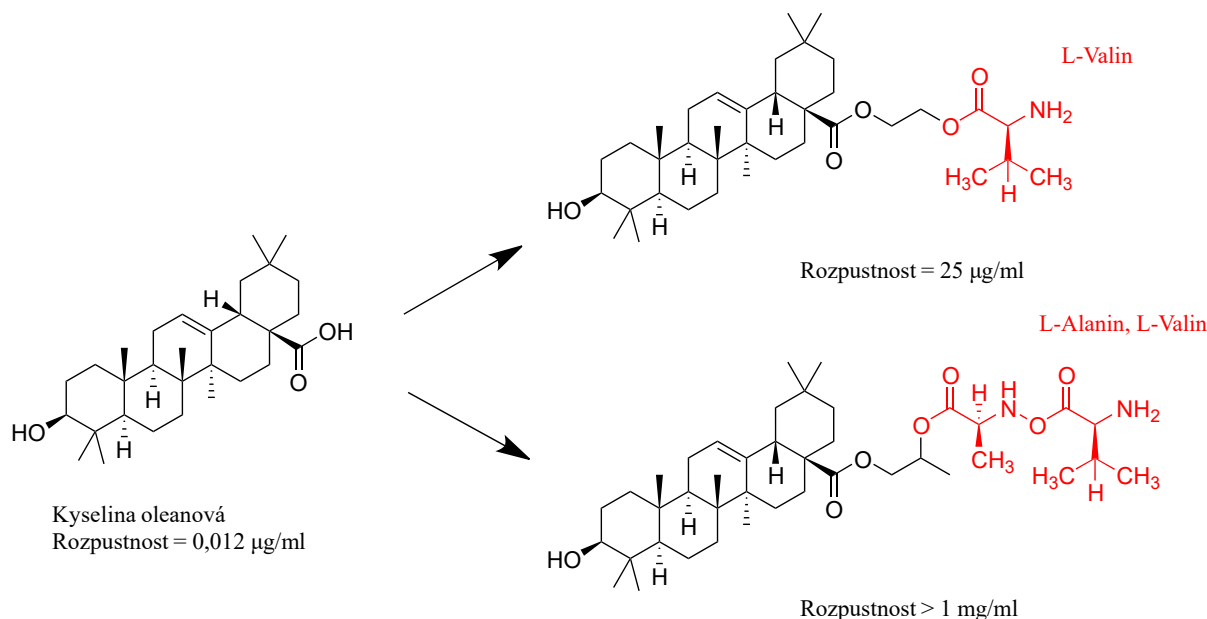


Schéma 4. Zlepšení rozpustnosti kyseliny oleanové s využitím AMK esterů jako proléčiva. Převzato a upraveno³⁵

Estery AMK jako proléčiva lze využít i ke zlepšení rozpustnosti mateřské látky. V tomto případě nacházejí uplatnění především D-AMK, které se na rozdíl od L-AMK v přírodě běžně nevyskytují, a tím pádem nefigurují jako substráty pro endogenní proteázy. Zároveň se zlepšenou stabilitou dochází i k prodloužení doby cirkulace látky v organismu.³⁶

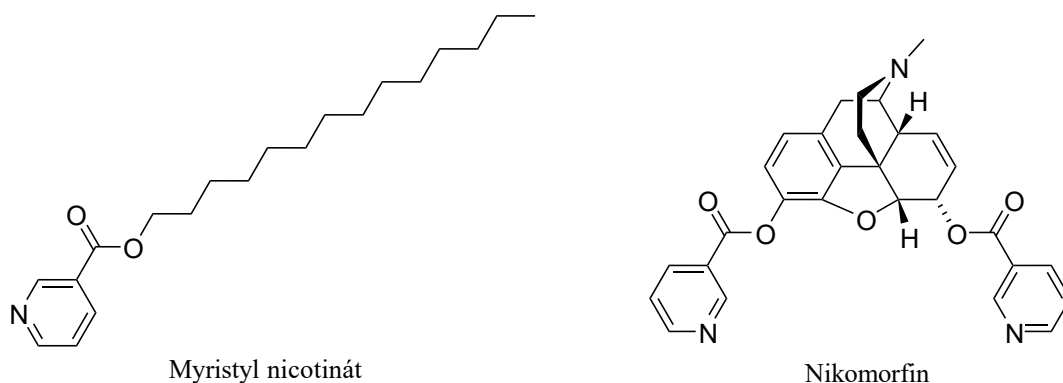
3.7.3 Estery kyseliny nikotinové

Kyselina nikotinová (niacin) je základní živinou pro správnou funkci organismu, využívána k léčbě pelagry a dříve i dislipidémie. Nedávný výzkum odhalil, že by niacin mohl figurovat i při léčbě onemocnění CNS jako je například Alzheimerova či Parkinsonova choroba.³⁷

Nikotináty jsou zajímavou skupinou proléčiv, která ještě není zdaleka tak prozkoumaná. I přesto mají několik významných zástupců, které jsou v klinické praxi využívány. V dermatologii se hojně využívá myristyl nikotinát, vyvinutý speciálně pro zlepšené podání kyseliny nikotinové na kůži, která slouží ke zlepšení kožní bariéry.³⁸

Jedním z proléčiv morfinu je nikomorfin, 3,6-dinikotinátový ester morfinu, využívající se ve formě hydrochloridové soli pro své analgetické účinky. Uvádí se, že je až třikrát účinnější než samotný morfin, se srovnatelnými vedlejšími účinky.³⁹

Nikomorfin vykazuje díky zavedené nikotinátové funkční skupině zvýšenou lipofilitu, která umožňuje lepší a rychlejší průchod do CNS, kde dochází k metabolizaci na morfin.³⁹



Obrázek 5. Struktury nikotinátových proléčiv – Myristyl nikotinátu a Nikomorfinu

3.7.4 Další příklady léčiv s esterovou skupinou

Pro modifikaci hydroxylové či amino skupiny se využívají také fosfátové estery.⁴⁰ Slouží ke zvýšení rozpustnosti, která umožňuje zlepšení orálního a parenterálního podání léčivé látky. Fosfátová proléčiva zároveň vykazují dobrou stabilitu. Jejich rychlou přeměnu na mateřské léčivo umožňují fosfatázy, nacházející se v játrech a epitelu střev. Zároveň ve srovnání s esterásami karboxylových kyselin vykazují stejné účinky jak v lidském organismu, tak i u pokusných zvířat.²³

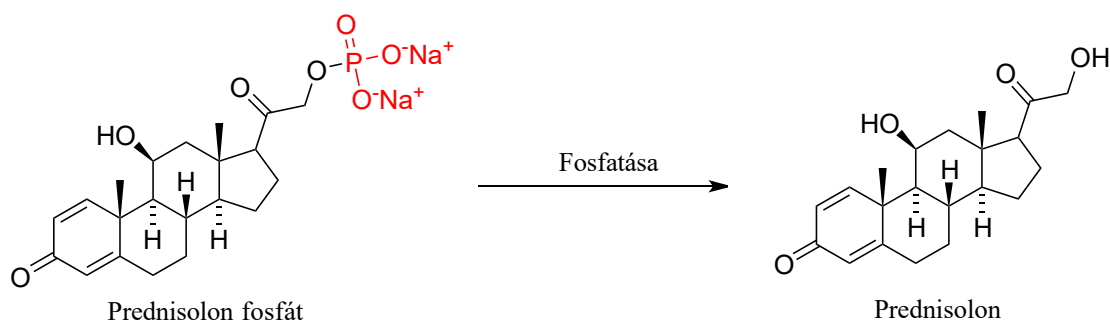
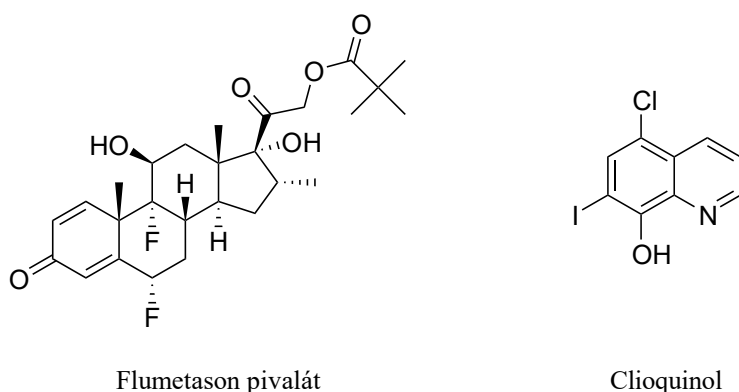


Schéma 5. Enzymová defosfatase Prednisolon fosfátu

Příkladem steroidního fosfátového proléčiva je prednisolon fosforečnan sodný, glukokortikoid, který je asi 30 krát rozpustnější než samotný prednisolon. Využívá se jako imunosupresivum, je protizánětlivý a má vasokonstrikční účinky. Společností FDA byl

schválen již v roce 1973 pro léčbu alergických stavů, očních zánětů nebo dermatologických onemocnění.⁴¹

Flumetason pivalát je kortikosteroid, který vzniká esterifikací flumetasonu na uhlíku C-21 pivalovým radikálem. Je využíván pro své pozitivní účinky na pokožku postiženou psoriázou, ekzémem, dermatitidou nebo alergiemi. Bojuje proti začervenání, svědění a otokům kůže.⁴² Pod komerčním názvem LOCORTEN byl prodáván firmou NOVARTIS jako topický krém. Ovšem díky neurotoxickým účinkům byl později stažen z prodeje.⁴³ Momentálně se Flumetason pivalát nejvíce využívá ve formě roztoku v kombinaci s Clioquinolem pro léčbu zánětů vnějšího ucha.⁴⁴



Obrázek 6. Struktury Flumetason pivalátu a Clioquinolu

V chemii proléčiv lze kromě esterů využít i další funkční skupiny, které mohou pozitivně ovlivnit farmakologické vlastnosti proléčiva a umožnit jeho průchod přes membrány. Za zmínku stojí především karbonáty, karbamáty, ethery, amidy či iminy.

4 Výsledky a diskuse

4.1 Syntetická strategie

Cílem této bakalářské práce bylo připravit sérii proléčiv za účelem potenciálního vylepšení jejich rozpustnosti, permeability a stability. Byly vybrány allopregnanolon a dehydroepiandrosteron, jako představitelé dvou různých strukturních rodin pregnanů a androstanů a také jako hlavní představitelé neurosteroidů s významným terapeutickým neuroprotektivním potenciálem. Připravené látky budou v budoucnu také použity v rámci běžících grantových projektů pro studium neuroprotektivních látek s antikonvulzivním účinkem a pro vývoj nových formulací neurosteroidů. Z výchozích materiálů byly syntetizovány látky s modifikovanou hydroxylovou skupinou na uhlíku C-3 na základě literární rešerše s potenciálně zlepšenými farmakologickými parametry. Byly připraveny série acetátů, chráněných esterů AMK a nikotinátů, u kterých byla srovnávána efektivita přípravy a již zmíněné farmakologické vlastnosti.

4.2 Příprava výchozích látek

4.2.1 Dehydroepiandrosteron

Látka **1** 3 β -hydroxy-androst-5-en-17-on je v naší laboratoři připravována v multimolárním množství dle známého postupu⁴⁵ hydrolýzou acetátu, který je komerčně dostupný. Jeho syntéza tedy nebude v této práci zmíněna.

4.2.2 Allopregnanolon

Látka 3 β -hydroxy-5 α -pregnan-20-on (**6**) byla připravena dvou krokovou syntézou dle literárního postupu,⁴⁶ kterou popisuje následující schéma (**Schéma 6**).

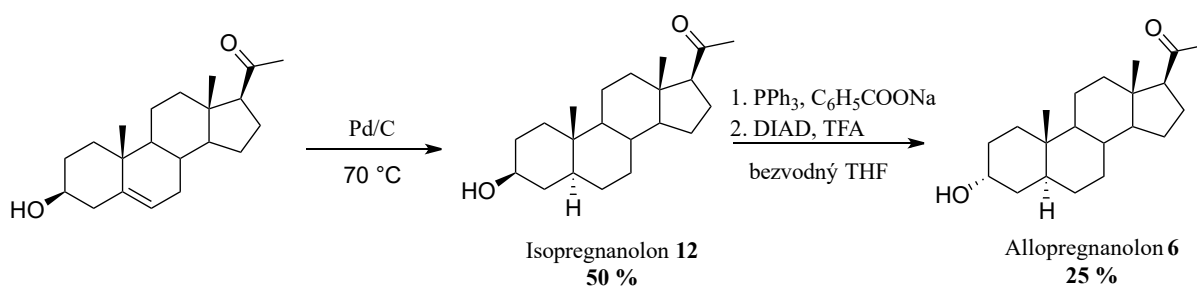


Schéma 6. Schéma dvou krokové syntézy allopregnanolonu.

Výchozí pregnenolon (**11**) byl hydrogenován s 10% palladiem na uhlí za mírného přetlaku vodíku. Pregnenolon se velmi obtížně rozpouštěl v methanolu, tudíž bylo přidáno malé množství chloroformu. Byl připraven meziprodukt 3 β -hydroxy-5 α -pregnan-20-on **12**. Surový

produkt **12** s výtěžkem okolo 14 % byl krystalizován ze směsi ethyl-acetát:*n*-heptan, ovšem nedošlo ke kompletnímu rozpuštění v ethyl-acetátu. Krystalizace byla úspěšně provedena až s využitím směsi methanol/dichlormethan. S ohledem na nízký výtěžek bylo předpokládáno, že většina produktu zůstala na katalyzátoru. Po opakovaném promytí směsí aceton/chloroform byl získán produkt **12** s výtěžkem 95 %. Analýza reakční směsi pomocí ¹H NMR odhalila přítomnost látky s dvojnou vazbou. Proto byl experiment opakován s postupem již zmíněným níže. Nižší výtěžek meziprojektu **12** (50 %) mohl být způsoben nedostatečnou izolací produktu od katalyzátoru.

Meziprojekt **12** a produkt 3 α -hydroxy-5 α -pregnan-20-on **6** jsou vzájemné stereoizomery a bylo tedy třeba vhodně izomerizovat β -hydroxy skupinu v poloze C-3 na požadovanou α konformaci (produkt **6**). Pro tento účel byla zvolena Mitsunobu reakce probíhající S_N2 mechanismem. Literatura naznačuje, že reakce může probíhat přes betainový intermediát, ovšem záleží na pořadí přidávání činidel do směsi.⁴⁸

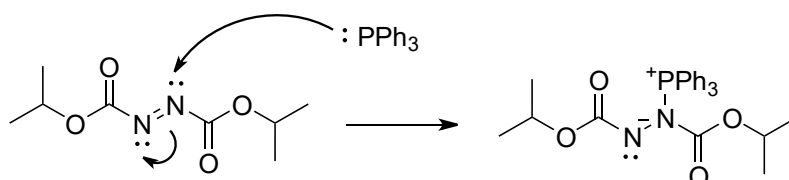


Schéma 7. Vznik betainového intermediátu reakcí diisopropylazodikarboxylátu a trifenylofosfinu

My jsme postup optimalizovali dle osvědčené metody v naší laboratoři. Nejprve byla látka **12**, PPh₃ a benzoát sodný rozpuštěny v tetrahydrofuranu (THF). Benzoát sodný byl do směsi přidán za účelem urychlení reakce.⁴⁸ Za snížené teploty 0 °C byl přidán DIAD a TFA, za vzniku aduktu (DIAD- PPh₃⁺). Druhým krokem reakce je přesun PPh₃⁺ na alkohol (látka **12**). Byl připraven produkt **6** s výtěžkem 25 %. Nižší výtěžek mohl být způsoben neúplným vysrážením surového produktu.

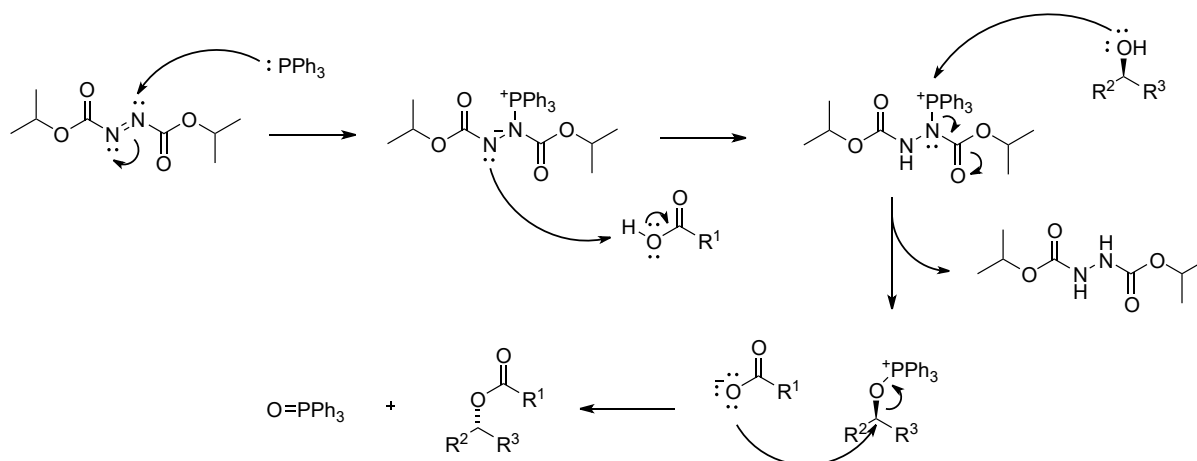


Schéma 8. Obecný mechanismus Mitsunobu reakce. Převzato a upraveno⁴⁸.

4.3 Příprava steroidních C-3 acetátů

Estery s acetátovou skupinou byly připraveny z výchozích sloučenin **1** a **6** acetylací anhydridu kyseliny octové v pyridinu za laboratorní teploty, za vzniku produktů **2** a **7** (Schéma 9).

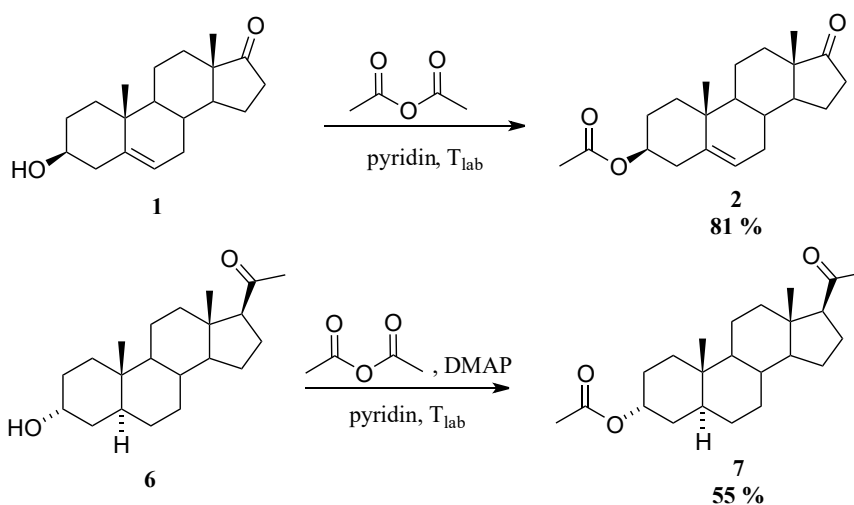


Schéma 9. Katalyzovaná a nekatalyzovaná příprava acetátů **2** a **7** reakcí s acetanhydridem

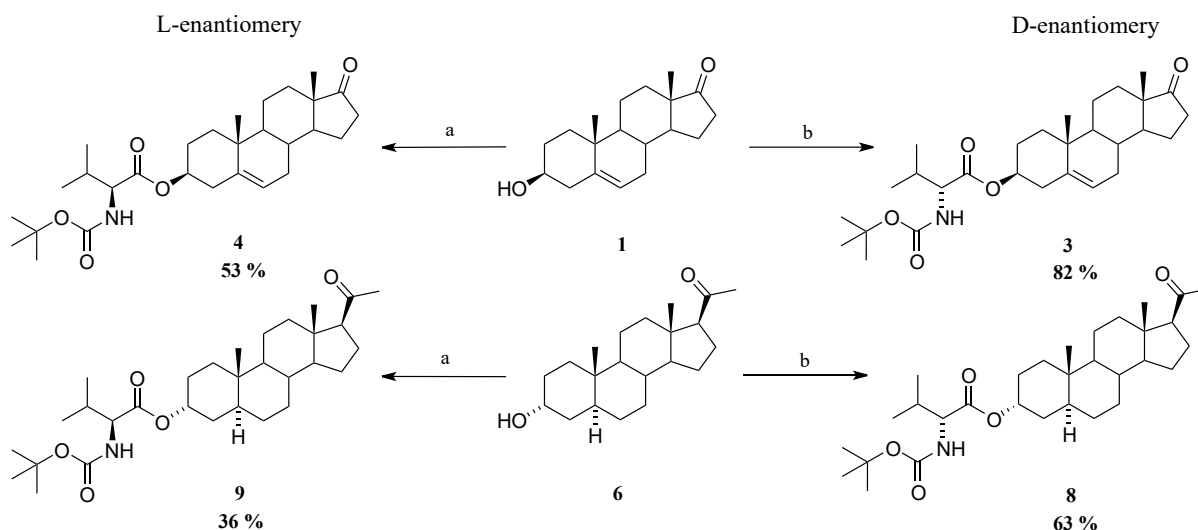
Reakce s výchozí látkou **1** poskytla surový produkt 17-oxo-androst-5-en-3β-yl acetát (**2**). K rekrystalizaci látky **2** byla využita směs aceton/*n*-heptan. Výsledný výtěžek reakce byl 81 %.

Při přípravě látky 20-oxo-5α-pregnan-3α-yl acetátu (**7**) byl do reakční směsi přidán jako nukleofilní katalyzátor DMAP (1 mmol DMAP na 10 mmol látky). Účelem bylo praktické porovnání výtěžků reakce v a bez přítomnosti DMAP. Krystalizace byla u tohoto derivátu poněkud obtížnější. Ze směsi EtOAc/*n*-heptan bohužel ke vzniku krystalů nedošlo, což bylo pravděpodobně způsobeno přidáním přílišného množství rozpouštědla.

Následně byl surový produkt krystalizován pouze v etheru. Došlo k jeho částečnému rozpuštění a vzniku krystalické látky, ovšem bez matečného louhu. Po změření čistoty za pomoci LC-MS, byla zjištěna adekvátní čistota látky **7** a tudíž byla krystalizace považována za úspěšnou. Výtěžek acetylace látky **7** byl 55 %. Porovnáním výtěžků obou acetátů bylo konstatováno, že nekatalyzovaná reakce byla úspěšnější. To mohlo být způsobeno přidáním katalyzátoru v průběhu reakce a následnou komplikovanou krystalizací surového produktu **7**.

4.4 Příprava chráněných derivátů aminokyselin

N-Boc chráněná esterová proléčiva byla připravena podle literatury⁴⁹ za využití enantiomerů Boc-L-valinu a Boc-D-valinu. Tyto chráněné AMK byly získány v rámci ÚOCHB z laboratoře dr. Pavla Majera a v textu nebudou diskutovány. Reakce jsou znázorněny ve Schématu 10.



Z látky **1** byly připraveny látky 17-oxo-androst-5-en-3β-yl (*tert*-butoxykarbonyl)-L-valinát (**4**) a 17-oxo-androst-5-en-3β-yl (*tert*-butoxykarbonyl)-D-valinát (**3**). Z výchozí látky **6** byly připraveny 20-oxo-5α-pregnan-3α-yl (*tert*-butoxykarbonyl)-L-valinát (**9**) a 20-oxo-5α-pregnan-3α-yl (*tert*-butoxykarbonyl)-D-valinát (**8**). Při porovnání se prokázaly jako úspěšnější syntézy s Boc-D-valinem, které měly podstatně lepší výtěžky (Schéma 10). Důvodem by mohla být rozdílná reaktivita činidel.

4.5 Příprava C-3 steroidních nikotinátů

První pokusy o přípravu 17-oxo-androst-5-en-3 β -yl nikotinátu (**5**) s využitím 1,5 ekv. nikotinoyl chlorid hydrochloridu v přítomnosti báze byly neúspěšné. Reakce byla provedena v suchých rozpouštědlech za reakčních podmínek, jak je znázorněno ve **Schématu 11**.

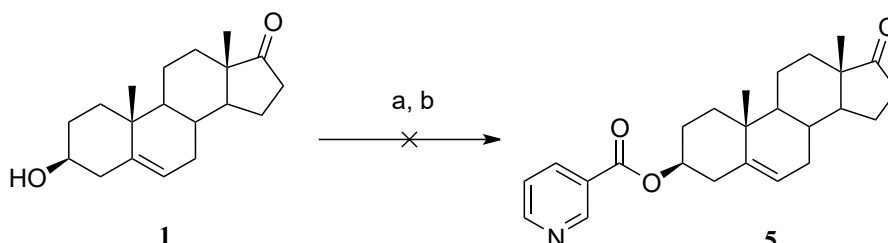


Schéma 11. Příprava androst-5-en-17-on-3 β -yl nikotinátu a) nikotinoyl chlorid hydrochlorid, tributylamin, Ar, 60 °C, pyridin; b) nicotinoyl chlorid hydrochlorid, DMAP, Ar, 60 °C, pyridin

¹H-NMR prokázalo pouze pík charakteristický pro hydroxy skupinu (3,95 ppm) výchozí látky. Ke vzniku žádaného produktu **5** došlo až po přidání 3 ekv. nikotinoyl chlorid hydrochloridu na 1 ekv. výchozí látky **1**. Pevná látka byla rozpuštěna v suchém pyridinu a reakce byla katalyzována pomocí DMAP (1 ekv.). Esterifikace proběhla po 12 hodinách za zvýšené teploty 50 °C. Po extrakci byl v organické fázi nalezen zůstatek pyridinu, pravděpodobně nedostatečným vytřepáním, který byl odstraněn opakovaným odpařením vzorku s toluenem. ¹³C-NMR spektrum prokázalo vznik produktu **5** s charakteristickými píky: 221,2 (C-17); 164,6 (C-1'); 122,5 (C-6); 75,2 (C-3). Elementární analýza potvrdila odpovídající procentuální zastoupení atomu dusíku v molekule.

Stejný postup byl opakován pro syntézu látky **10** z výchozí látky **6**. Výtěžek této reakce (55 %) byl v porovnání s produktem **5** (24 %) výrazně lepší.

4.6 Čistota látek

Čistota všech látek byla zajištěna rekrystalizací surového produktu nebo přečištěním sloupcovou chromatografií. Kontrola čistoty byla poté prováděna pomocí HPLC-ELSD-MS. HPLC-ELSD-MS (angl. high-performance liquid chromatography coupled with evaporative light scattering detection and mass spectrometry) je separační technika kapalinové chromatografie s detektorem rozptylu světla a hmotnostní spektrometrií, sloužící k separaci a detekci molekul. Metoda HPLC využívá afinity analytů k mobilní a stacionární fázi. V tomto případě byla využita chromatografie s reverzní fází, kdy je stacionární fáze tvořena silikagelem s nepolárními organickými skupinami, a mobilní fáze je polární.⁵⁰ Následná detekce byla provedena pomocí kvadrupólu, zároveň s potvrzením čistoty separovaného vzorku.

Hmotnostní spektrometr se skládá z iontového zdroje, analyzátoru a detektoru iontů. V tomto případě bylo ionizace dosaženo pomocí speciálního druhu duální ionizace, konkrétně chemické ionizace za atmosférického tlaku (APCI) a elektrosprejové ionizace (APCI&ESI). Jedná se o kombinaci, která zajišťuje měření většího množství rozmanitých vzorků. Následné rozdělení iontů podle poměru m/z , kde m je hmotnost iontu a z počet elementárního náboje zajišťuje hmotnostní analyzátor – jednoduchý kvadrupól. Následná detekce je prováděna pomocí fotonásobiče. ELSD představuje univerzální detektor pro stanovení nečistot separovaných HPLC. Nabízí jednoduchý a spolehlivý systém měřící množství rozptýleného světla částicemi analytu, založeného na třech procesech – zmlžování (nebulizace), odpařování a detekce. Jedná se o detektor měřící bez ohledu na spektrální vlastnosti látek, kde je zásadní absolutního množství analytu.⁵¹

Je vhodnou volbou pro určení čistoty na bázi aerosolu při analýze steroidních látek. Jedná se totiž o analyty, které jsou netěkavé, a některé nejsou schopny absorbovat nad 200 nm. S ohledem na optické vlastnosti daných látek, ELSD umožňuje analýzu sloučenin bez chromoforu či fluoroforu v molekulární struktuře.

Spojení HPLC-ELSD-MS zaručuje široké pokrytí spektra stanovovaných látek včetně informací o struktuře s identifikací případných nečistot. MS poskytuje vysokou spolehlivost a citlivost, ELSD umožňuje detekci sloučenin bez optických vlastností pro detekci.

4.6.1 Parametry měření čistoty

HPLC – gradientová eluce

Mobilní fáze	A: H ₂ O, MeOH, FA (950:50:1); B: ACN
Průtok mobilní fáze	0,6 ml/min
Teplota kolony	40 °C
Objem nástřiku	1 µL
Kolona	C8-120
MS	
Ionizace	APCI&ESI
DL teplota	250 °C
Heat block teplota	400 °C
Náboj	0,9 eV
ELSD	
Evaporační teplota	50 °C
Odezva	12
Tlak plynu	350 kPa

Tabulka 1. Parametry měření čistoty syntetizovaných derivátů.

4.7 Farmakologické vlastnosti steroidních derivátů

U syntetizovaných derivátů byly změřeny charakteristiky, které vypovídají o schopnosti látky figurovat jako proléčivo. Níže uvedené experimenty byly měřeny v rámci vnitroústavní spolupráce Karlem Kudláčkem a Timotejem Strmeňem. Výsledky jsou shrnuty v **Tabulce 3**. Bylo zjištěno, že zvolené prodrug skupiny nezlepšují ani rozpustnost, ani průchod látek přes membránu v PAMPA eseji. Vysoká stabilita látek byla pravděpodobně způsobena nízkou rozpustností látek v eseji, a tudíž ani nemohlo dojít k jejich metabolizaci mikrosomy.

V rámci této bakalářské práce byla testována kinetická a termodynamická rozpustnost derivátů. Jako zásobní roztok byl připraven 20 mM roztok vzorku (5 µmol) rozpuštěného v DMSO. Ředěním tohoto zásobního roztoku směsí fosfátového pufru (PBS) a acetonitrilu (50:50) byly připraveny jednotlivé kalibrační standardy.

Kinetická rozpustnost byla měřena ve vzorcích obsahujících 10 µl zásobního roztoku a 990 µl PBS. Takto připravený roztok byl míchán 60 minut a následně centrifugován po dobu

10 minut. Pro měření termodynamické rozpustnosti byly připraveny vzorky obsahující 0,4 μmol steroidní látky a 1000 μl PBS pufru. Vzorek byl míchán po dobu 24 hodin a centrifugován opět po dobu 10 minut. K vyhodnocení rozpustnosti byla využita kalibrace vnějšího standardu. Pro posouzení čistoty vzorku byly vypočítány relativní plochy píků metodou vnitřní normalizace. Rozpustnost lze hodnotit pouze v případě, že vzorek obsahuje jediný analyt nebo zanedbatelné množství jiných analytů. Hlavní analyt je ve vzorku stanoven jako pík s největší plochou, v případě přítomnosti chromoforu pak lze tento analyt se znalostí jeho struktury identifikovat podle UV absorpčního spektra.

Kinetická a termodynamická rozpustnost

Kolona	Thermo Scientific Accucore Phenyl-hexyl; (100×3 mm; 2,6 μm)
Mobilní fáze	Acetonitril; 5mM mravenčanový pufr
Průtok mobilní fáze	0,8 $\mu\text{l min}^{-1}$
Teplota kolony	40 °C
Teplota detektoru	30 °C
Objem nástřiku vzorku	5 μl
Detekce	CAD

Tabulka 2. Podmínky měření kinetické a termodynamické rozpustnosti

Následně byla testována mikrosomální stabilita. Směsi látek a verapamilu byly aplikovány do mikrodesek a poté přeneseny do mikrodesek polypropylenu. Do každé mikroděsky bylo přidáno NADPH, roztok chloridu hořečnatého v tris pufru a mikrosomy. Deska byla poté pokryta krystalografickou páskou a inkubována při 37 °C. Během inkubace byly postupně přidávány mikrosomy a po 45 minutách reakci byla zastavena přidáním acetonitrilu. Po centrifugaci a ekvilibraci byly vzorky převedeny do dalších mikrodesek a zředěny methanolem. Pro ověření linearitu signálů byly připraveny kalibrační křivky s odlišnými objemy DMSO roztoků.

Při měření průchodu látek membránou v PAMPA eseji byly nejprve látky zředěny z 10 mM roztoku v DMSO na konečnou koncentraci 100 μM ve 50 mM TRIS pufru (pH = 7,4) a rozděleny do tří alikvotů. Tyto roztoky byly přeneseny do donorových jam PAMPA destičky.

Do akceptorových jamek bylo přeneseno 200 µl 50 mM TRIS pufru s 1% DMSO. Destička byla inkubována po dobu 5 hodin při pokojové teplotě. Po inkubaci byly roztoky z donorových a akceptorových jam přeneseny do oddělených 96 jamkových destiček a zmrazeny při -20 °C do doby analýzy. Před analýzou byly vzorky rozmrazeny a zředěny podle jejich detekčních limitů v LC-MS s 50% nebo 100% acetonitrilem ve vodě obsahující 40 nM tolbutamid jako vnitřní standard. Zředěné roztoky v 96 jamkových destičkách byly uzavřeny hliníkovou fólií a umístěny do autosampleru LC-MS. Kalibrační roztoky byly připraveny ze stejných DMSO zásobních roztoků, které byly použity pro test s podobnou maticí.

Látka	Stabilita v krysích mikrosomech			Permeabilita v PAMPA esejí				Rozpustnost	
	$t_{1/2}$ (min)	SD (min)	clearance (µL/min/mg protein)	Pe ($\cdot 10^6$)	SD Pe ($\cdot 10^6$)	Retence (%)	Recovery (%)	Kinetická rozpustnost (µM)	Termodynamická rozpustnost (µM)
DHEA (1)	<5		>275	23,9	3,6	55,3	44,7	73	54
2	32,4	13,3	42,7	<1,7		99,4	0,6	4,3	3,4
3	>45		9,7	<0,5		98,7	1,3	<2	<2
4	>45		<2	<0,1		95,8	4,2	<2	<2
5	>45		<2	0,0	0,0	98,6	1,4		
ALLO (6)	43,7	9,5	31,4	1,6	0,2	96,3	3,7	4,3	4
7	>45		5,2	<0,2		99,8	0,2	<2	<2
8	>45		<2	0,0	0,0	95,9	4,1	<2	<2
9	>45		5,6	<0,2		97,6	2,4	<2	<2
10	>45		11,2	<0,1		100,0	0,0	<2	<2
Verapamil	39,8		34,6	35,3		28,7	71,3		

Tabulka 3. Výsledné hodnoty měření mikrosomální stability, permeability a kinetické a termodynamické rozpustnosti steroidních derivátů

5 Experimentální část

5.1 Obecné postupy a chemikálie

Komerčně dostupné chemikálie a suchá rozpouštědla (pyridin) byly zakoupeny u Merck Life Science spol. s r.o., Praha, Česká republika a byly použity bez dalšího čištění. Reakce, u kterých nebyla využita suchá rozpouštědla, byly provedeny s využitím destilovaných rozpouštědel. Pro odpaření rozpouštědel byla použita rotační vakuová odparka.

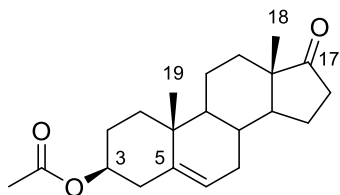
Reakce, které vyžadovaly inertní podmínky, byly provedeny s využitím atmosféry argonu, popřípadě dusíku. Průběh reakcí byl sledován pomocí TLC chromatografie (tenkovrstvá chromatografie), pro kterou byly využity TLC destičky Merck Slikagel 60 F254. Detekce látek byla provedena pomocí směsi MeOH/ konc. H₂SO₄ (10/1) s následným zahřátím horkovzdušnou pistolí. Flash chromatografie byla provedena na přístroji puriFlash 5.250 (Interchim, Montluçon, Francie). Jako stacionární fáze byl použit silikagel (Merck 40-63 μm) a ELSD detektor. Měření optické rotace bylo provedeno na přístroji AUTOPOL IV (Rudolf Research Analytical, Hackettstown, NJ). Všechny vzorky o příslušné koncentraci byly měřeny při teplotě 20 °C a vlnové délce záření $\lambda = 589 \text{ nm}$. Jako rozpouštědlo byl použit chloroform. NMR spektra byla měřena na spektrometru Bruker Advance IIIT HD 400 MHz (400 MHz pro ¹H spektra a 101 MHz pro ¹³C spektra). Chemické posuny jsou uváděny v ppm (δ) a referencovány na použité rozpouštědlo (CDCl₃, δ 7,26 pro ¹H NMR a δ 77,16 pro ¹³C NMR). Spektra vzorků byla zpracována v programu MestReNova. FTIR spektra byla měřena na spektrometru Nicolet 6700 (Thermo Scientific, USA), vybaveném standardním zdrojem MIR, KBr rozdělovačem paprsků a DTGS detektorem v ATR-FTIR modu s využitím ATR hranolu (Spike Technologies, USA) v rozsahu 4000-600 cm⁻¹. Spektrum vodní páry bylo vždy odečteno.

Měření hmotnostních spekter bylo provedeno pomocí přístroje LTQ Orbitrap XL (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA) s využitím ionizace elektrosprejem a APCI. Pro elementární analýzu byl využit automatický analyzátor PE 2400 Series II CHNS/O (PerkinElmer, Waltham, MA), k přesnému navážení vzorku byly použity šestimístné mikrováhy MX (Mettler Toledo, Švýcarsko).

Stanovení rozpustnosti bylo provedeno pomocí kapalinového chromatografu Vanquish UHPLC (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) vybaveném kvartérní pumpou (VC-P20-A-01). Absorpční DAD detektor pracuje při vlnových délkách 190-800 nm.

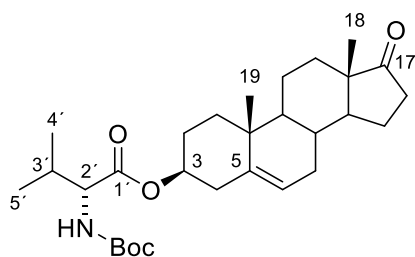
5.2 Syntéza derivátů

Příprava 17-oxo-androst-5-en-3β-yl acetátu (2)



Acetanhydrid (3 ml, 29 mmol) byl přidán do roztoku látky **1** (1 g; 3,47 mmol) v pyridinu (5 ml) a reakční směs byla míchána 24 hodin při laboratorní teplotě. Poté bylo do reakční směsi přidáno 25 ml vody a vzniklá sraženina produktu byla odsáta na Büchnerově nálevce. Vysušená sraženina byla rozpuštěna v ethylacetátu (10 ml) a organická fáze byla promyta vodným roztokem kyseliny chlorovodíkové (5%, 2 x 10 ml), destilovanou vodou (10 ml) a nasyceným vodným roztokem hydrogenuhličitanu sodného (2 x 10 ml). Organická fáze byla sušena nad bezvodým síranem sodným a rozpouštědla byla odpařena na rotační vakuové odparce. Krystalizace surového produktu (915 mg) ze směsi ethylacetát/*n*-heptan (1:6) poskytla produkt **2** ve formě bílých krystalů s výtěžkem 810 mg (81 %): b.t. 165 – 167,3 °C. $[\alpha]_D^{25} -5,1$ (c 0,307; CHCl₃). ¹H NMR (401 MHz, CDCl₃): δ 5,41 (1H, dt, *J*₁ = 5.1 Hz, *J*₂ = 1.4 Hz, H-6); 4,65 – 4,56 (2H, m, H-3); 2,03 (3H, s, acetát); 1,05 (3H, s, H-19); 0,88 (3H, s, H-18). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ 221,2 (C-17); 170,7 (acetát); 140,1 (C-5); 122,0 (C-6); 73,9 (C-3); 51,8; 50,3; 47,7; 38,2; 37,1; 36,9; 36,0; 31,6; 31,6; 30,9; 27,8; 22,0; 21,6; 20,5; 19,5; 13,7. IČ (CHCl₃): 2963, 2950 (CH₃); 2938 (CH₂); 1730 (C=O, keton); 1730, 1717 (C=O, ester); 1255 (C–O, ester). HR-MS (ESI+) *m/z*: pro C₂₁H₃₀O₃Na [M+Na] vypočteno 353,2087; nalezeno 353,2085. Pro C₂₁H₃₀O₃ (330,2195) vypočteno 76,33 % C; 9,15 % H; nalezeno 76,20 % C; 9,12 % H.

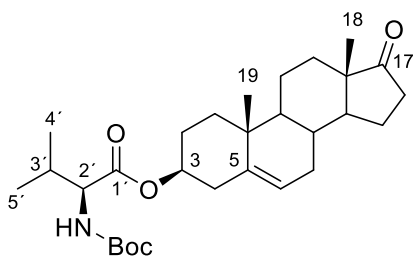
Příprava 17-oxo-androst-5-en-3β-yl (*tert*-butoxykarbonyl)-D-valinátu (3)



V baňce byla smíchána látka **1** (374 mg; 1,3 mmol) s 4-(dimethylamino)pyridinem (122 mg; 1 mmol). Směs byla pod atmosférou argonu rozpuštěna v destilovaném chloroformu (26,5 ml) a byl přikapán *N,N*-diisopropylethylaminu (0,35 ml; 2 mmol). Za stálého míchání byl přidán *N*-(*tert*-butoxykarbonyl)-D-valin (434 mg; 2 mmol), ethyl(dimethylaminopropyl)karbodiimid hydrochlorid (383 mg; 2 mmol) a směs byla míchána za laboratorní teploty 24 hodin. Následně byla reakční směs odpařena na rotační vakuové odparce, odparek byl rozpuštěn v dichlormethanu (70 ml) a organická fáze byla promyta destilovanou vodou (2 x 15 ml). Separovaná organická fáze byla sušena nad bezvodým síranem sodným a odpařena na rotační vakuové odparce. Izolace za pomoci flash chromatografie

(petrolether/ethylacetát, grad. 0-20 %) poskytla 306 mg krystalické látky **3** (82 %): b.t. 100,4 – 105,3 °C. $[\alpha]_D^{20} +9,6$ (c 0,280; CHCl₃). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 5,41 (H, d, H-6); 4,72 – 4,62 (H, m, H-3); 4,18 (H, dd, *J*₁ = 8.7 Hz, *J*₂ = 4.3 Hz, H-2'); 1,44 (9H, s, 3 x CH₃); 1,05 (3H, s, 3H-19); 0,97 (3H, s, H-4'); 0,96 (3H, s, H-5'); 0,88 (3H, s, H-18). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 207,1 (C-17); 171,9 (C-1'); 155,8 (C=O, Boc); 139,8 (C-5); 122,2 (C-6), 74,7 (C(CH₃), Boc); 51,8 (C-3); 50,3; 47,7; 38,2; 37,0; 36,9; 36,0; 31,6; 31,5; 31,1 (3C); 30,9; 28,5 (2C); 27,9; 22,0; 20,5; 19,5; 19,1; 18,5; 17,7; 13,7. IČ (CHCl₃): 2969 (CH₃); 2939 (CH₂); 1732 (C=O, keton); 1732 (C=O, ester). HR-MS (ESI) *m/z* (%): pro C₂₉H₄₅NO₅Na [M + Na⁺] vypočteno 510,3190; nalezeno 510,3186. Pro C₂₉H₄₅NO₅ (487,6810) vypočteno 71,42 % C; 9,30 % H; 2,87 % N; nalezeno 71,47 % C; 9,17 % H; 2,68 % N.

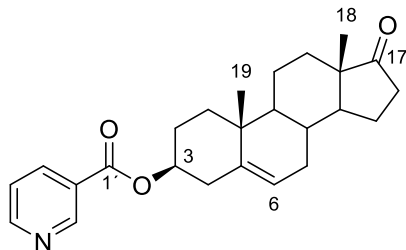
Příprava 17-oxo-androst-5-en-3β-yl (*tert*-butoxykarbonyl)-L-valinátu (**4**)



Byla navážena látka **1** (374 mg; 1,3 mmol) a 4-(dimethylamino)pyridin (122 mg; 1 mmol). Pod atmosférou argonu byl ke směsi přikápan destilovaný chloroform (26,5 ml) a N,N-diisopropylethylamin (0,348 ml; 2 mmol). Následně byl za stálého míchání přidán *N*-(*tert*-butoxykarbonyl)-D-valin (434 mg; 2 mmol) a ethyl(dimethylaminopropyl)karbodiimid hydrochlorid (383 mg; 2 mmol) a směs byla míchána za laboratorní teploty 24 hodin. Dle TLC chromatografie (petrolether/ethylacetát, 8:2) obsahovala reakční směs malé množství výchozí látky, i přesto bylo provedeno následné zpracování. Rozpouštědlo bylo odpařeno na rotační vakuové odparce a odparek byl rozpuštěn v dichlormethanu (70 ml). Organická fáze byla promyta destilovanou vodou (2 x 15 ml), následně sušena nad bezvodým síranem sodným a odpařena na rotační vakuové odparce. Za pomoci flash chromatografie (petrolether/ethylacetát, grad. 0-20%) bylo izolováno 198 mg (53 %) bílé krystalické látky **4**: b.t. 152,7 – 156,8 °C. $[\alpha]_D^{20} +0,9$ (c 0,305; CHCl₃). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 5,43 – 5,39 (1H, m, H-6); 5,02 (1H, d, *J* = 8.8 Hz, H-3); 4,18 (H, m, H-2'); 1,44 (9H, s, 3 x CH₃); 1,05 (3H, s, 3H-19); 0,97 (3H, s, H-4'); 0,96 (3H, s, H-5'); 0,89 (3H, s, H-18). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 207,1 (C-17); 171,9 (C-1'); 139,8 (C-5); 122,3 (C-6); 74,7 (C(CH₃)₃, Boc); 51,8 (C-3); 50,3; 47,7; 38,2; 37,0; 36,9; 36,0; 31,59; 31,53; 31,1 (3C); 30,9; 28,5 (2C); 27,8; 22,0; 20,5; 19,5; 19,1; 18,6; 17,7; 13,7. IČ (CHCl₃): 2969 (CH₃); 2938 (CH₂); 1732 (C=O, keton); 1732 (C=O, ester). HR-MS (ESI) *m/z* (%): pro C₂₉H₄₅NO₅Na [M + Na⁺] vypočteno 510,3190; nalezeno 510,3186. Pro

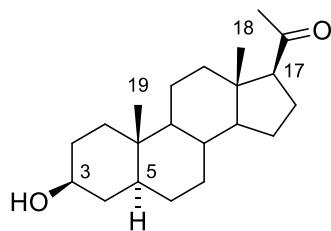
C₂₉H₄₅NO₅ (487,6810) vypočteno 71,42 % C; 9,30 % H; 2,87 % N; nalezeno 71,63 % C; 9,17 % H; 2,72 % N.

Příprava 17-oxo-androst-5-en-3β-yl nikotinátu (5)



Směs látky **1** (400 mg; 1,4 mmol), nikotinoyl chloridu hydrochloridu (741 mg; 4,2 mmol) a 4-(dimethylamino)pyridinu (169 mg; 1,4 mmol) v baňce byla vložena do ledové lázně s míchadlem. Pod atmosférou argonu byl přikapán suchý pyridin (69 ml). Směs byla míchána do rozpuštění pevné látky a poté ponechána v termostatu 24 hodin. Následně byla reakční směs nalita do směsi vody a ledu (500 ml) a ponechána ke srážení 24 hodin. Pevná fáze byla odsáta na Büchnerově nálevce a promyta destilovanou vodou (10 ml). Po vysušení byla látka **5** přečištěna sloupcovou chromatografií (chloroform/aceton, grad. 0-2 %). Reakce poskytla produkt **5** ve formě bílých krystalů o navážce 95 mg (24 %): b.t. 270,3 – 275,5 °C. $[\alpha]_D^{20} +22,2$ (c 0,349; CHCl₃). ¹H NMR (401 MHz, CDCl₃) δ 9,23 (1H, m, arom.); 8,77 (1H, m, arom.); 8,32 (1H, m, arom.); 7,41 (1H, m, arom.); 5,47 (1H, d, *J* = 4,8 Hz, H-3); 4,95 – 4,86 (1H, m, H-6); 1,11 (3H, s, H-19); 0,90 (3H, s, H-18). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 221,2 (C-17); 164,6 (C-1'); 152,9 (arom.); 150,6 (arom.); 139,8 (C-5); 137,6 (arom.); 126,9 (arom.); 123,6 (arom.); 122,5 (C-6); 75,2 (C-3); 51,9; 50,3; 47,7; 38,2; 37,1; 36,9; 36,0; 31,6; 31,6; 31,0; 27,9; 22,0; 20,5; 19,5; 13,7. IČ (CHCl₃): 1732 (C=O, ester); 1720 (C=O, keton); 1592; 1290 (C-O). HR-MS (APCI) *m/z* (%): pro C₂₅H₃₁NO₃CIP vypočteno 393,2; nalezeno 394,2. Pro C₂₅H₃₁NO₃ (393,23) vypočteno 76,30 C; 7,94 H; 3,56 N; nalezeno 75,96 C; 7,89 H; 3,39 N.

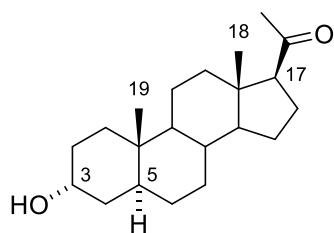
Příprava 3β-hydroxy-5α-pregnan-20-onu (12)



Látka **11** (24 g; 76 mmol) byla rozpuštěna ve směsi methanolu (100 ml) a chloroformu (50 ml), jako katalyzátor bylo přidáno palladium na uhlíku (2,4 g). Reakční směs byla přivedena k varu pod atmosférou argonu, který byl následně vyměněn za vodík a směs byla míchána 4 hodiny. Průběh reakce byl kontrolován pomocí TLC chromatografie (petrolether/ether, 1:1). Směs byla přefiltrována přes silikagel a křemelinu, promyta chloroformem (20 ml) a rozpouštědla byla odpařena na rotační vakuové odparce. Krystalizace ze směsi methanol/dichlormethan (9:1) poskytla bílou krystalickou látku **12** o hmotnosti 11,9 g (50 %): b.t. 190,4 - 194,6 °C. $[\alpha]_D^{20} +86,3$ (c 86,3; CHCl₃). ¹H NMR (400

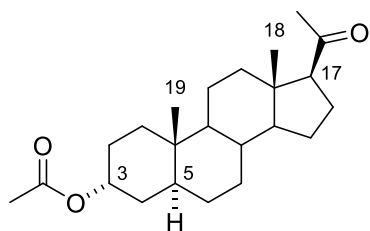
MHz, CDCl₃) δ 3,63 – 3,48 (1H, m, H-3); 2,54 – 2,48 (1H, m, H-17); 2,16 (3H, s, H-21); 0,80 (3H, s, H-19); 0,60 (3H, s, H-18). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 209,9 (C-20); 71,4 (C-3); 64,0; 56,9; 54,4; 45,0; 44,4; 39,2; 38,3; 37,2; 35,7; 35,6; 32,2; 31,7; 31,6; 28,7; 24,6; 22,9; 21,4; 13,6; 12,5. IČ (CHCl₃): 2969 (CH₃); 2933 (CH₂); 1698 (C=O). HR-MS (ESI) *m/z* (%): pro C₂₁H₃₂O₂Na [M + Na⁺] vypočteno 341,2451; nalezeno 341,2450. Pro C₂₁H₃₂O₂ (316,24) vypočteno 79,19 C; 10,76 H; nalezeno 79,54 C; 10,79 H.

Příprava 3α-hydroxy-5α-pregnan-20-onu (6)



Látka **12** (11 g; 34,8 mmol), trifenylofosfin (11,19 g; 42,7 mmol) a benzoát sodný (6,05 g; 42 mmol) byly vysušeny pod vakuem. K této směsi byl za stálého míchání v následujícím pořadí přidán tetrahydrofuran (102 ml), diisopropylazodicarboxylát (8,36 ml) a kyselina trifluoroctová (8,36 ml). Reakce byla provedena v ledové lázni pod atmosférou argonu. Reakční směs byla takto míchána po dobu 48 hodin. TLC chromatografie byla provedena v mobilní fázi petrolether/ether (1:1). Následně byl přidán methanol (110 ml) a směs byla odpařena na rotační vakuové odparce. Tento proces byl ještě jednou zopakován. K této směsi byl přidán opět methanol (165 ml), destilovaná voda (5,5 ml) a směs byla refluxována 24 hodin. Precipitace byla provedena v destilované vodě (1500 ml). Sraženina byla odsáta na Büchnerově nálevce a vysušena v termostatu. Opakovaná krystalizace ze směsi ethylacetát/*n*-heptan (1:2) poskytla 2,7 g (26 %) bílých krystalů. Látka **6**: b.t. 170,7 - 174,4 °C. [α]_D²⁰ +97,1 (c 0,297; CHCl₃). ¹H NMR (401 MHz, CDCl₃) δ 4,07 – 4,03 (1H, m, H-3); 2,53 (1H, t, *J* = 8,9 Hz, H-17); 2,11 (3H, s, H-21); 0,78 (3H, s, H-19); 0,60 (3H, s, H-18). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 210,7 (C-20); 66,7 (C-3); 64,0 (C-17); 56,9; 54,35; 44,4 (C-5); 39,2 (2C); 36,7; 36,0; 35,6; 32,3; 32,1; 31,7; 29,1; 28,6; 24,5; 22,9; 20,9; 13,6; 11,3. IČ (CHCl₃): 2969 (CH₃); 2932 (CH₂); 1697 (C=O, keton) 1002 (C-OH). HR-MS (ESI) *m/z* (%): pro C₂₁H₃₄O₂Na [M + Na⁺] vypočteno 341,2451; nalezeno 341,2454. Pro C₂₁H₃₄O₂ (318,26) vypočteno 79,19 C; 10,76 H; nalezeno 78,56 C; 10,32 H.

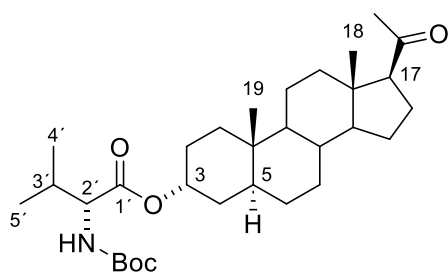
Příprava 20-oxo-5α-pregnan-3α-yl acetátu (7)



4-(Dimethylamino)pyridin (20 mg; 0,82 mmol) byl rozpuštěn v pyridinu (2 ml) a ke směsi byla přidána látka **6** (200 mg; 0,63 mmol). Baňka byla umístěna do ledové lázně a po rozpuštění veškeré pevné látky byl přikapán acetanhydrid (1 ml). Směs

byla následně ponechána 24 hodin v termostatu. Směs byla nalita do destilované vody (300 ml) a ponechána srážet dalších 24 hodin. Sraženina byla odsáta na Büchnerově nálevce, promyta destilovanou vodou a sušena. Krystalizace z etheru (2 ml) poskytla 111 mg (55 %) látky **7** ve formě bílých krystalů. Látka **7**: b.t. 136,1 – 139,3 °C. $[\alpha]_D^{20} +94,9$ (c 0,275; CHCl₃). ¹H NMR (401 MHz, CDCl₃) δ 4,97 (1H, q, *J* = 2,6 Hz, H-3); 2,55 (3H, s, acetát); 2,49 (1H, t, *J* = 8,9 Hz, H-17); 2,02 (3H, s, H-21); 0,75 (3H, s, H-19); 0,56 (3H, s, H-18). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 210,3 (C-20); 170,7 (C=O, acetát); 69,9 (C-3); 63,5; 56,3; 53,6; 43,9; 39,6; 38,6; 38,6; 35,4; 35,0; 32,4; 32,4; 31,4; 27,8; 25,6; 23,9; 22,3; 21,1; 20,4; 13,0; 10,9. IČ (CHCl₃): 2968 (CH₃); 1727 (C=O, ester); 1362 (CH₃, keton); 1243 (C-O, ester). HR-MS (ESI) *m/z* (%): pro C₂₃H₃₆O₃Na [M + Na⁺] vypočteno 383,2557; nalezeno 383,2556. Pro C₂₃H₃₆O₃ (360,27) vypočteno 76,62 C; 10,06 H; nalezeno 76,17 C; 10,30 H.

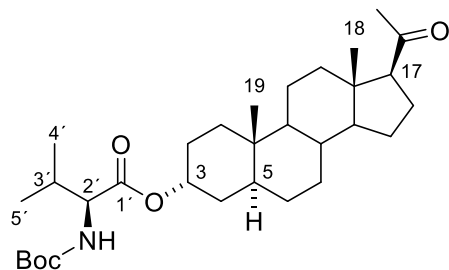
Příprava 20-oxo-pregnan-3β-yl (*tert*-butoxykarbonyl)-D-valinátu (**8**)



Směs látky **6** (239 mg; 0,75 mmol) a 4-(dimethylamino)pyridinu (61 mg; 0,50 mmol) byla pod atmosférou dusíku rozpuštěna v čerstvě destilovaném chloroformu (13,3 ml) a po rozpuštění byl přidán N,N-diizopropyletylamin (174 μl; 1 mmol). K reakční směsi byl přidán *N*-(*tert*-butoxykarbonyl)-D-valin (217 mg; 1 mmol), ethyl(dimethylaminopropyl)karbodiimid hydrochlorid (192 mg; 1 mmol) a směs byla míchána pod inertní atmosférou 24 hodin. Rozpouštědlo bylo odpařeno na rotační vakuové odparce, odparek byl rozpuštěn v dichlormethanu (35 ml) a přefiltrován přes smotek vaty. Organická fáze byla promyta destilovanou vodou (2 x 10 ml), sušena nad bezvodým síranem sodným a odpařena na rotační vakuové odparce. Surový produkt byl přečištěn sloupcovou chromatografií (ethylacetát/petrolether, grad. 0-15 %). Reakce poskytla bílou krystalickou látku **8** s výtěžkem 150 mg (63 %). Látka **8**: b.t. 190,4 -194,6 °C. $[\alpha]_D^{20} +63,2$ (c 0,265; CHCl₃). ¹H NMR (401 MHz, CDCl₃) δ 5,10 – 5,02 (1H, m, H-3); 4,22 (H, dd, *J*₁ = 9,1 Hz, *J*₂ = 4,4 Hz, H-2'); 2,53 (1H, t, *J* = 8,8 Hz, H-17); 2,12 (3H, s, C-21); 1,45 (9H, s, 3 x CH₃); 0,99 (3H, s, H-4'); 0,97 (3H, s, H-5'); 0,79 (3H, s, 3H-19); 0,61 (3H, s, H-18). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 209,8 (C-20); 172,0 (C-1'); 155,9 (C=O, Boc); 79,8 (C(CH₃)₃); 71,4 (C-3); 66,0; 64,0; 58,7; 56,8; 54,3; 44,4; 40,4; 39,2; 36,0; 35,6; 33,1; 33,0; 32,1; 31,7; 28,5 (3C); 26,2; 24,5; 22,9; 20,9; 19,2; 17,5; 15,4; 13,6; 11,5. IČ (CHCl₃): 3441 (NH); 2969 (CH₃); 2935 (CH₂); 1732 (C=O, ester); 1703 (C=O, keton). HR-MS (ESI) *m/z* (%): pro C₃₁H₅₁O₅Na [M + Na⁺] vypočteno 540,3659;

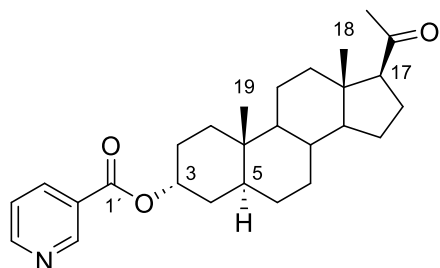
nalezeno 540,3658. Pro $C_{31}H_{51}O_5$ (517,38) vypočteno 71,92 C; 9,93 H; 2,71 N; nalezeno 71,95 C; 9,91 H; 2,50 N.

Příprava 20-oxo-5 α -pregnan-20-on-3 β -yl (*tert*-butoxykarbonyl)-L-valinátu (9)



Ke směsi látky **6** (239 mg; 0,75 mmol) a 4-(dimethylamino)pyridinu (61 mg; 0,50 mmol) byl pod atmosférou dusíku přikapán čerstvě destilovaný chloroform (13,3 ml) a *N,N*-diizopropyletylamin (174 μ l; 1 mmol). Po rozpuštění pevné látky byl přidán *N*-(*tert*-butoxykarbonyl)-L-valin (217 mg; 1 mmol), ethyl(dimethylaminopropyl)karbodiimid hydrochlorid (192 mg; 1 mmol) a směs byla míchána 24 hodin za laboratorní teploty. Rozpouštědlo bylo odpařeno na rotační vakuové odparce a odparek byl rozpuštěn v dichlormethanu (38 ml). Organická fáze byla promyta destilovanou vodou (2 x 10 ml), sušena nad bezvodým síranem sodným a odpařena na rotační vakuové odparce. Surový produkt byl čištěn sloupcovou chromatografií (ethylacetát/petrolether, grad. 0-15 %). Bylo připraveno 85 mg (36 %) bílé krystalické látky **9**. Látka **9**: b.t. 58,2 – 61,8 °C. $[\alpha]_D^{20} +81,8$ (c 0,309; $CHCl_3$). 1H NMR (401 MHz, $CDCl_3$) δ 5,05 (1H, m, H-3); 4,22 (H, m, H-2'); 2,49 (1H, t, $J = 8,8$ Hz, H-17); 2,13 (3H, s, C-21); 1,41 (9H, s, 3 x CH_3); 0,95 (3H, s, H-4'); 0,93 (3H, s, H-5'); 0,79 (3H, s, H-19); 0,57 (3H, s, H-18). ^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 209,8 (C-20); 172,0 (C-1'); 155,9 (C=O, Boc); 79,8 (C(CH_3) $_3$); 71,4 (C-3); 66,0; 64,0; 58,7; 56,8; 54,3; 44,4; 40,4; 39,2; 36,0; 35,6; 33,1; 33,0; 32,1; 31,7; 28,4 (3C); 26,2; 24,5; 22,9; 20,9; 19,2; 17,5; 15,4; 13,6; 11,5. IČ ($CHCl_3$): 2970 (CH_3); 2935 (CH_2); 1703 (C=O, ester); 1155 (C=O, keton). HR-MS (ESI) m/z (%): pro $C_{31}H_{52}O_5$ [$M + H^+$] vypočteno 518,3840; nalezeno 518,3839. Pro $C_{31}H_{51}O_5$ (517,38) vypočteno 71,92 C; 9,93 H; 2,71 N; nalezeno 71,67 C; 9,97 H; 2,54 N.

Příprava 20-oxo-pregnan-3 α -yl nikotinátu (10)



Do předem vysušené baňky byla navážena látka **6** (200 mg; 0,63 mmol), nikotinoyl chlorid hydrochlorid (335 mg; 1,88 mmol) a 4-(dimethylamino)pyridin (77 mg; 0,63 mmol). Baňka obsahující reakční směs byla vložena do ledové lázně a pod atmosférou argonu byl za stálého míchání přidán suchý pyridin (31,5 ml). Po rozpuštění pevného materiálu byla reakční směs ponechána 24 hodin v termostatu. Srážení produktu bylo provedeno v destilované vodě (250 ml) a po 24 hodinách byla pevná látka odsáta na Büchnerově nálevce a vysušena v termostatu.

Látka **10** byla přečištěna sloupcovou chromatografií (chloroform/aceton, grad. 0-2 %). Bylo připraveno 111 mg (55 %) bílé krystalické látky **10**: b.t. 110,3 – 114,8 °C. $[\alpha]_D^{20} +86,2$ (c 0,259; CHCl₃). ¹H NMR (401 MHz, CDCl₃) δ 9,23 (1H, m, arom.); 8,77 (1H, m, arom.); 8,35 (1H, m, arom.); 7,46 (1H, m, arom.); 5,33 (1H, q, $J = 2,8$ Hz, H-3); 2,53 (1H, t, $J = 8,8$ Hz, H-17); 2,12 (3H, s, C-21); 0,85 (3H, s, H-19); 0,62 (3H, s, H-18). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 209,9 (C-20); 164,4 (C-1'); 152,7 (arom); 150,4 (arom); 137,9 (arom); 127,4 (arom); 123,7 (arom); 71,8 (C-3); 64,0; 56,8; 54,3; 44,4; 40,6; 39,2; 36,1; 35,6; 33,3; 33,1; 32,0; 31,7; 28,4; 26,4; 24,5; 22,9; 21,0; 13,6; 11,6. IČ (CHCl₃): 2948 (CH₂); 1715 (C=O, ester); 1702 (C=O, keton); 1290 (C-O, ester). HR-MS (ESI) m/z (%): pro C₂₇H₃₇NO₃Na [M + Na⁺] vypočteno 446,2666; nalezeno 446,2665. Pro C₂₇H₃₇NO₃ (423,28) vypočteno 76,56 C; 8,80 H; 3,31 N; nalezeno 76,28 C; 8,87 H; 3,26 N.

6 Závěr

V rámci této bakalářské práce byly připraveny série proléčiv od endogenních neurosteroidů dehydroepiandrosteronu a allopregnanolonu. Byl zvolen přístup modifikace C-3 hydroxylové skupiny esterovou substitucí, konkrétně acetátovou, valinátovou a nikoninátovou. Pro připravené látky byla stanovena kinetická a termodynamická rozpustnost, stabilita v krysích mikrozomech a schopnost procházet přes PAMPA membrány. Bylo zjištěno, že zvolené prodrug skupiny nezlepšují ani rozpustnost, ani průchod látek přes membránu v PAMPA esaji.

7 Poděkování

Na závěr bych ráda poděkovala především své školitelce RNDr. Evě Kudové a všem ze skupiny Neurosteroidy z Ústavu organické chemie a biochemie AV ČR za jejich pomoc a trpělivost. Jmenovitě bych ráda poděkovala Marině Morozovové za měření LC-MS, Karlu Kudláčkovi za měření kinetické a termodynamické rozpustnosti a také Timotejovi Strmeňovi za změření mikrosomální stability a PAMPA eseje.

Práce byla podpořena projektem Národní institut pro výzkum metabolických a kardiovaskulárních onemocnění (Program EXCELES, ID LX22NPO5104) – Financováno Evropskou unií – Next Generation EU.

8 Literatura

- (1) Abbott, N. J.; Patabendige, A. A. K.; Dolman, D. E. M.; Yusof, S. R.; Begley, D. J. Structure and Function of the Blood–Brain Barrier. *Neurobiology of Disease* **2010**, *37* (1), 13–25. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2009.07.030>.
- (2) Alyautdin, R.; Khalin, I.; Nafeeza, M. I.; Haron, M. H.; Kuznetsov, D. Nanoscale Drug Delivery Systems and the Blood-Brain Barrier. *Int J Nanomedicine* **2014**, *9*, 795–811. <https://doi.org/10.2147/IJN.S52236>.
- (3) Reddy, D. S. Chapter 8 - Neurosteroids: Endogenous Role in the Human Brain and Therapeutic Potentials. In *Progress in Brain Research*; Savic, I., Ed.; Elsevier, 2010; Vol. 186, pp 113–137. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-53630-3.00008-7>.
- (4) Bogus, K.; Żarczyńska, M.; Pałasz, A.; Suszka-Świtek, A.; Worthington, J. J.; Krzystanek, M.; Żarczyński, P. Antipsychotics Increase Steroidogenic Enzyme Gene Expression in the Rat Brainstem. *Mol Biol Rep* **2022**, *49* (2), 1601–1608. <https://doi.org/10.1007/s11033-021-06943-4>.
- (5) Yilmaz, C.; Karali, K.; Fodelianaki, G.; Gravanis, A.; Chavakis, T.; Charalampopoulos, I.; Alexaki, V. I. Neurosteroids as Regulators of Neuroinflammation. *Front Neuroendocrinol* **2019**, *55*, 100788. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2019.100788>.
- (6) Legesse, D. H.; Fan, C.; Teng, J.; Zhuang, Y.; Howard, R. J.; Noviello, C. M.; Lindahl, E.; Hibbs, R. E. Structural Insights into Opposing Actions of Neurosteroids on GABA(A) Receptors. *Nat Commun* **2023**, *14* (1), 5091. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-40800-1>.
- (7) Zinder, O.; Dar, D. E. Neuroactive Steroids: Their Mechanism of Action and Their Function in the Stress Response. *Acta Physiol Scand* **1999**, *167* (3), 181–188. <https://doi.org/10.1046/j.1365-201x.1999.00579.x>.
- (8) Reddy, D. S.; Bakshi, K. Chapter 4 - Neurosteroids: Biosynthesis, Molecular Mechanisms, and Neurophysiological Functions in the Human Brain. In *Hormonal Signaling in Biology and Medicine*; Litwack, G., Ed.; Academic Press, **2020**; pp 69–82. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813814-4.00004-3>.
- (9) Korinek, M.; Kapras, V.; Vyklicky, V.; Adamusova, E.; Borovska, J.; Vales, K.; Stuchlik, A.; Horak, M.; Chodounska, H.; Vyklicky, L. Neurosteroid Modulation of N-Methyl-d-Aspartate Receptors: Molecular Mechanism and Behavioral Effects. *Steroids* **2011**, *76* (13), 1409–1418. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2011.09.002>.

- (10) Mellon, S. H.; Griffin, L. D. Neurosteroids: Biochemistry and Clinical Significance. *Trends Endocrinol Metab* **2002**, *13* (1), 35–43. [https://doi.org/10.1016/s1043-2760\(01\)00503-3](https://doi.org/10.1016/s1043-2760(01)00503-3).
- (11) Powell, J. G.; Garland, S.; Preston, K.; Piszczatoski, C. Brexanolone (Zulresso): Finally, an FDA-Approved Treatment for Postpartum Depression. *Ann Pharmacother* **2020**, *54* (2), 157–163. <https://doi.org/10.1177/1060028019873320>.
- (12) O'Hara, M. W.; McCabe, J. E. Postpartum Depression: Current Status and Future Directions. *Annu Rev Clin Psychol* **2013**, *9*, 379–407. <https://doi.org/10.1146/annurev-clinpsy-050212-185612>.
- (13) Lüscher, B.; Möhler, H. Brexanolone, a Neurosteroid Antidepressant, Vindicates the GABAergic Deficit Hypothesis of Depression and May Foster Resilience. *F1000Res* **2019**, *8*. <https://doi.org/10.12688/f1000research.18758.1>.
- (14) Marecki, R.; Kaluska, J.; Kolanek, A.; Hakało, D.; Waszkiewicz, N. Zuranolone – Synthetic Neurosteroid in Treatment of Mental Disorders: Narrative Review. *Frontiers in Psychiatry* **2023**, *14*.
- (15) Maguire, J. L.; Mennerick, S. Neurosteroids: Mechanistic Considerations and Clinical Prospects. *Neuropsychopharmacology* **2024**, *49* (1), 73–82. <https://doi.org/10.1038/s41386-023-01626-z>.
- (16) Lamb, Y. N. Ganaxolone: First Approval. *Drugs* **2022**, *82* (8), 933–940. <https://doi.org/10.1007/s40265-022-01724-0>.
- (17) McMurry, J. *Organická Chemie*, 6.; Vysoké učení technické v Brně, nakladatelství VUTIUM: Brno; Vol. 2007.
- (18) Svoboda, J. *Organická syntéza*, 1st ed.; VŠCHT: Praha, **2017**.
- (19) Ashenurst, J. *Carboxylic Acid Derivatives*. Master Organic Chemistry. <https://www.masterorganicchemistry.com/2022/10/27/saponification-of-esters/>.
- (20) Wermuth, C. G.; Ganellin, C. R.; Lindberg, P.; Mitscher, L. A. Glossary of Terms Used in Medicinal Chemistry (IUPAC Recommendations 1998). **1998**, *70* (5), 1129–1143. <https://doi.org/10.1351/pac199870051129>.
- (21) Rautio, J.; Meanwell, N. A.; Di, L.; Hageman, M. J. The Expanding Role of Prodrugs in Contemporary Drug Design and Development. *Nat Rev Drug Discov* **2018**, *17* (8), 559–587. <https://doi.org/10.1038/nrd.2018.46>.

- (22) Clement, B. Reduction of N-Hydroxylated Compounds: Amidoximes (N-Hydroxyamidines) as pro-Drugs of Amidines. *Drug Metab Rev* **2002**, *34* (3), 565–579. <https://doi.org/10.1081/dmr-120005643>.
- (23) Rautio, J.; Kumpulainen, H.; Heimbach, T.; Oliyai, R.; Oh, D.; Järvinen, T.; Savolainen, J. Prodrugs: Design and Clinical Applications. *Nature Reviews Drug Discovery* **2008**, *7* (3), 255–270. <https://doi.org/10.1038/nrd2468>.
- (24) Černíková, J.; Jampílek, J. Strukturní Modifikace Léčiv Ovlivňující Biodostupnost a Terapeutický Účinek. *Chem. listy* **2014** (108), 7–16.
- (25) Fralish, Z.; Chen, A.; Khan, S.; Zhou, P.; Reker, D. The Landscape of Small-Molecule Prodrugs. *Nature Reviews Drug Discovery* **2024**. <https://doi.org/10.1038/s41573-024-00914-7>.
- (26) Puris, E.; Fricker, G.; Gynther, M. Targeting Transporters for Drug Delivery to the Brain: Can We Do Better? *Pharm Res* **2022**, *39* (7), 1415–1455. <https://doi.org/10.1007/s11095-022-03241-x>.
- (27) Rautio, J.; Laine, K.; Gynther, M.; Savolainen, J. Prodrug Approaches for CNS Delivery. *AAPS J* **2008**, *10* (1), 92–102. <https://doi.org/10.1208/s12248-008-9009-8>.
- (28) Vale, N.; Ferreira, A.; Matos, J.; Fresco, P.; Gouveia, M. J. Amino Acids in the Development of Prodrugs. *Molecules* **2018**, *23* (9). <https://doi.org/10.3390/molecules23092318>.
- (29) Hajnal, K.; Hancu, G.; Rusu, A.; E., V.; Blanka, S. Prodrug Strategy in Drug Development. *Acta Medica Marisiensis* **2016**, *62*. <https://doi.org/10.1515/amma-2016-0032>.
- (30) Silveira, R. G.; Cunha, B. N.; Tenório, J. C.; Alves de Aguiar, D. V.; da Cruz Souza, P.; Vaz, B. G.; Ellena, J.; Batista, A. A.; Martins, F. T. A Simple Alternative to Prodrug: The Hydrochloride Salt Monohydrate of the Prostate Anticancer Drug Abiraterone. *Journal of Molecular Structure* **2019**, *1190*, 165–170. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2019.04.068>.
- (31) Wishart, D.; Knox, C.; Guo, A.; Shrivastava, S.; Hassanali, M.; Stothard, P.; Chang, Z.; Woolsey, J. *Abiraterone*. DRUGBANK online. <https://go.drugbank.com/drugs/DB05812>.
- (32) Liu, K. K.-C.; Sakya, S. M.; O'Donnell, C. J.; Flick, A. C.; Li, J. Synthetic Approaches to the 2009 New Drugs. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2011**, *19* (3), 1136–1154. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2010.12.038>.

- (33) Vig, B. S.; Huttunen, K. M.; Laine, K.; Rautio, J. Amino Acids as Promoieties in Prodrug Design and Development. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2013**, *65* (10), 1370–1385. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.10.001>.
- (34) Beaumont, K.; Webster, R.; Gardner, I.; Dack, K. Design of Ester Prodrugs to Enhance Oral Absorption of Poorly Permeable Compounds: Challenges to the Discovery Scientist. *Curr Drug Metab* **2003**, *4* (6), 461–485. <https://doi.org/10.2174/1389200033489253>.
- (35) Jornada, D. H.; dos Santos Fernandes, G. F.; Chiba, D. E.; de Melo, T. R. F.; dos Santos, J. L.; Chung, M. C. The Prodrug Approach: A Successful Tool for Improving Drug Solubility. *Molecules* **2015**, *21* (1), 42. <https://doi.org/10.3390/molecules21010042>.
- (36) Maxian, T.; Gerlitz, L.; Riedl, S.; Rinner, B.; Zweytick, D. Effect of L- to D-Amino Acid Substitution on Stability and Activity of Antitumor Peptide RDP215 against Human Melanoma and Glioblastoma. *Int J Mol Sci* **2021**, *22* (16). <https://doi.org/10.3390/ijms22168469>.
- (37) Wuerch, E.; Urgoiti, G. R.; Yong, V. W. The Promise of Niacin in Neurology. *Neurotherapeutics* **2023**, *20* (4), 1037–1054. <https://doi.org/10.1007/s13311-023-01376-2>.
- (38) Tashtoush, B. M.; Qasem, J.; Williams, J. D.; DeWald, T. P.; Jacobson, E. L.; Jacobson, M. K. Analysis and Stability Study of Myristyl Nicotinate in Dermatological Preparations by High-Performance Liquid Chromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2007**, *43* (3), 893–899. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2006.09.007>.
- (39) Koopman-Kimenai, P. M.; Vree, T. B.; Booij, L. H.; Dirksen, R.; Nijhuis, G. M. Pharmacokinetics of Intravenously Administered Nicomorphine and Its Metabolites in Man. *Eur J Anaesthesiol* **1993**, *10* (2), 125–132.
- (40) Schultz, C. Prodrugs of Biologically Active Phosphate Esters. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2003**, *11* (6), 885–898. [https://doi.org/10.1016/S0968-0896\(02\)00552-7](https://doi.org/10.1016/S0968-0896(02)00552-7).
- (41) Wishart, D.; Knox, C.; Guo, A.; Shrivastava, S.; Hassanali, M.; Stothard, P.; Chang, Z.; Woolsey, J. *Prednisolone phosphate*. DRUGBANK online. <https://go.drugbank.com/drugs/DB14631>.
- (42) Wishart, D.; Knox, C.; Guo, A.; Shrivastava, S.; Hassanali, M.; Stothard, P.; Chang, Z.; Woolsey, J. *Flumethasone pivalate*. DRUGBANK online. <https://go.drugbank.com/salts/DBSALT001004>.
- (43) National Center for Biotechnology Information. *Flumethasone pivalate*. PubChem. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Flumethasone-pivalate#section=Spectral-Information>.

- (44) *Locacorten-Vioform*. NPS MedicineWise. <https://www.nps.org.au/medicine-finder/locacorten-vioform-ear-drops>.
- (45) Xiangzhong, G.; Cheangyu, J.; Wenwei, Q.; Wei, G. Steroid Compound 3-Site Hydroxyl Configuration Inversion Method. CN108864237A, November 23, **2018**.
- (46) Macnevin, C.; Stein, D.; Liotta, D.; Sayeed, I.; Guthrie, D.; Lockwood, M.; Natchus, M. STEROID ANALOGUES FOR NEUROPROTECTION. WO2009108804A2, September 3, **2009**.
- (47) Hazra, B. G.; Joshi, P. L.; Bahule, B. B.; Argade, N. P.; Pore, V. S.; Chordia, M. D. Stereoselective Synthesis of (22R, 23R, 24S)-3 β -Hydroxy-5-Ene-22,23-Dihydroxy-24-Methyl-Cholestane: A Brassinolide Intermediate from 16-Dehydropregnenolone Acetate. *Tetrahedron* **1994**, *50* (8), 2523–2532. [https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(01\)86968-4](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(01)86968-4).
- (48) Hughes, D. L.; Reamer, R. A.; Bergan, J. J.; Grabowski, E. J. J. A Mechanistic Study of the Mitsunobu Esterification Reaction. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110* (19), 6487–6491. <https://doi.org/10.1021/ja00227a032>.
- (49) Dolejší, E.; Chetverikov, N.; Szánti-Pintér, E.; Nelic, D.; Randáková, A.; Doležal, V.; El-Fakahany, E. E.; Kudová, E.; Jakubík, J. Neuroactive Steroids, WIN-Compounds and Cholesterol Share a Common Binding Site on Muscarinic Acetylcholine Receptors. *Biochem Pharmacol* **2021**, *192*, 114699. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2021.114699>.
- (50) Nikolin, B.; Imamović, B.; Medanhodžić-Vuk, S.; Sober, M. High Performance Liquid Chromatography in Pharmaceutical Analyses. *Bosn J Basic Med Sci* **2004**, *4* (2), 5–9. <https://doi.org/10.17305/bjbms.2004.3405>.
- (51) Lucena, R.; Cárdenas, S.; Valcárcel, M. Evaporative Light Scattering Detection: Trends in Its Analytical Uses. *Anal Bioanal Chem* **2007**, *388* (8), 1663–1672. <https://doi.org/10.1007/s00216-007-1344-6>.