

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**  
**Přírodovědecká fakulta**  
**Katedra biochemie**

*Obor Biochemie*

**NEUROAKTIVNÍ STEROIDY – SYNTÉZA**  
**POTENCIÁLNÍ FOTOAFINITNÍ SONDY**

Bakalářská práce

**Lukáš Vidrna**

Školitelka: RNDr. Hana Chodounská, CSc.

Garantka: RNDr. Alice Šonská, CSc.

Praha 2009

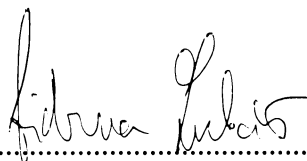
Přírodovědecká fakulta UK  
KNIHOVNA CHEMIE



3233145686

Prohlašuji, že jsem tuto balalářskou práci vypracoval samostatně pod vedením školitelky RNDr. Hany Chodounské, CSc. (ÚOCHB, v.v.i., AV ČR, Praha) a garantky RNDr. Alice Šonské, CSc. (PřF UK, Praha) a že jsem všechny použité prameny řádně citoval.

V Praze <sup>4. 9. 2009</sup>.....

.....  


podpis

Na tomto místě bych rád poděkoval své školitelce RNDr. Haně Chodounské, CSc za kvalitní a odpovědné odborné vedení, které mi umožnilo vypracovat tuto práci. Dále bych rád poděkoval celému oddělení medicínálních steroidů za jejich cenné rady a připomínky, jmenovitě panu RNDr. Ladislavu Kohoutovi, DrSc., panu RNDr. Vladimíru Pouzarovi, DrSc., panu RNDr. Alexanderovi Kasalovi, DrSc., paní Ing. Barboře Slavíkové a paní Mgr. Evě Šťastné, PhD. Také bych rád poděkoval Ing. Jaroslavě Hniličkové, Bc. Aleně Slavíčkové, Bc. Vojtěchu Kaprasovi a Dagmar Hybšové za příjemné pracovní prostředí, které zde vytvářeli. Mé poděkování patří též Mgr. Jiřině Borovské za změření aktivit a garantce paní RNDr. Alici Šonské, CSc. V neposlední řadě patří mé poděkování mé rodině a přítelkyni za jejich plnou podporu.

## Seznam použitých zkratek

3 $\alpha$ 5 $\beta$ S	3 $\alpha$ ,5 $\beta$ -pregnanolon sulfát - 20-oxo-5 $\beta$ -pregnan-3 $\alpha$ -yl sulfát
Ac	Acetyl
AMK	aminokyselina
CNS	centrální nervová soustava
GABA	$\gamma$ -aminomáselná kyselina
GABA <sub>A</sub>	receptor pro $\gamma$ -aminomáselnou kyselinu, subtyp A
GABA <sub>B</sub>	receptor pro $\gamma$ -aminomáselnou kyselinu, subtyp B
MS	hmotnostní spektrometrie
NMDA	N-methyl-D-asparágová kyselina
NMDAR	receptor pro N-methyl-D-asparágová kyselina
PS	pregnenolon sulfát - 20-oxo-pregn-5-en-3 $\alpha$ -yl sulfát
pyr	pyridin
THF	tetrahydrofuran
TLC	tenkovrstvá chromatografie

# Obsah

Seznam použitých zkratk	1
Obsah	2
1. Úvod	3
1.1 Neurosteroidy	3
1.2 GABA receptory a jejich modulace neurosteroidy	4
1.3 NMDA receptory a jejich modulace neurosteroidy	5
1.4 Mechanismus účinku neurosteroidu na GABA <sub>A</sub> a NMDA receptory	6
1.5 Glutamát jako „posel buněčné smrti“	7
1.6 Afinitní a fotoafinitní značení	10
2. Cíl bakalářské práce	13
3. Diskuze a výsledky	14
4. Experimentální část	19
4.1 Příprava (20 <i>R</i> )- a (20 <i>S</i> )-3-20-azido-5β-pregnan-3α-olu	20
5β-Pregnan-3,20-dion (2)	20
3α-hydroxy-5β-pregnan-20-on (3)	20
20-Oxo-5β-pregnan-3α-yl-acetát (4)	21
(20 <i>R</i> )-20-hydroxy-5β-pregnan-3α-yl-acetát (5 <i>a</i> ) a (20 <i>S</i> )-20-hydroxy-5β-pregnan-3α-yl-acetát (5 <i>b</i> )	21
(20 <i>R</i> )-5β-Pregnan-3α,20diyl-3-acetát-20-tosylát (6 <i>a</i> )	22
(20 <i>S</i> )-5β-pregnan-3α,20diyl-3-acetát-20-tosylát (6 <i>b</i> )	22
(20 <i>S</i> )-20-Azido-5β-pregnan-3-yl-acetát (7 <i>a</i> )	23
(20 <i>R</i> )-20-Azido-5β-pregnan-3-yl-acetát (7 <i>b</i> )	23
(20 <i>S</i> )-20-Azido-pregnan-3α-ol (8 <i>a</i> )	24
(20 <i>R</i> )-20-Azido-pregnan-3α-ol (8 <i>b</i> )	24
(20 <i>S</i> )-20-Azido-5β-pregnan-3α-yl-sulfát (9 <i>a</i> )	25
(20 <i>R</i> )-20-Azido-5β-pregnan-3α-yl-sulfát (9 <i>b</i> )	25
Závěr	26
Seznam použité literatury	27
Seznam obrázků	28
Seznam tabulek	28

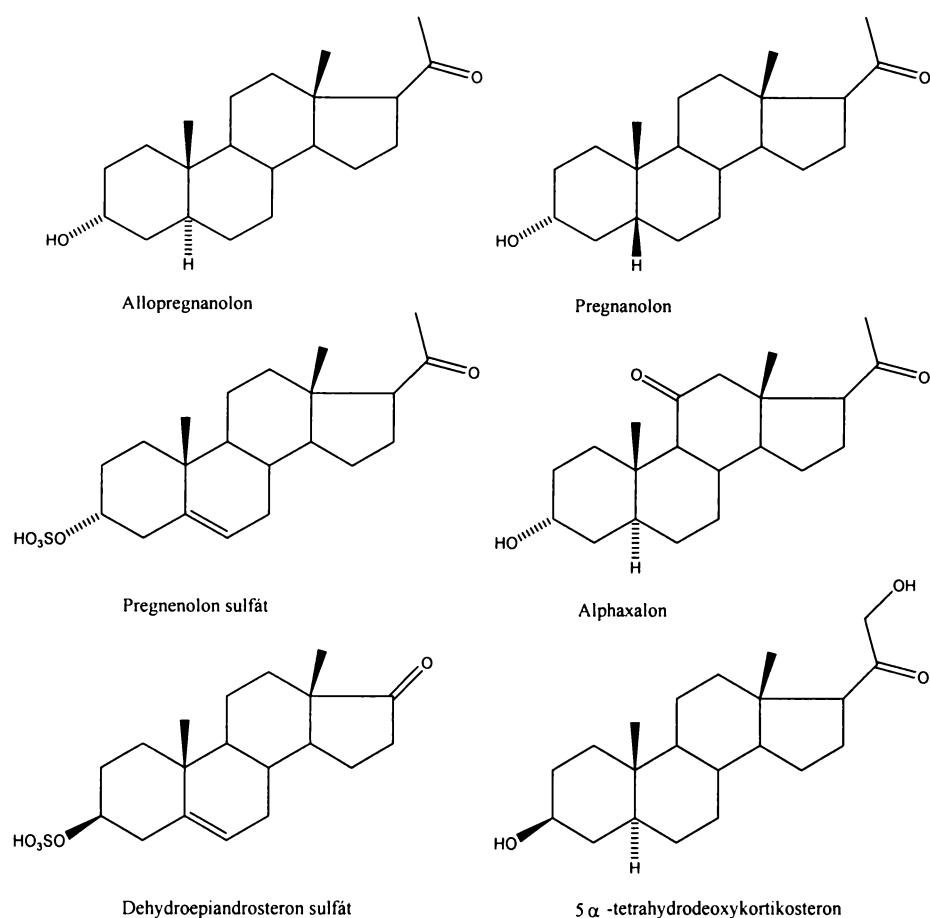
# 1. Úvod

## 1.1 Neurosteroidy

Klasická aktivita steroidních hormonů je zprostředkována vazbou steroidu na nitrobuněčný receptor. Vzniklý komplex hormon-receptor je translokován do jádra buňky. Zde je pak ovlivněna genová transkripce. Z mechanismu tohoto účinku vyplývá dlouhá doba nezbytná pro vyvolání účinku (hodiny až dny)<sup>1</sup>. Od 40. let minulého století (Hans Selye, 1941) jsou však také známy steroidní látky, které vyvolají okamžitý účinek, a to v řádech sekund, ba dokonce milisekund<sup>2</sup>. Přestože mechanismus působení zůstal dlouho neznámý, objev rychlého a anestetického účinku vedl k prvnímu steroidnímu anestetiku – alphaxalonu. Až v sedmdesátých letech byl objeven vliv neurosteroidů na receptory pro neuropřenašeče. Tento objev v roce 1976 při hledání mechanismu účinku alphaxalonu učinil Smaje<sup>1</sup>. Teprve v osmdesátých letech byly objeveny účinky steroidních látek na funkci GABA<sub>A</sub> receptoru a postupně i dalších ligandem aktivovaných iontových kanálů. Mezi tyto receptory patří glutamátové, glycinové nebo nikotinické acetylcholinové<sup>2</sup>.

Neurosteroidy jsou látky, které vznikají v nervových buňkách – tj. v blízkosti svého působení. Působí na membránové receptory pro neurotransmitery. V literatuře se vyskytuje též termín neuroaktivní steroidy – to jsou látky, které mají účinky jako neurosteroidy a ovlivňují receptory iontových kanálů pro neuropřenašeče, ale které nevznikají v nervové tkáni<sup>1</sup>. Často se však v literatuře setkáme s prolínáním těchto dvou termínů, přičemž většinou se užívá termín neuroaktivní steroidy, který zahrnuje i vlastní neurosteroidy.

Mezi základní přirozeně se vyskytující neurosteroidy patří allopregnanolon a pregnenolon. Vyskytují se v mozku, a to nejen jako nekonjugovaný steroid, ale také ve formě esteru kyseliny sírové (pregnenolon sulfát) a esterů vyšších mastných kyselin<sup>1</sup>. Základní struktury neuroaktivních steroidů jsou znázorněny na **Obrázku 1** (str. 8, jsou použity triviální názvy, s kterými se lze setkat především v lékařské a biochemické literatuře)<sup>3</sup>.



**Obrázek 1. Základní struktury neuroaktivních steroidů**

Neuroaktivní steroidy jsou fyziologicky a farmakologicky významnou skupinou látek. Výhledově by se vhodné deriváty mohly uplatnit při léčbě neurologických a psychiatrických onemocnění. Nejvíce prozkoumanou oblastí je vliv neuroaktivních steroidů na činnost GABA<sub>A</sub> receptorů. Bylo však zjištěno, že mají vliv i na inhibici napětově řízeného vápníkového kanálu a NMDA receptorů. A stále se objevují články, popisující nově zjištěná fakta o interakci dalších druhů a poddruhů neuronových receptorů s neuroaktivními steroidy.

Data z preklinických i klinických studií potvrdily potenciál neuroaktivních steroidů jako nové třídy léčiv pro ovlivnění epilepsie, úzkosti, nespavosti, migrény a drogové závislosti<sup>4</sup>.

## 1.2 GABA receptory a jejich modulace neurosteroidy

Název GABA receptor je odvozen od hlavního neuropřenašeče s inhibičním účinkem v CNS savců – od kyseliny  $\gamma$ -aminomáselné (anglicky Gama Amino Butyric Acid). Receptory, které jsou aktivované touto látkou, jsou rozděleny do 3 skupin: ionotropní

GABA<sub>A</sub> receptory – přímo tvořící kanál pro Cl<sup>-</sup> ionty, metabotropní GABA<sub>B</sub> receptory – pomocí G-proteinů spřaženy s Na<sup>+</sup> a K<sup>+</sup> kanály a GABA<sub>C</sub> receptory – tvoří také kanál pro Cl<sup>-</sup> ionty, od GABA<sub>A</sub> se liší svými podjednotkami a farmakologickými vlastnostmi. Alphaxalon je příklad neurosteroidu, který ovlivňuje GABA<sub>A</sub> receptor – byla to první látka, u které se podařilo prokázat spojitost mezi steroidem a GABA<sub>A</sub> receptorem. Dalšími látkami, u nichž byl prokázán vliv na GABA, jsou některé endogenní hormony, již výše uváděné - allopregnanolon, tetrahydrodeoxykortikosteron<sup>2</sup>.

### 1.3 NMDA receptory a jejich modulace neurosteoidy

NMDA receptor patří do rodiny ionotropních (ligandem řízených iontových kanálů) receptorů aktivovaných glutamátem, který je nejdůležitějším excitačním neurotransmiterem v CNS obratlovců. Do této rodiny dále patří kainátový receptor (KA) a  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionátový (AMPA) receptor. Názvy jsou odvozeny od příslušného (selektivního) agonisty. Klíčovou úlohu má NMDA receptor, který má hned několik výjimečných vlastností.

1. Vysoká propustnost pro Ca<sup>2+</sup> ionty. Tak je ovlivněna řada intracelulárních procesů.
2. K aktivaci jsou nutné dva endogenní agonisté v jednom okamžiku – glutamát a glycin.
3. Je v závislosti na napětí membrány blokován extracelulárními Mg<sup>2+</sup> ionty<sup>2</sup>.

Struktura je oligomerní – dosud je známo celkem 7 podjednotek – NR1, NR2A-D a NR3A-B. Současná představa o NMDA receptoru je, že hlavní struktura je tetramer složený ze dvou NR1 a dvou NR2 podjednotek. NR3 podjednotka někdy může nahradit jednu ze dvou NR2 podjednotek, potom v kombinaci s NR1 podjednotkou tvoří excitační glycinové receptory s dosud neobjasněným fyziologickým významem<sup>2</sup>.

Společným znakem pro endogenní neurosteroidy s prokázaným vlivem na NMDA receptor je přítomnost sulfátové skupiny v poloze C3. Ta je nositelem záporného náboje. V **Tabulce 1** (str. 6) je popsán účinek pregnenolonsulfátu a pregnanolonsulfátu na GABA<sub>A</sub> a NMDA receptory.

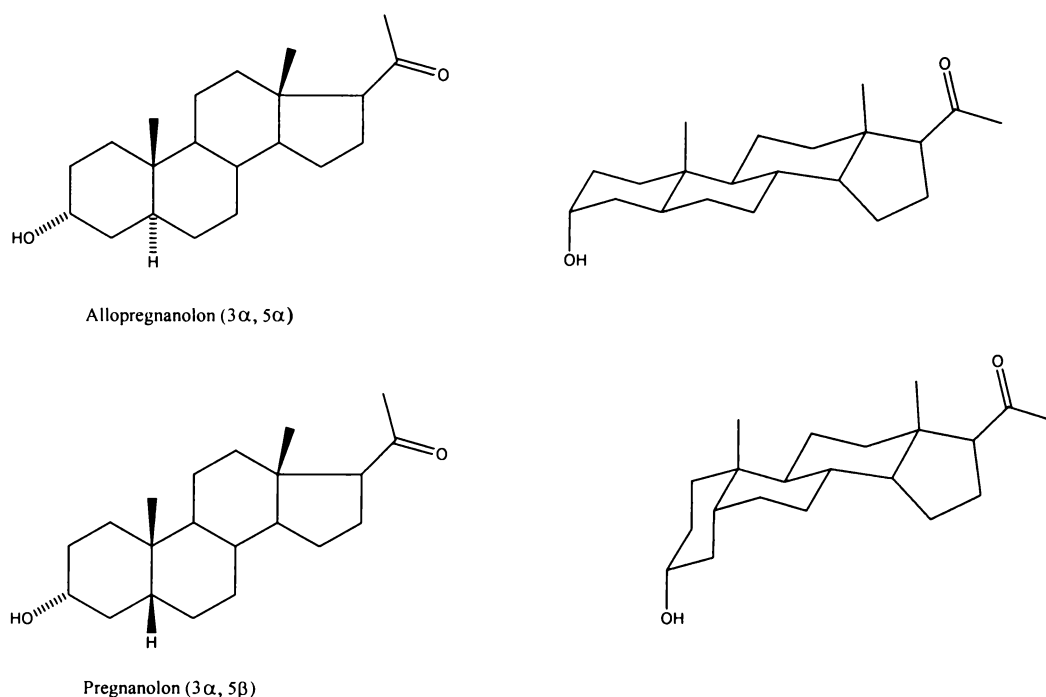


	GABA <sub>A</sub>	NMDAR
Pregnanolonsulfát	inhibice	inhibice
Pregnenolonsulfát	inhibice	potenciace
<b>Tabulka 1. Účinek PS a 3<math>\alpha</math>5<math>\beta</math>S na GABA<sub>A</sub> a NMDAR</b>		

Jak je vidět z výše uvedené **Tabulky 1**, u PS je vliv na GABA<sub>A</sub> inhibiční, ale na NMDAR potenciační. Účinky uvedených neurosteroidů závisí na podjednotkovém složení NMDA receptoru. NR1/NR2C-D jsou citlivější k inhibičnímu působení pregnanolonsulfátu než podjednotky NR2A a NR2B. Výraznější rozdíly můžeme pozorovat při působení PS - pozorována potenciace NR1/NR2A-B, ale inhibice u NR1//NR2C-D receptorů<sup>2</sup>. Působením PS může být účinek glutamátu zvyšován, avšak také snižován. Záleží na složení podjednotek. Receptory s podjednotkami NR2A/B jsou potencovány, kdežto NR1/NR2C-D jsou inhibovány<sup>5</sup>.

#### **1.4 Mechanismus účinku neurosteroidu na GABA<sub>A</sub> a NMDA receptory**

Základním mechanismem působení neurosteroidů je změna pravděpodobnosti otevření příslušného iontového kanálu. U obou receptorů lze pozorovat potenciační i inhibiční účinky neurosteroidů. Velmi důležitá je konfigurace na uhlíku C3 a C5 steroidního skeletu. Sulfátová skupina v poloze C3 je nezbytná pro funkci na NMDA receptoru. V případě GABA<sub>A</sub> receptoru přítomnost sulfátové skupiny znamená vždy inhibici bez ohledu na celkovou strukturu steroidu. Konfigurace na C5 určuje, zda-li molekula bude spíše planární (5 $\alpha$ ) nebo lomená (5 $\beta$ ) (**Obrázek 2**, str.7).



**Obrázek 2. Tvar molekuly Allopregnanolonu (3 $\alpha$ 5 $\alpha$ ) a Pregnanolonu (3 $\alpha$ 5 $\beta$ )**

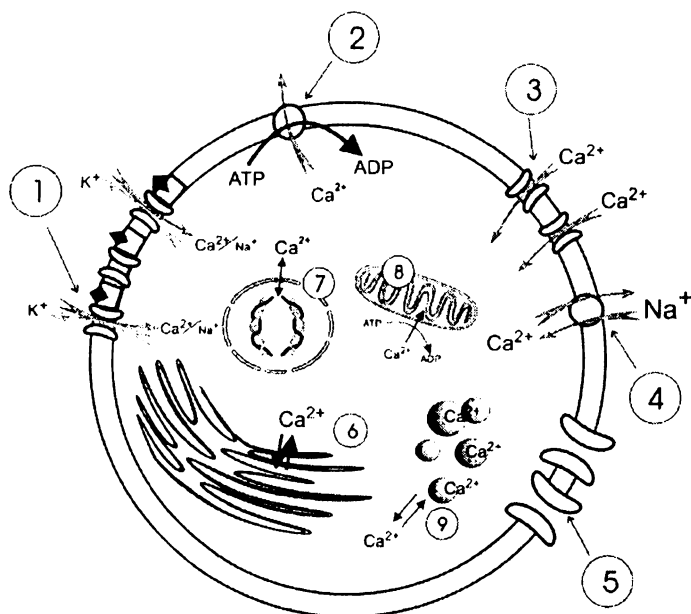
I přesto, že jsou známy účinky neurosteroidů na GABA<sub>A</sub> a NMDA receptory, vazebná místa dosud objasněna nejsou. Výsledky experimentální práce ukazují na nekompetitivní vazbu vzhledem k základním neurotransmiterům a nepůsobí ani v jiných místech pro alosterické ovlivnění – př. u GABA<sub>A</sub> vazebné místo pro benzodiazepiny, u NMDAR pro polyaminy<sup>2</sup>.

## 1.5 Glutamát jako „posel buněčné smrti“

Při poranění mozku či mozkové mrtvici některé mozkové buňky zahynou v přímém důsledku nedostatku kyslíku. Větší rozsah poškození je však způsoben následnými chemickými procesy, které vedou k buněčné smrti. Tyto děje jsou vyvolány vyloučením nadbytku glutamátu do okolí poškozených a umírajících buněk. Odblokování NMDA receptorů způsobí zvýšený vstup Ca<sup>2+</sup> iontů do buňky.

Vápenaté ionty jsou všudypřítomní intracelulární poslové, regulující mnoho buněčných funkcí jako např. buněčný růst, diferenciaci, membránovou vzrušivost, synoptickou aktivitu a exocytosu. Kvůli těmto důležitým funkcím je nezbytně nutné, aby neurony udržovaly stálou hladinu Ca<sup>2+</sup> iontů v cytosolu. V neuronech se proto vyvinul komplex homeostatických mechanismů, které regulují jak cytosolickou koncentraci Ca<sup>2+</sup>, tak i rozložení (lokaci) Ca<sup>2+</sup> v buňce. Konkrétně se jedná o vzájemnou interakci mezi 4 základními procesy - vstupem Ca<sup>2+</sup> do buňky, vyrovnáním koncentrace Ca<sup>2+</sup>, vnitřně

ukládáním  $\text{Ca}^{2+}$  a uvolněním  $\text{Ca}^{2+}$  z buňky. Schéma znázorňující rovnováhu  $\text{Ca}^{2+}$  iontů v neuronu je na **Obrázku 3**.

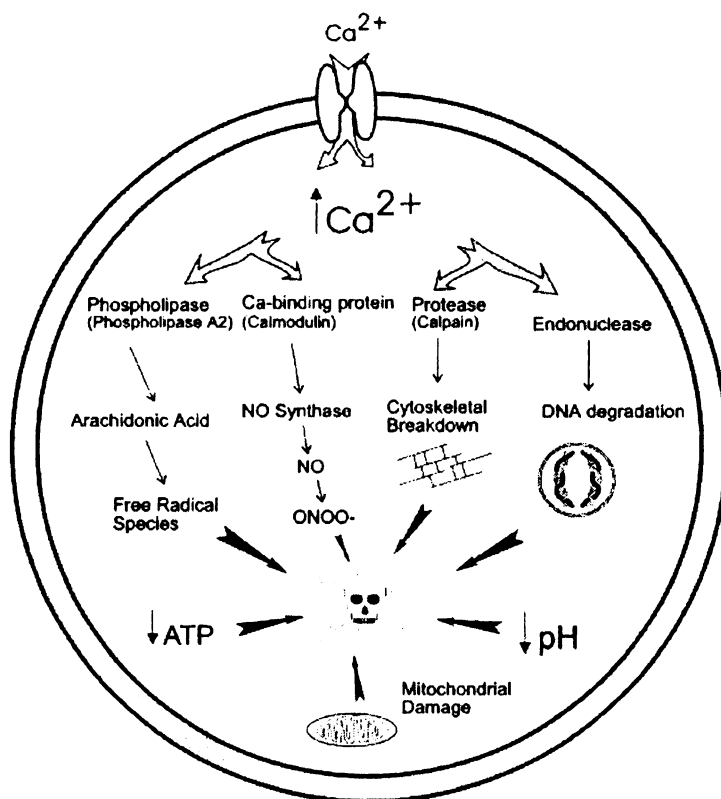


**Obrázek 3. Přehled reakcí udržující rovnovážnou hladinu  $\text{Ca}^{2+}$**

1. Vstup  $\text{Ca}^{2+}$  a  $\text{Na}^+$  zároveň s výstupem  $\text{K}^+$  na iontových kanálech spojených s receptory, např. glutamátových receptorech.
2. Výstup  $\text{Ca}^{2+}$  iontů z buňky za spotřeby ATP.
3. Vstup  $\text{Ca}^{2+}$  podmíněný potenciálem na membráně.
4.  $\text{Ca}^{2+}$  Výstup výměnou za  $\text{Na}^+$  ionty.
5. Přídavné iontové kanály přispívající k membránové repolarizaci a k iontové homeostázi.
6. Vstřebávání a uvolňování  $\text{Ca}^{2+}$  iontů endoplasmatickým retikulem.
7. Tok  $\text{Ca}^{2+}$  iontů přes jadernou membránu s potencujícím efektem na transkripci nukleových kyselin.
8. Uložení  $\text{Ca}^{2+}$  iontů do mitochondrie.
9. Intracelulární systém vyrovnávající hladinu  $\text{Ca}^{2+}$  iontů pomocí  $\text{Ca}^{2+}$  - vazebných proteinů.

V situaci, při které dojde k zvýšení  $\text{Ca}^{2+}$  iontů v buňce a se kterou se nevypořádá ani výše popsany komplex reakcí na udržení stálé hladiny  $\text{Ca}^{2+}$  iontů, jsou aktivovány procesy, jež vedou k poškození neuronu nebo ke vzniku toxinů, které způsobí buněčnou smrt. Těchto reakcí se účastní celá řada enzymů – proteasy, lipasy, endonukleasy. Sled možných reakcí,

keré mohou nastat po zvýšení intracelulární koncentrace  $\text{Ca}^{2+}$  iontů, je znázorněn na Obrázku 4<sup>6</sup>.



**Obrázek 4. Sled buněčných reakcí reagujících na zvýšenou hladinu  $\text{Ca}^{2+}$**

NO = oxid dusnatý

ONOO<sup>-</sup> = peroxonitrit

ATP = adenosintrifosfát

DNA = deoxyribonukleová kyselina

Objasnění polohy a struktury vazebného místa pro neurosteroidy, které ovlivňují glutamátové receptory, a tím i vstup  $\text{Ca}^{2+}$  iontů do buňky, by mohlo pomoci při návržení a syntéze steroidu, jenž by byl schopen v případě ohrožení vhodně inhibovat tento receptor a regulovat tok  $\text{Ca}^{2+}$  iontů do buňky. Tím by bylo možno zabránit ztrátě buněk, které nezahynou bezprostředním nedostatkem kyslíku, ale následně výše popsáním mechanismem – vyloučením glutamátu a následnému toku  $\text{Ca}^{2+}$  iontů do buňky.

Jednou z metod, která by mohla objasnit strukturu vazebného místa, je fotoafinní značení.

## 1.6 Afinitní a fotoafinitní značení

Afinitní značení je technika, která je využívána pro získání informace o struktuře vazebného místa v biomolekule. K tomu se používají deriváty ligandů, jež mají možnost vytvořit kovalentní vazbu ligand-protein. Tato technika je využívána ke značení mnoha vazebných proteinů – např. hormonové receptory, enzymy a imunoglobuliny. Afinitní značení se také používá při studiu membránových struktur<sup>7</sup>.

Podstatou metody afinitního značení je přirozená afinita mezi ligandem – např. hormon, protilátka, substrát a receptorem – např. enzym, transportní protein. A právě při modifikaci molekuly jednoho z těchto dvou partnerů (nejčastěji však molekuly ligandu) – jedná se o substituci chemicky reaktivní skupinou – vzniká afinitní sonda. Ta by měla po přidání do reakční směsi vytvořit kovalentní vazbu se svým vazebným partnerem. Za předpokladu ideálního vzájemného působení vzniká kovalentní komplex ligand – receptor. Touto metodou lze identifikovat vazebné místo či aktivní centrum na molekule receptoru<sup>8</sup>.

Popsaná metoda afinitního značení obsahuje dva podstatné nedostatky :

1. Afinitní sonda musí mít nízkou reaktivitu, aby nepodléhala hydrolytickým reakcím (většina reakcí probíhá ve vodném prostředí) a nedocházelo tak k deaktivaci sondy ještě před požadovaným navázáním.
2. Není možné zamaskovat afinitní sondu takovým způsobem, který by umožňoval reaktivaci za požadovaných podmínek. Do jisté míry je s tímto spojen i problém nespecifického značení, tj. interakce sondy na jiném než specifickém vazebném místě pro ligand, resp. receptor<sup>8</sup>.

Proto byly vypracovány postupy využívající fotoreaktivní deriváty. Hlavní výhodou fotoafinitní sondy proti výše popsané afinitní sondě je fotolytická aktivace chemicky inertní sondy na chemicky reaktivní skupinu v požadovaném čase. Krátký poločas života a značná reaktivita s poměrně nízkou selektivitou aktivované sondy umožňuje kovalentně modifikovat všechny AMK zbytky v blízkosti reaktivního intermediátu. Tímto způsobem je snížena pravděpodobnost nespecifického značení a možnost použití fotoafinitních sond se tak podstatně rozšiřuje ve srovnání s klasickými afinitními sondami. Ideální fotoafinitní sonda by měla splňovat tato kritéria:

1. Aktivace sondy takovou vlnovou délkou, která nepoškozuje a nemění vlastnosti biomakromolekuly – ideální je nad 300 nm – fotolabilní skupiny by měly mít i při nízké intenzitě světelného zdroje vysokou schopnost fotolýzy – tj. co největší absorpční maximum při této vlnové délce.
2. Podobnost sondy s původní sloučeninou (ligandem). Zavedení fotolabilní skupiny do molekuly by nemělo ovlivnit jeho strukturální a funkční vlastnosti.
3. Intermediáty vzniklé fotolýzou se musí vyznačovat vysokou reaktivitou, což souvisí s krátkou dobou života, a nízkou selektivitou – tj. reaktivitou vůči různým funkčním skupinám. Tyto intermediáty nesmí podléhat přesmykům, které by negativně ovlivnily výtěžek, popřípadě by vedly i k reakcím mimo vazebné centrum.
4. Stabilita a chemická inertnost za experimentálních podmínek. Stabilita při změnách pH okolo hodnoty fyziologického pH, odolnost proti oxidačnímu i redukčnímu prostředí.
5. Jednoduchá syntetická dostupnost.
6. Kovalentní vazba mezi ligandem a receptorem by měla být odolná v podmínkách běžných separačních a charakterizačních metod – např. proti činidlům, které štěpí proteiny<sup>8</sup>.

Prakticky žádná molekula však nesplňuje tato přísná kritéria a při jejím výběru se tak vždy jedná o kompromis, který vyhovuje danému použití<sup>8</sup>.

Příklady fotolabilních skupin používaných při syntéze fotoafinitních sond: diazoketony, alkyl-, acyl-, arylazidy,  $\alpha$ ,  $\beta$  – nenasycené ketony, arylhalidy, nitro sloučeniny<sup>7</sup>.

Účinným nástrojem fotoafinitního značení jsou nitreny. Zatím se však nenašel nitren, který by byl optimální ve všech situacích. Z doposud známých jsou nejpoužívanější arylnitreny. Jejich prekurzorem je téměř vždy azid, který má mnoho výhod. Arylazidy jsou snadno dostupné a způsob, jímž arylazidová skupina atakuje zkoumanou biochemickou strukturu, je znám. Fotochemické chování vodně substituovaných arylazidů vyhovuje požadavkům. Absorbují světlo vlnové délky od 300 nebo dokonce 400 nm, přičemž extinkční koeficienty jsou dost vysoké na zachycení většiny dopadajícího světla. Z toho vyplývá jednak krátká doba ozáření, jednak ochránění biomolekul proti fotochemickému zničení – vysoká absorpce azidů chrání biomolekuly během krátké doby ozáření<sup>9</sup>.

Fotolýza azidu probíhá, jak je znázorněno na **Obrázku 5** (str. 11), rozpadem azido skupiny na dvě hlavní formy reaktivního intermediátu. Prvotně vzniká nitren v singletovém



## **2. Cíl bakalářské práce**

Syntéza azidových derivátů 5 $\beta$ -pregnanolonu jako prekursorů fotoafinitní sondy pro studium NMDA receptoru.



### 3. Diskuze a výsledky

Byly připraveny 20-azidoderiváty 5 $\beta$ -pregnanolonu.

Výchozími látkami pro syntézu azidů byly (20*R*)-20-hydroxy-5 $\beta$ -pregnan-3-yl acetát **5a** a (20*S*)-20-hydroxy-5 $\beta$ -pregnan-3-yl acetát **5b**, které lze připravit čtyřmi reakčními kroky (Schéma 1). Komerčně dostupný progesteron **1** byl hydrogenován na palladiovém katalyzátoru (Pd na C) za vzniku nasyceného 5 $\beta$ -derivátu **2**, jehož 3-keto skupina byla selektivně redukována tetrahydroboritanem sodným za vzniku 3 $\alpha$ -hydroxy derivátu **3**. Ten byl poté ochráněn jako acetát **4**, u kterého byla redukována 20-keto skupina tetrahydroboritanem sodným za vzniku požadovaných výchozích látek **5a** a **5b**. Protože při této reakci dochází majoritně ke vzniku (20*R*)-20-alkoholu **5a** a protože k dalšímu postupu bylo potřeba obou izomerů, byla redukce prováděna za přítomnosti chloridu ceritého, který podstatně zvýšil vznik (20*S*)-20-alkoholu **5b**.

Příprava azidů probíhala podle reakčních schémat 2 a 3. Prvním krokem byla aktivace 20-hydroxylové skupiny tosylátem pro nukleofilní substituci S<sub>N</sub>2, při které dochází k inverzi konfigurace na stereogenním centru. Ze získaných tosylátů byly substitucí s azidem sodným získány (20*S*)- a (20*R*)-20-azidy, přičemž (20*S*)-20-azid vznikal s lepšími výtěžky. Vznik azidového derivátu byl potvrzen infračervenou spektroskopií (pás 1175 cm<sup>-1</sup> pro vazbu S-O v tosylátu zmizel a objevily se charakteristické pásy pro azid - 2103 a 2080 cm<sup>-1</sup>). Ve vodíkovém spektru NMR bylo možné pozorovat pro tosylát typické signály aromatických vodíků. Po substituci pozorovat tyto signály již nebylo možné, objevily se ale multiplety dublet kvadrupletu pro H-20 a multiplet pro H-3, které u tosylátu splývaly v jeden multiplet. Také dublet pro H-21 poukazoval na zachování pregnanového skeletu a vylučoval tak přesmyk, a tedy případný vznik šestičlenného D kruhu. Vznik azidů však probíhal pouze minoritně, majoritně vznikaly olefiny. Ty bylo možné dokázat jak vodíkovým spektrem – chyběl signál pro H-20 a byly pozorovány signály typické pro dvojnou vazbu, tak infračervenou spektroskopií – pás pro azid nebyl pozorován.

Dalším krokem syntézy byla hydrolýza chránící skupiny a obnovení 3 $\alpha$ -hydroxyly. Ten bylo opět možné prokázat infračervenou spektroskopií – po hydrolytickém štěpení nebyl vidět silný pás pro vazbu C=O v karbonylu (1721 cm<sup>-1</sup>), zato však byl vidět pás pro hydroxylovou skupinu (3609 cm<sup>-1</sup>). Pásy pro azid zůstaly zachovány. Ve vodíkovém spektru zůstal signál pro H-21 i H-20. Multiplet pro H-3 se posunul z 4,76-4,68 na 3,67-3,59 ppm.

Závěrečnou reakcí byla sulfatace 3 $\alpha$ -hydroxylové skupiny obou izomerů – **8a** i **8b**. Vznik sulfatovaných azidů **9a** a **9b** byl potvrzen spektroskopicky – v infračerveném spektru již nebyl pás pro hydroxylovou skupinu, objevil se pás pro sulfát (1048 cm<sup>-1</sup>), ve vodíkovém spektru došlo opět k posunu signálu pro H-3 na hodnotu 4,51-4,43 ppm. Signály pro H-20 a H-21 zůstaly prakticky stejné. Protože produktem byly pyridiniové soli, byly pozorovány i aromatické vodíky.

V rámci této bakalářské práce byly připraveny a popsány tyto nové látky: **6a**, **7a**, **7b**, **8a**, **8b**, **9a**, **9b**.

Touto metodikou se podařilo připravit oba 20-azidoderiváty 5 $\beta$ -pregnan-3 $\alpha$ -olu.

U připravených sulfátů byla testována jejich aktivita na NMDA receptoru na Oddělení buněčné neurofyziologie Fyziologického ústavu AV ČR. Oba sulfáty – **9a** i **9b** – měly inhibiční účinky. Pro sulfát **9a** byl inhibiční účinek 85% při 100 $\mu$ M a pro sulfát **9b** byl inhibiční účinek 36% při 100 $\mu$ M. Výsledky testů ukázaly dobrý inhibiční účinek, azidová skupina navázaná na 5 $\beta$ -pregnanový skelet místo keto skupiny nesnížila účinek neurosteroidu a váže se na NMDA receptor. Bylo by tak možné pomocí podobných derivátů objasnit strukturu vazebného místa NMDA receptoru.

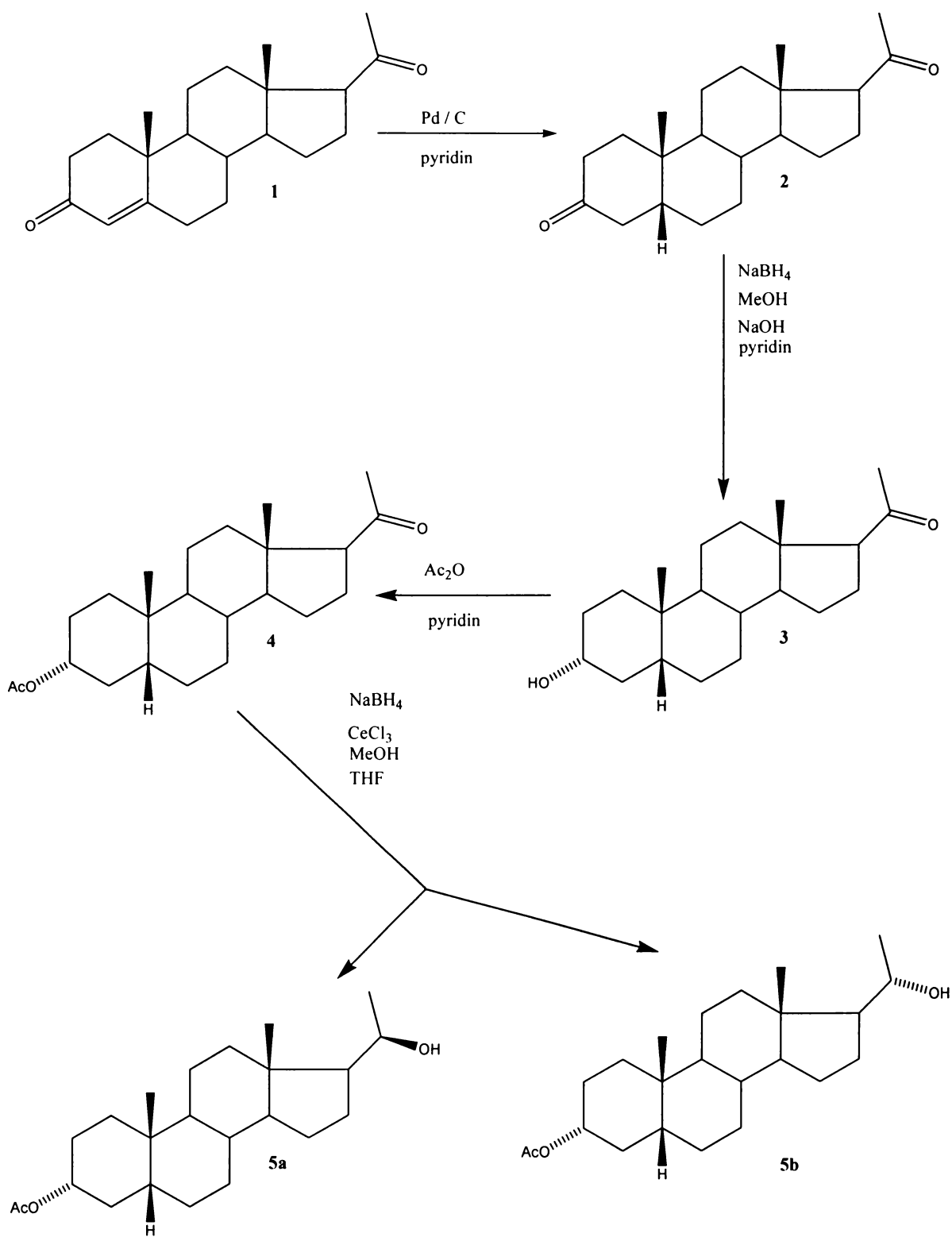


Schéma 1

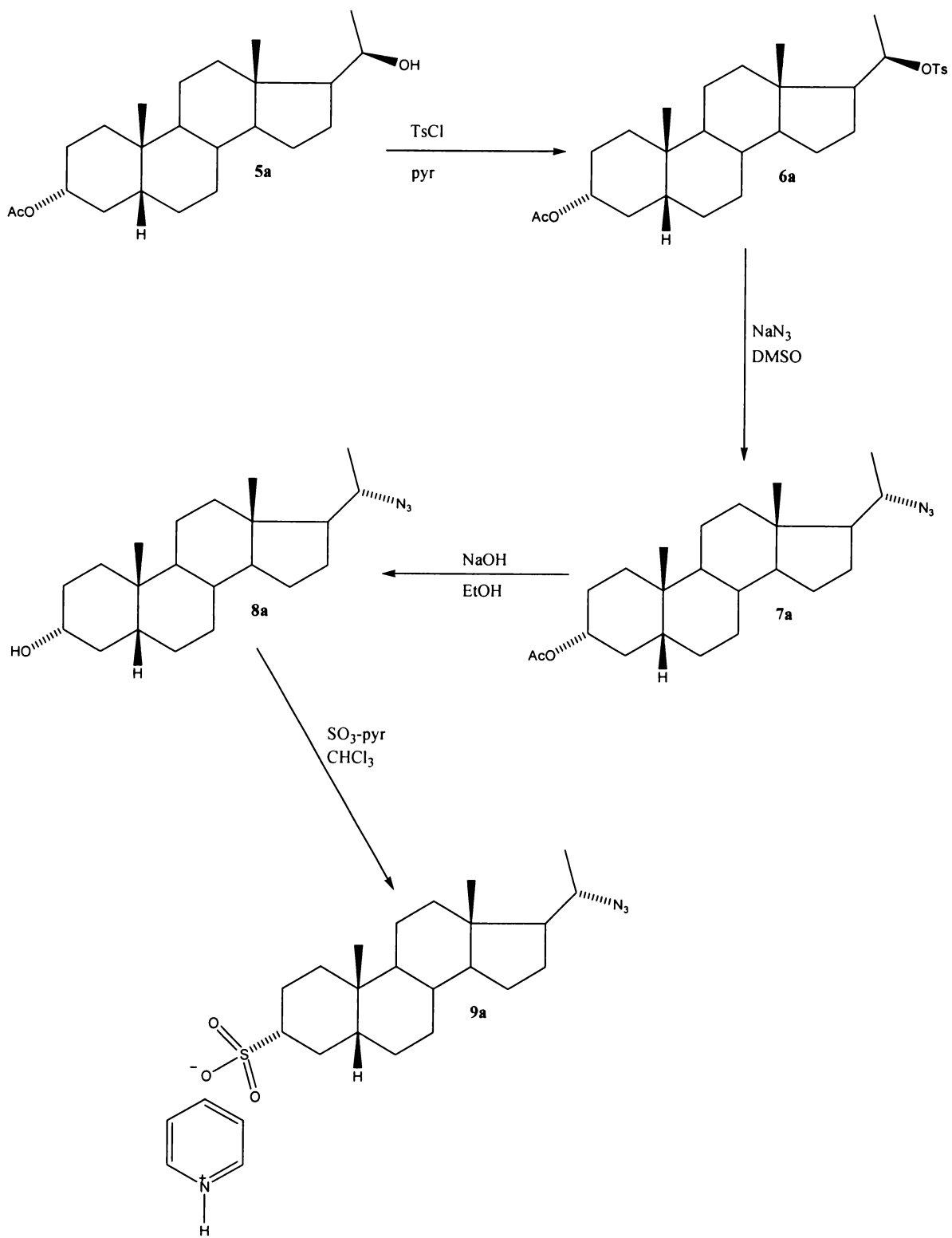


Schéma 2

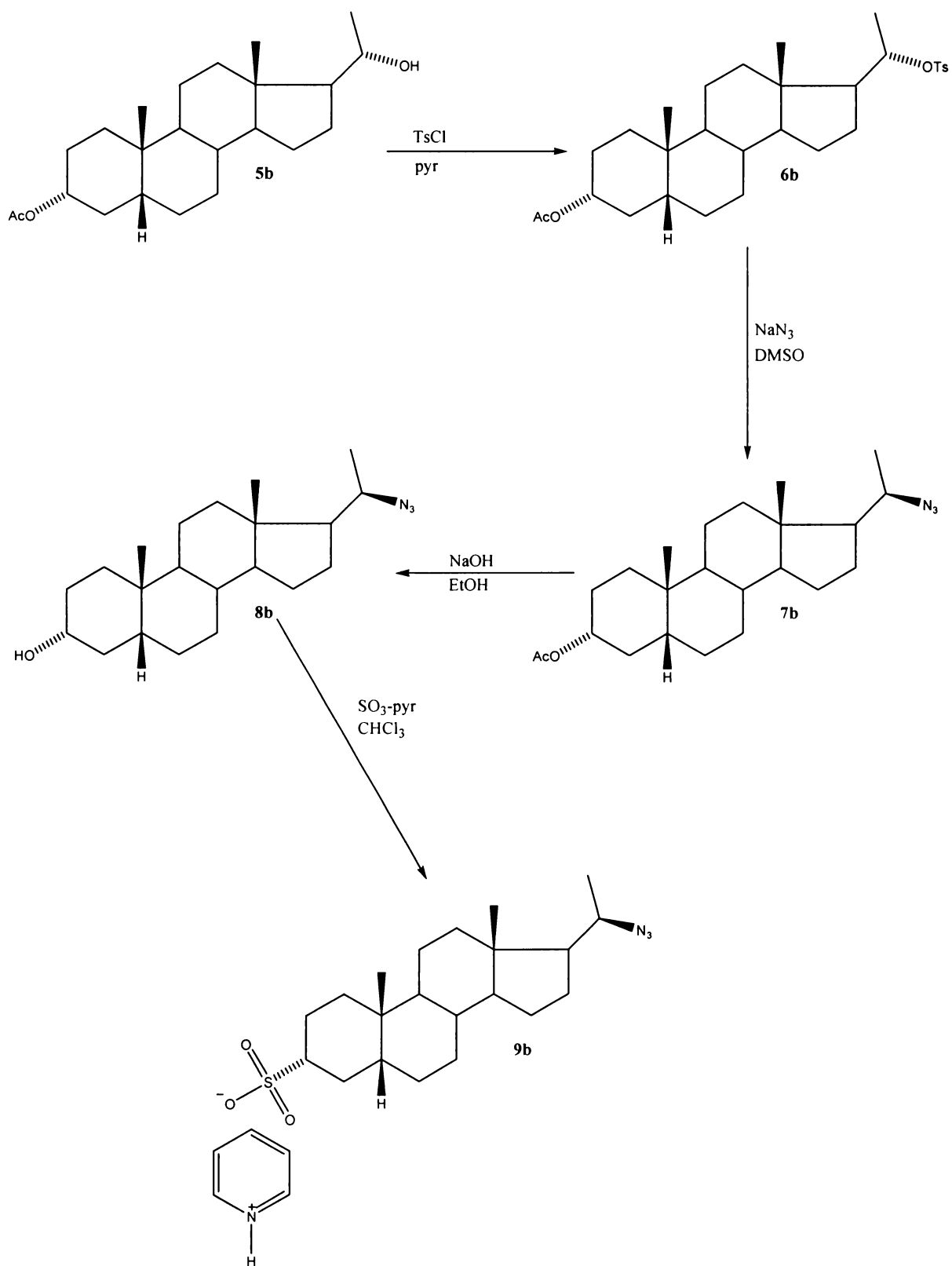


Schéma 3

## 4. Experimentální část

Body tání byly určeny na bodotávku Hund H 600 (Helmut Hund, Německo) a nejsou korigovány. Vzorky pro analýzu byly sušeny nad oxidem fosforečným při 50 °C a tlaku 100 Pa. Optická rotace byla měřena v chloroformu polarimetrem Autopol IV (Rudolf Research Analytical, Flanders), USA,  $[\alpha]_D$  hodnoty jsou uvedeny v  $10^{-1} \cdot \text{deg} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ . Infračervená spektra byla měřena v roztocích vzorků v chloroformu pomocí spektrometru Bruker IFS 55, vlnočty jsou udány v  $\text{cm}^{-1}$ .  $^1\text{H}$  NMR spektra byla měřena v FT modu při 24 °C a 400 MHz na spektrometru Bruker AVANCE-400 v deuteriochloroformu, s tetramethylsilanem (TMS) jako vnitřním standardem. Chemické posuny jsou udány v ppm ( $\delta$ -stupnice), interakční konstanty (J) jsou udány v Hz. Multiplicity signálů jsou označeny následovně: s – singlet, d – dublet, t – triplet, q – kvadruplet, m – multiplet, písmeno b označuje široký signál (broad). Všechna spektra byla interpretována jako spektra prvního řádu. Při zpracování reakčních směsí byl používán vodný roztok kyseliny chlorovodíkové (5%), případně nasycený vodný roztok hydrogenuhličitanu sodného. Tenkovrstvá chromatografie (TLC) byla prováděna na deskách pokrytých vrstvičkou silikagelu (ICN Biochemicals). Preparativní sloupcová chromatografie byla prováděna na silikagelu Fluka (60  $\mu\text{m}$ ). K detekci steroidních látek na TLC deskách byla použita 98% kyselina sírová s následným zahřátím na 300 – 400 °C. Rozpouštědla byla z roztoků odpařována na vakuové odparce (0,25 kPa) při teplotě lázně 40°C. Mobilní fáze pro sloupcovou chromatografii je uvedena vždy u experimentu. Chlorid ceritý dostupný jako heptahydrát byl sušen nad oxidem fosforečným za sníženého tlaku na 100 Pa při teplotě 40 °C po dobu 24 h.

## 4.1 Příprava (20R)- a (20S)-3-20-azido-5 $\beta$ -pregnan-3 $\alpha$ -olu

### 5 $\beta$ -Pregnan-3,20-dion (2)

Progesteron **1** (30 g, 95,4 mmol) byl rozpuštěn v absolutním pyridinu (60 ml) v 1000 ml baňce s míchadlem. Poté byl přidán katalyzátor Pd na C (5%, 600 mg). Reakční baňka byla 3x promyta argonem a poté naplněna vodíkem. Výchozí sloučenina byla hydrogenována po 30 h. Poté byla reakční směs zfiltrována přes křemelinu. Filtrát byl ponechán přes noc v lednici krystalizovat. Krystalický produkt 5 $\beta$  **1** (27,55 g, 92%), matečný louh (2,44 g) obsahoval směs 5 $\alpha$  a 5 $\beta$  izomerů.

B.t.: 116-118 °C, [lit.<sup>10</sup> 118,5-120 °C]. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz) v CDCl<sub>3</sub>: 0,64 s, 3 H (3 x H-18); 1,03 s, 3 H (3 x H-19); 2,12 s, 3 H (3 x H-21); 2,55 dd, 1H, J<sub>1</sub> = 9, J<sub>2</sub> = 9 (H-17 $\alpha$ ). IČ spektrum: 1703 (C=O, oba karbonyly); 1387 (CH<sub>3</sub>). Pro C<sub>21</sub>H<sub>32</sub>O<sub>2</sub> (316,5) vypočteno: 79,70 % C, 10,19 % H; nalezeno: 79,82 % C, 10,51 % H.

### 3 $\alpha$ -hydroxy-5 $\beta$ -pregnan-20-on (3)

Diketon **2** (13,17 g, 41,61 mmol) byl rozpuštěn v methanolu (MeOH, 1154 ml) v 5000 ml kádince. Reakční směs byla vychlazena na ledové lázni na 5 °C. Hydroxid sodný (NaOH, 1,371 g, 34,28 mmol) byl rozpuštěn v destilované vodě (13,7 ml) v 500 ml baňce. K roztoku byl přidán methanol (388 ml). Do další 500 ml baňky byl nalit pyridin (358 ml) a přidán tetrahydridoboritan sodný (NaBH<sub>4</sub>, 2,503 g). Oba roztoky byly také vychlazeny na 5 °C. Po vytemperování byl do 5000 ml kádinky s rozpuštěným diketonem v methanolu nalit roztok MeOH, NaOH a H<sub>2</sub>O a následně za stálého míchání byl pomalu přiléván roztok pyridinu a tetrahydroboritanu sodného. Průběh reakce byl kontrolován TLC. Po vymizení výchozího diketonu byla reakce ukončena neutralizací reakční směsi 5% HCl (pH měřeno indikátorovým papírkem). Roztok byl nalit do 6000 ml směsi vody a ledu. Bílá sraženina byla odsáta na Büchnerově nálevce. Sloupcovou chromatografií na silikagelu elucí směsí petrolether : ether (8:2) byl získán požadovaný 3 $\alpha$  alkohol **3** (6,72 g, 51%).

B.t.: 145,2-147,5 °C, [lit.<sup>11</sup> 146-148 °C]. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz) v CDCl<sub>3</sub>: 0,60 s, 3 H (3 x H-18); 0,93 s, 3 H (3 x H-19); 2,11 s, 3 H (3 x H-21); 2,53 t, 1 H, J = 9,1 (H-17 $\alpha$ ); 3,68 – 3,60 m, 1H (H-3 $\alpha$ ). IČ spektrum: 3610, 3476 (OH); 1698, 593 (C=O); 1386 (CH<sub>3</sub>); 1033 (C-OH). Pro C<sub>21</sub>H<sub>34</sub>O<sub>2</sub> (318,5) vypočteno: 79,19 % C, 10,76 % H; nalezeno: 79,12 % C, 10,76 % H.

## 20-Oxo-5 $\beta$ -pregnan-3 $\alpha$ -yl-acetát (4)

Steroid **3** (6,71 g, 21,07 mmol) byl azeotropicky sušen odpařením s benzenem. Poté byl rozpuštěn v absolutním pyridinu (33,5 ml). Roztok byl ochlazen v ledové lázni a za stálého míchání byl přikapán acetanhydrid ( $\text{Ac}_2\text{O}$ , 20 ml). Reakční směs byla ponechána stát přes noc za laboratorní teploty. Poté byla nalita do vody (200 ml) a 5% HCl (800 ml) a ponechána do dalšího dne vysrážet. Sraženina byla odsáta na Büchnerově nálevce a sušena v termostatu. Suchý produkt byl rozpuštěn v  $\text{CHCl}_3$  (50 ml) a přečištěn filtrací přes sloupeček silikagelu. Byl získán acetát **4** (7,36 g, 97%).

B.t.: 92 – 94,5 °C, [lit.<sup>12</sup> 89-90 °C].  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz) v  $\text{CDCl}_3$ : 0,60 s, 3 H (3 x H-18); 0,93 s, 3 H (3 x H-19); 2,04 s, 3 H (OAc); 2,11 s, 3 H (3 x H-21); 2,53 t, 1 H,  $J = 9$  (H-17 $\alpha$ ); 4,77 – 4,69 m, 1 H (H-3). IČ spektrum: 1720 (C=O, acetát); 1253,1028 (C-O, acetát); 1383 ( $\text{CH}_3$ ). Pro  $\text{C}_{23}\text{H}_{36}\text{O}_3$  (360,5) vypočteno: 76,62 % C, 10,06 % H; nalezeno: 76,56 % C, 10,16 % H.

## (20R)-20-hydroxy-5 $\beta$ -pregnan-3 $\alpha$ -yl-acetát (5a) a (20S)-20-hydroxy-5 $\beta$ -pregnan-3 $\alpha$ -yl-acetát (5b)

Acetát **4** (7,45 g, 15,95 mmol) byl rozpuštěn ve směsi methanol-tetrahydrofuran (2:1, 287 ml). K roztoku byl přidán bezvodý chlorid ceritý ( $\text{CeCl}_3$ , 4,324 g, 1,1 ekv.). Za stálého míchání byl v několika dávkách přidán tetrahydridoboritan sodný ( $\text{NaBH}_4$ , 723 mg, 19,13 mmol). Po ukončení reakce potvrzeným TLC byla reakční směs nalita do vody. Vzniklá sraženina byla odsáta (5,4 g). Z filtrátu byl na vakuové odparce ze směsi odstraněn methanol a tetrahydrofuran. Destilační zbytek byl extrahován ethyl-acetátem (2x 200 ml). Spojené organické fáze byly sušeny bezvodým síranem sodným. Ethyl-acetát byl odpařen za sníženého tlaku. Odparek (2,05 g) a sraženina (5,4 g) byly spojeny a chromatografií na sloupci silikagelu byly izomery rozděleny ve směsi petrolether-ether (9:1). Byl získán (20R)-20-alkohol **5a** (2,69 g, 36%) a (20S)-20-alkohol **5b** (1,25 g, 18%) a nerozdělená směs izomerů 20R a 20S (1,83 g, 25%).

### (20R)-Izomer (5a):

B.t.: 129-131,6 °C, [lit.<sup>13</sup> 137-140 °C].  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz) v  $\text{CDCl}_3$ : 0,74 s, 3 H (3 x H-18); 0,94 s, 3 H (3 x H-19); 1,14 d, 3 H,  $J = 6,1$  (3 x H-21); 2,03 s, 3 H (OAc); 3,76 – 3,69 m, 1 H, (H-20); 4,77 – 4,68 m, 1 H (H-3). IČ spektrum: 3610, 3452 (O-H, alkohol); 1721 (C=O,



acetát); 1364 (CH<sub>3</sub>, acetát); 1252, 1028 (C-O, acetát). Pro C<sub>23</sub>H<sub>38</sub>O<sub>3</sub> (362,2) vypočteno: 76,20 % C, 10,56 % H; nalezeno: 76,33 % C, 10,76 % H.

**(20S)-Izomer (5b):**

B.t.: 121,5 - 124 °C, [lit.<sup>14</sup> 131-132 °C]. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz) v CDCl<sub>3</sub>: 0,65 s, 3 H (3 x H-18); 0,93 s, 3 H (3 x H-19); 1,22 d, 3 H, J = 6,2 (3 x H-21); 2,03 s, 3 H (OAc); 3,73 – 3,67 m, 1 H, (H-20); 4,77 – 4,69 m, 1 H (H-3). IČ spektrum: 3616, 3451 (O-H, alkohol); 1721 (C=O, acetát); 1364 (CH<sub>3</sub>, acetát); 1252, 1027 (C-O, acetát). Pro C<sub>23</sub>H<sub>38</sub>O<sub>3</sub> (362,2) vypočteno: 76,20 % C, 10,56 % H; nalezeno: 76,35 % C, 10,75 % H.

**(20R)-5β-Pregnan-3α,20diyl-3-acetát-20-tosylát (6a)**

(20R)-20-Alkohol **5a** (2,4 g, 6,62 mmol) byl rozpuštěn v absolutním pyridinu (40 ml) v 250 ml baňce. V ledové lázni byl za stálého míchání postupně přisypáván *p*-toluensulfonylchlorid (*p*-TsCl, 2,56 g, 0,0134 mmol). Směs byla ponechána stát přes noc za laboratorní teploty. Poté byla nalita do vody (100 ml) a extrahována chloroformem (3x 50 ml). Chloroformové extrakty byly spojeny a promyty vodou (100 ml), 5% HCl (2x 100 ml), vodou (100 ml), nasyceným roztokem hydrogenuhličitanu sodného (2x 100 ml) a nakonec vodou (100 ml). Vysušeno přes bezvodý síran sodný. Odpařeno na vakuové odparce. Odparek byl požadovaný (20R) tosylát **6a** (3,29 g, 96%).

B.t.: 147,5-150°C. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz) v CDCl<sub>3</sub>: 0,67 s, 3 H (3 x H-18); 0,92 s, 3 H (3 x H-19); 1,19 d, 3 H, J=6,1 (3 x H-21); 2,02 s, 3H (OAc); 2,44 s, 3H (Ar-CH<sub>3</sub>); 4,77 – 4,67 m, 2 H, (H-3,H-20); 7,32 d, 2H, J = 8,0 (H-3-Ar, H-5-Ar); 7,79 d, 2H, J = 8,3 (H-2-Ar, H-6-Ar). IČ spektrum: 1721 (C=O, acetát); 1382 (CH<sub>3</sub>, 18,19); 1362 (CH<sub>3</sub>, acetát); 1258, 1251 (C-O, acetát); 1175 (SO<sub>2</sub>, tosylát). Pro C<sub>30</sub>H<sub>44</sub>O<sub>5</sub>S (516,73) vypočteno: 69,73 % C, 8,58 % H; nalezeno: 70,03 % C, 8,76 % H.

**(20S)-5β-pregnan-3α,20diyl-3-acetát-20-tosylát (6b)**

(20S)-20-Alkohol **5b** (1,2 g, 3,31 mmol) byl rozpuštěn v absolutním pyridinu (20 ml) v 250 ml baňce. V ledové lázni byl za stálého míchání postupně přisypáván *p*-toluensulfonylchlorid (*p*-TsCl, 1,28 g). Směs byla ponechána stát přes noc za laboratorní teploty. Poté nalita do vody (100 ml) a extrahována chloroformem (3x 50 ml). Chloroformové extrakty byly spojeny a promyty vodou (100 ml), 5% HCl (2x 100 ml), vodou (100 ml), nasyceným roztokem hydrogenuhličitanu sodného (2x 100 ml) a nakonec vodou (100 ml). Odpařeno na vakuové odparce. Odparek byl požadovaný (20S)-20-tosylát **6b** (1,58 g, 92%).

B.t.: 134-135,5 °C, [lit.<sup>15</sup> 124-126 °C]. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz) v CDCl<sub>3</sub>: 0,62 s, 3 H (3 x H-18); 0,91 s, 3 H (3 x H-19); 1,31 d, 3 H J=6,2(3 x H-21); 2,02 s, 3H (OAc); 2,44 s, 3H (Ar-CH<sub>3</sub>); 4,75 – 4,63 m, 2 H, (H-3,H-20); 7,32 d, 2H, J = 8,0 (H-3-Ar, H-5-Ar); 7,78 d, 2H, J = 8,3 (H-2-Ar, H-6-Ar). IČ spektrum: 1722 (C=O, acetát); 1382 (CH<sub>3</sub>, 18,19); 1362 (CH<sub>3</sub>, acetát); 1256, 1028 (C-O, acetát); 1175 (SO<sub>2</sub>, tosylát). Pro C<sub>30</sub>H<sub>44</sub>O<sub>5</sub>S (516,73) vypočteno: 69,73 % C, 8,58 % H; nalezeno: 70,02 % C, 8,87 % H.

#### **(20S)-20-Azido-5β-pregnan-3-yl-acetát (7a)**

Tosylát **6a** (500 mg, 1,29 mmol) byl rozpuštěn v 250 ml baňce v suchém dimethylsulfoxidu (50 ml). K roztoku byl přidán azid sodný (2g, 29,42 mmol). Reakční směs byla zahřívána na olejové lázni na teplotu 95 °C po dobu 6 h. Konec reakce zkontrolován TLC ve směsi petrolether-ether (7:3). Reakční směs byla nalita na vodu (150 ml) a extrahována ethyl-acetátem (3x 50 ml). Spojené organické fáze promyty vodou (2x 50 ml) a sušeny bezvodým síranem sodným. Ethyl-acetát odpařen za sníženého tlaku. Odparek dělen na sloupci silikagelu v soustavě petrolether-ether (99:1). Byly získány dvě hlavní látky: požadovaný azid **7a** (136 mg, 36%) a olefin (140 mg).

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz) v CDCl<sub>3</sub>: 0,67 s, 3 H (3 x H-18); 0,93 s, 3 H (3 x H-19); 1,32 d, 3 H, J = 6,5 (3 x H-21); 2,03 s, 3H (OAc); 3,30 – 3,23 m, 1H (H-20); 4,76 – 4,68 m, 1H (H-3). IČ spektrum: 2103, 2080, 563 (N<sub>3</sub>); 1722 (C=O, acetát); 1256, 1027 (C-O, acetát); 1364 (CH<sub>3</sub>, acetát). HR-MS (+ESI) vypočteno pro C<sub>23</sub>H<sub>37</sub>NaN<sub>3</sub>O<sub>2</sub> [M<sup>+</sup> + Na] 410,2783; nalezeno: 410,2778. Pro C<sub>23</sub>H<sub>37</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub> (387,6) vypočteno: 71,28% C, 9,62% H; 10,74% N; nalezeno: 80,07 % C, 10,75 % H.

#### **(20R)-20-Azido-5β-pregnan-3-yl-acetát (7b)**

Tosylát **6b** (500 mg, 1,29 mmol) byl rozpuštěn v 250 ml baňce v suchém dimethylsulfoxidu (50 ml). K roztoku byl přidán azid sodný (2g, 29,42 mmol). Reakční směs byla zahřívána na olejové lázni na teplotu 95 °C po dobu 6 h. Konec reakce zkontrolován TLC ve směsi petrolether-ether (7:3). Reakční směs byla nalita na vodu (150 ml) a extrahována ethyl-acetátem (3x 50 ml). Spojené organické fáze byly promyty vodou (2x 50 ml) a sušeny bezvodým síranem sodným. Ethyl-acetát odpařen za sníženého tlaku. Odparek dělen na sloupci silikagelu v soustavě petrolether-ether (99:1). Byly získány dvě hlavní látky: požadovaný azid **7b** (99 mg, 20%) a olefin (200 mg).

B.t.: 106,5-108 °C,  $[\alpha]_D - 10,7$  (c 0,140).  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz) v  $\text{CDCl}_3$ : 0,68 s, 3 H (3 x H-18); 0,94 s, 3 H (3 x H-19); 1,26 d, 3 H,  $J = 6,4$  (3 x H-21); 2,03 s, 3H (OAc); 3,18 – 3,10 m, 1H (H-20); 4,76 – 4,68 m, 1H (H-3). IČ spektrum: 2105, 2084, 565 ( $\text{N}_3$ ); 1721 (C=O, acetát); 1257, 1028 (C-O, acetát); 1379 ( $\text{CH}_3$ , 18, 19), 1364 ( $\text{CH}_3$ , acetát). Pro  $\text{C}_{23}\text{H}_{37}\text{N}_3\text{O}_2$  (387,6) vypočteno: 71,28 % C, 9,62 % H, 10,74 % N; nalezeno: 71,59 % C, 9,85 % H, 10,50 % N.

### **(20S)-20-Azido-pregnan-3 $\alpha$ -ol (8a)**

Acetát **7a** (135 mg, 0,348 mmol) byl rozpuštěn v ethanolu. K roztoku byl přidán hydroxid sodný rozpuštěný v MeOH (NaOH, 20,8 mg, 1,5 ekv.). Roztok byl zahříván dvě hodiny za stálého míchání na vodní lázni při 42°C. Průběh reakce byl kontrolován na TLC v soustavě petrolether - ether (7:3). Po dokončení reakce byla směs nalita do vody (100 ml) a extrahována do ethyl-acetátu (3x 50 ml), ethyl-acetátové frakce byly spojeny a promyty vodou (100 ml), 5% HCl (2x 50 ml), vodou (100 ml), nasyceným roztokem hydrogenuhličitanu sodného (2x 50 ml) a nakonec vodou (100 ml). Ethyl-acetát byl odpařen za sníženého tlaku a odparek byl požadovaný alkohol **8a** (119,5 mg, 99%).

B.t.: 119,6-122,5 °C.  $[\alpha]_D + 51,4$  (c 0,1).  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz) v  $\text{CDCl}_3$ : 0,66 s, 3 H (3 x H-18); 0,92 s, 3 H (3 x H-19); 1,31 d, 3 H,  $J = 6,5$  (3 x H-21); 3,30 – 3,23 m, 1 H (H-20), 3,67 – 3,59 m, 1 H (H-3). IČ spektrum: 3609 (OH, alkohol); 2103, 2082, 563 ( $\text{N}_3$ , azid); 1378 ( $\text{CH}_3$ , 18, 19); 1031 (C-O). Pro  $\text{C}_{21}\text{H}_{35}\text{N}_3\text{O}$  (345,52) vypočteno: 73,00 % C, 10,21 % H, 12,16 % N; nalezeno: 73,10 % C, 10,36 % H, 11,49 % N.

### **(20R)-20-Azido-pregnan-3 $\alpha$ -ol (8b)**

Acetát **7b** (154,5 mg, 0,4 mmol) byl rozpuštěn v ethanolu. K roztoku byl přidán hydroxid sodný rozpuštěný v MeOH (NaOH, 23,9 mg, 1,5 ekv.). Roztok byl hydrolyzován dvě hodiny za stálého míchání na vodní lázni při 42°C. Průběh reakce byl kontrolován na TLC v soustavě petrolether - ether (7:3). Po skončení reakce byla směs nalita na vodu (100 ml) a extrahována do ethyl-acetátu (3x 50 ml), ethyl-acetátové frakce byly spojeny a promyty vodou (100 ml), 5% HCl (2x 50 ml), vodou (100 ml), nasyceným roztokem hydrogenuhličitanu sodného (2x 50 ml), vodou (100 ml) a sušeny bezvodým síranem sodným. Ethyl-acetát byl odpařen za sníženého tlaku a odparek byl požadovaný alkohol **8b** (127,9 mg, 89%).

B.t.: 146,6-149 °C.  $[\alpha]_D - 29,4$  (c 0,160).  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz) v  $\text{CDCl}_3$ : 0,68 s, 3 H (3 x H-18); 0,93 s, 3 H (3 x H-19); 1,26 s, 3 H,  $J = 6,5$  (3 x H-21); 3,17-3,10 m, 1 H (H-20); 3,70-3,60 m, 1 H (H-3). IČ spektrum: 3609 (OH, alkohol); 2105, 2083, 565 ( $\text{N}_3$ , azid); 1378 ( $\text{CH}_3$ ,

18, 19); 1031 (C-OH). Pro  $C_{21}H_{35}N_3O$  (345,5) vypočteno: 73,00 % C, 10,21 % H, 12,16 % N; nalezeno: 73,01 % C, 10,36 % H, 11,57 % N.

### **(20S)-20-Azido-5 $\beta$ -pregnan-3 $\alpha$ -yl-sulfát (9a)**

Do vysušené 150 ml baňky byl navážen (20S)-20-azid **8a** (100 mg, 204,6 mmol). K tomu byl přidán chloroform čerstvě destilovaný z  $P_2O_5$  (5 ml). K roztoku byl přidán komplex oxid sírový – pyridin (200 mg, 1,4 mmol). Reakční směs byla za laboratorní teploty míchána 6h. Přes noc byla vychlazena v mrazicím boxu na  $-18\text{ }^\circ\text{C}$ . Poté byla rychle zfiltrována přes buničinu a chloroform odpařen za sníženého tlaku. Odparek byl požadovaný sulfát **9a** (87 mg, 59%).

B.t.:  $194\text{--}196\text{ }^\circ\text{C}$ ,  $[\alpha]_D + 35,5$  (c 0,265).  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz) v  $\text{CDCl}_3$ : 0,65 s, 3 H (3 x H-18); 0,91 s, 3 H (3 x H-19); 1,31 d, 3 H,  $J = 6,5$  (3 x H-21); 3,29-3,22 m, 1 H (H-20); 4,51-4,43 m, 1 H (H-3); 8,02 -7,99 m, 2 H (H-3 a H-5, pyridin); 8,48 tt, 1 H,  $J_1 = 7,8$ ,  $J_2 = 1,5$  (H-4, pyridin); 8,99 – 8,97 m, 2 H (H-2, H-6, pyridin). IČ spektrum: 2103, 2082 ( $\text{N}_3$ , azid); 1378 ( $\text{CH}_3$ , 18, 19); 1048 ( $\text{SO}_3^-$ , sulfát). Pro  $C_{26}H_{40}N_4O_4S$  (504,7) vypočteno: 61,88 % C, 7,99 % H, 11,10 % N; nalezeno: 57,51 % C, 8,10 % H, 9,66 % N.

### **(20R)-20-Azido-5 $\beta$ -pregnan-3 $\alpha$ -yl-sulfát (9b)**

Do vysušené 150 ml baňky byl navážen (20R)-20-azid **8b** (50 mg, 102,3 mmol). K tomu byl přidán chloroform čerstvě destilovaný z  $P_2O_5$  (5 ml). K roztoku byl přidán komplex oxid sírový – pyridin (200 mg, 1,4 mmol). Reakční směs byla za laboratorní teploty míchána 6h. Přes noc byla vychlazena v mrazicím boxu na  $-18\text{ }^\circ\text{C}$ . Poté byla rychle zfiltrována přes buničinu a chloroform odpařen za sníženého tlaku. Odparek byl požadovaný sulfát **9b** (40 mg, 55%).

B.t.:  $172\text{--}174\text{ }^\circ\text{C}$ .  $[\alpha]_D + 15,9$  (c 0,2).  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz) v  $\text{CDCl}_3$ : 0,67 s, 3 H (3 x H-18); 0,92 s, 3 H (3 x H-19); 1,28 d, 3 H,  $J = 6,5$  (3 x H-21); 3,29-3,22 m, 1 H (H-20); 4,51-4,43 m, 1 H (H-3); 7,99-7,95 m, 2 H (H-3 a H-5, pyridin); 8,45 tt, 1 H,  $J_1 = 7,8$ ,  $J_2 = 1,5$  (H-4, pyridin); 8,97 – 8,95 m, 2 H (H-2, H-6, pyridin). IČ spektrum: 2105, 2084 ( $\text{N}_3$ , azid); 1389 ( $\text{CH}_3$ , 18, 19); 1050 ( $\text{SO}_3^-$ , sulfát). Pro  $C_{26}H_{40}N_4O_4S$  (504,7) vypočteno: 61,88 % C, 7,99 % H, 11,10 % N; nalezeno: 57,47 % C, 8,11 % H, 9,96 % N.

## **Závěr**

Z výchozích látek **5a** a **5b** se podařilo připravit oba sulfatované azidové deriváty 5 $\beta$  pregnanolonu **9a** a **9b**, u kterých byla následně na Oddělení buněčné neurofyziologie Fyziologického ústavu AV ČR měřena jejich aktivita na NMDA receptor. U obou sulfátů byly pozorovány inhibiční účinky.

## Seznam použité literatury

1. Dorda M.; Vlček K.; Chodounská H.; Vyklický L. Jr.: *Psychiatrie*, **2001**, *Supplementum* 3,5.
2. Cais O.; Vyklický L.: *Psychiatrie*, **2006**, *Supplementum* 3, 10, 8-11.
3. Paul S.; Purdy R.: *The FASEB Journal*, **1992**, *Issue 6, Vol. 6*, 2311-2322.
4. Gasior M.; Carter R. B.; Witkin J. M.: *Trends in Pharmacological Sciences*, **1999** – Elsevier, *Vol.20*, 107-112
5. Horák M., Vlček K., Chodounská H., Vyklický L., Jr.: *Neuroscience* **2006**; *137* : 93-102
6. Šťastná Eva : Synthesis of Neurosteroids: Modulators of NMDA Receptor, **2009**
7. Bergmann K. E.; Carlson K. E.; Katzenellenbogen J. A.: *Bioconjugate Chem.* **1994**, *5*, 141-150
8. Kubičková B.; Hodek P.: *Chem. Listy*, **2001**, *95*, 359 - 364
9. Lwowski W.; Nitrenes in Photoaphinity Labeling; *Annals New York Academy of Science*, **1980**, 491-502
10. McCarry B. E.; Markezic R. L.; Johnson W. S. : *Journal of the American Chemical Society*, **1973**, *95*, 4416-4417.
11. Schmitt J.; Comoy P.; Panouse J.J.; Pluchet H.; Cornu P.J.; Hallot A.: *Bulletin de la Societe Chimique de France*, **1962**, *3*, 455-462.
12. Hirofani M.; Furuya T.: *Phytochemistry*, **1975**, *14*, 2601-2606
13. Hossain M.; Kirk D. N.: *Steorids*, **1979**, *34*, 677-680
14. Rajagopa M. S.; Turner A.B.: *Journal of the American Chemical Society – C Organic*, **1970**, *16*, 2266-2268.
15. Yoshizawa I.; OhUchi R.; Nagata K.; Itoh S.; Kawahara N.: *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, **1982**, *30*, 2474-2486.

## Seznam obrázků

Obrázek 1.	Základní struktury neuroaktivních steroidů .....	4
Obrázek 2.	Tvar molekuly Allopregnanolonu ( $3\alpha5\alpha$ ) a Pregnanolonu ( $3\alpha5\beta$ ) .....	7
Obrázek 3.	Přehled reakcí udržující rovnovážnou hladinu $Ca^{2+}$ .....	8
Obrázek 4.	Sled buněčných reakcí reagujících na zvýšenou hladinu $Ca^{2+}$ .....	9
Obrázek 5.	Fotolýza azidové skupiny na nitren .....	12

## Seznam tabulek

Tabulka 1.	Účinek PS a $3\alpha5\beta$ S na $GABA_A$ a NMDAR.....	6
------------	--	---