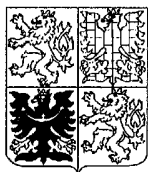


PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **27.09.1998**
(32) Datum podání prioritní přihlášky: **28.09.1997**
(31) Číslo prioritní přihlášky: **1997/121844**
(33) Země priority: **IL**
(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **16.08.2000**
(Věstník č. 8/2000)
(86) PCT číslo: **PCT/IL98/00468**
(87) PCT číslo zveřejnění: **WO99/16741**

(21) Číslo dokumentu:

2000 - 1065

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. ⁷:

C 07 C	229/00	A 61 P	9/12
A 61 K	31/22	A 61 P	11/06
A 61 P	9/10	A 61 P	1/00
A 61 P	25/08		
A 61 P	25/16		
A 61 P	25/28		
A 61 P	13/00		
A 61 P	13/08		

(71) Přihlašovatel:

D-PHARM LIMITED, Rehovot, IL;

(72) Původce:

Kozak Alexander, Rehovot, IL;
Shapiro Israel, Ramla, IL;

(74) Zástupce:

PATENTSERVIS PRAHA a.s., Jivenská 1, Praha 4,
14000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Stabilní diester, farmaceutický prostředek ho
obsahující a jeho použití**

(57) Anotace:

Je popsán stabilní diester karboxylové kyseliny, která znamená farmaceuticky přijatelné chelatační činidlo pro dvojmocné ionty kovů, obecného vzorce $(\text{HOOC-CH}_2)_2\text{-N-A-N-}(\text{CH}_2\text{COOH})$, kde A znamená nasycenou nebo nenasycenou alifatickou, aromatickou nebo heterocyklickou spojovací skupinu, která obsahuje v přímé vazbě řetězce mezi dvěma vyznačenými atomy dusíku 2 až 8 atomů uhlíku v kontinuálním řetězci, který může být přerušen 2 až 4 atomy kyslíku s tím, že členové řetězce přímo napojeni na dva označené atomy dusíku neznamenaají atomy kyslíku, s farmaceuticky přijatelným alkoholem, vybraným ze skupiny nasyceného nebo nenasyceného alkylu s přímým nebo větveným řetězcem, aminoalkylu a substituovaného nebo nesubstituovaného alkylu, a její farmaceuticky přijatelné soli. Je popsán také farmaceutický prostředek, který jako účinnou složku obsahuje uvedený stabilní diester, a použití tohoto diesteru pro léčení onemocnění nebo poruch související s nadbytkem dvojmocných iontů kovů, zvláště intracelulárních Ca^{++} iontů, jako je mozková a srdeční ischemie, infarkt myokardu, epilepsie, Alzheimerova choroba, Parkinsonova choroba, akutní zánět, urinární inkontinence, hypertrofie prostaty, svalové křeče, arteriální hypertenze, astma a syndrom podráždění střev.

Stabilní diester, farmaceutický prostředek ho obsahující a jeho použití

Oblast techniky

Předložený vynález se týká stabilního diesteru karboxylové kyseliny, tedy lipofilních diesterů chelatačního činidla, způsobů syntetizování těchto činidel, farmaceutických prostředků, které je obsahují, a jejich použití při léčení onemocnění souvisejících s abnormálními hladinami dvojmocných iontů kovů, zvláště zvýšených hladin intracelulárních vápenatých iontů. Podrobněji se tento vynález týká diesterů 1,2-bis-(2-aminofenoxy)ethan-N,N,N',N'-tetraoctové kyseliny, zde dále označované jako BAPTA, což jsou stabilní lipofilní deriváty chelatačních činidel dvojmocných iontů kovů.

Dosavadní stav techniky

Kovové ionty, jako je vápenatý, manganatý, hořečnatý, měďnatý, zinečnatý a železnatý, hrají významnou roli v biologických systémech regulování struktury proteinů, aktivity enzymů a buněčné signalizace. Mezi různá onemocnění nebo patologické stavy patří mozková a srdeční ischemie, infarkt, infarkt myokardu, epilepsie, chronická degenerativní onemocnění jako je Alzheimerova choroba, Parkinsonova choroba a akutní zánět, o nichž se předpokládá, že souvisejí s jevem abnormálně zvýšených intracelulárních hladin vápníku. Další onemocnění, která souvisejí s neuronální a svalovou hyperaktivitou, jako je urinární inkontinence, hypertrofie prostaty, svalové křeče, arteriální hypertenze, astma a syndrom podráždění střev, souvisejí se zvýšenými hladinami intracelulárních dvojmocných iontů, jako je vápník a zinek.

Intracelulární vápník je důležitou determinantou pro smrt buněk, pocházející od počátečního poškození buňky. Může být zahrnut ve smrti buněk v lymfocyty a zabíječovou buňkou zprostředkovaném poškození cílových buněk, při poškození orgánů během transplantace a při dalších poškozeních tkání včetně ischemických

poškození. Jako ochrana proti poranění tkání nebo pro snížení poškození tkání byly navrženy blokátory kanálků vápníku nebo chelatační činidla vápníku v takových formách, které jsou schopny proniknout membránou.

Poškození buněk, ke kterému dochází při ischemii, může být sekundární pro přívod a/nebo intracelulární uvolňování vápenatých iontů (Choi: *Trends Neurosci.* **1988**, *11*, 465 až 469; Siesjo a Smith: *Arzneimittelforschung* **1991**, *31*, 288 až 292.). Podobně se zdá, že přívod vápníku hraje důležitou roli při genesi epileptických záchvatů. I když významná část intracelulárního vápníku pochází z intracelulárních zásob, současný výzkum ukazuje na to, že blokátory vstupu vápníku mají protikřečovou aktivitu (viz např. Meyer: *Brain Res.* **1989**, *14*, 227 až 243.).

Byly tak vyvinuty některé farmakologické strategie, které měly za úmysl zabráňovat nebo léčit tuto patologickou akumulaci intracelulárního vápníku, což může vést k tomu, že nedochází k patologickému uvolňování vápenatých iontů z intracelulárních zásob nebo ke škodlivému toku vápníku do buněk.

Mezi léčiva, která se běžně nebo potenciálně používají pro léčení onemocnění souvisejících s vápníkem, patří: i) blokátory kanálků vápníku, ii) léčiva ovlivňující rovnováhu vápníku modifikací míst skladování intracelulárního vápníku a iii) činidla chelatující intracelulární vápník. Blokátory kanálků vápníku používané v klinické praxi jsou reprezentovány Verapamilem, Nifedipinem a Diltiazem. Hlavní toxicity související s použitím těchto sloučenin zahrnují nadměrnou vasodilataci, negativní inotropii, depresi sinusu nodálních krys a poruchy A-V nodálního přenosu. Léčiva ovlivňující mobilizaci a/nebo maskování vápníku, jako blokátory kanálků vápníku, vykazují dost úzkou specifickou.

Mezi nejvíce afinitní a nejselektivnější chelatační činidla vápníku patří různé deriváty 1,2-bis-(2-aminofenoxyethan)-N,N,N',N'-tetraoctové kyseliny (BAPTA), která byla původně popsána Tsienem (*Biochem.* **1980**, *19*, 2396.). Různé fluorescenční a další reaktivní deriváty BAPTA byly popsány například v USA patentech č. 4 603 209,

4 849 362, 5 049 673 a 5 453 517. Žádný z těchto popsaných derivátů není stabilním diesterem chelatačního činidla.

Použití chelatačních činidel vápníku pro snížení poškození savčích buněk je popsáno v mezinárodním spisu č. WO 94/08573, který popisuje použití esterových chelatačních činidel vápníku, která pronikají membránou buněk, jako proléčiv pro klinické požadavky. Mezi dostupná chelatační činidla vápenatých a dalších dvojmocných kovů, která pronikají membránou buněk, patří acetoxymethylestery, jako je acetoxymethylester ethylenglykol-bis-2-aminoethyleteru N,N,N',N'-tetraoctové kyseliny (EGTA-AM), acetoxymethylester ethyldiamintetraoctové kyseliny (EDTA-AM) a acetoxymethylester 1,2-bis(2-aminofenoxy)ethan-N,N,N',N'-tetraoctové kyseliny (BAPTA-AM). Tyto známé komplexní molekuly jsou proléčivy štěpené jedinečnými esterasami, díky čemuž způsobují aktivaci chelatačního činidla v intracelulárním prostoru. Citlivost těchto sloučenin na esterasu tedy vede za fyziologických podmínek k vysokým oběhovým hladinám volné BAPTA a nízké účinnosti léčiva v cílovém místě. BAPTA-AM se tedy například musí používat v relativně vysoké terapeutické dávce, která souvisí s toxicitou.

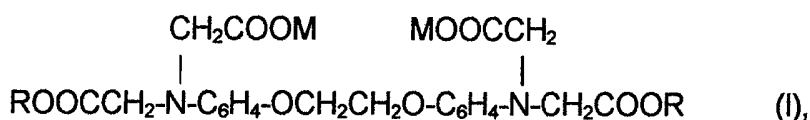
Podstata vynálezu

Podle jednoho aspektu předloženého vynálezu se získávají nové stabilní lipofilní diestery chelatačních činidel. Tento vynález tedy poskytuje stabilní karboxylovou kyselinu diesterifikovanou hydroxylovou sloučeninou, kde karboxylová kyselina znamená farmaceuticky přijatelné chelatační činidlo pro dvojmocné ionty kovu obecného vzorce $(\text{HOOC-CH}_2)_2\text{-N-A-N-}(\text{-CH}_2\text{COOH})_2$, v němž A znamená nasycenou nebo nenasycenou, alifatickou, aromatickou nebo heterocyklickou spojovací skupinu, která obsahuje v přímé vazbě řetězce mezi dvěma vyznačenými atomy dusíku 2 až 8 atomů uhlíku v kontinuálním řetězci, který může být přerušen 2 až 4 atomy kyslíku s tím, že členové řetězce přímo napojení na dva označené atomy dusíku neznamenaají atomy kyslíku, a hydroxylová sloučenina znamená farmaceuticky přijatelný alkohol, který je vybrán ze skupiny nasyceného nebo nenasyceného alkylu

s přímým nebo větveným řetězcem, aminoalkylu a substituovaného nebo nesubstituovaného arylalkylu, a farmaceuticky přijatelné soli uvedených diesterifikovaných karboxylových kyselin.

Podle výhodných provedení podle předloženého vynálezu se získávají diestery chelatačních činidel ethylen-1,2-diamin-N,N,N',N'-tetraoctové kyseliny, ethylen-1,2-diol-bis-(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraoctové kyseliny a zvláště diestery 1,2-bis-(2-aminofenoxy)ethan-N,N,N',N'-tetraoctové kyseliny.

Podle výhodného provedení tohoto vynálezu se získávají diestery obecného vzorce I



v němž substituenty na aromatických kruzích jsou v ortho poloze, R znamená skupinu vybranou ze skupiny sestávající z $\text{C}_n\text{H}_{2n+1}$ (n znamená číslo od 1 do 10), $\text{C}_n\text{H}_{2n+1}(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_m$ (n znamená číslo od 1 do 20 a m znamená číslo od 1 do 6), $(\text{C}_n\text{H}_{2n+1})_2\text{N}(\text{CH}_2)_m$ (n znamená číslo 1 až 6 a m znamená číslo 1 až 6) a substituované nebo nesubstituované skupiny ArCH_2 , a M znamená jakýkoliv fyziologicky přijatelný kation.

Běžně výhodné sloučeniny podle tohoto vynálezu jsou sloučeniny obecného vzorce I, v němž R je vybrána ze skupiny sestávající z C_2H_5 , C_3H_7 , iso- C_3H_7 , C_4H_9 , C_7H_{15} , C_8H_{17} , $\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$, $\text{CH}_3\text{OCH}_2\text{CH}_2$, $\text{C}_2\text{H}_5\text{OCH}_2\text{CH}_2$, $\text{C}_3\text{H}_7\text{OCH}_2\text{CH}_2$, $\text{C}_4\text{H}_9\text{OCH}_2\text{CH}_2$, $\text{C}_7\text{H}_{15}\text{OCH}_2\text{CH}_2$, $\text{C}_8\text{H}_{17}\text{OCH}_2\text{CH}_2$, $\text{C}_{10}\text{H}_{21}\text{OCH}_2\text{CH}_2$, $\text{C}_{16}\text{H}_{23}\text{OCH}_2\text{CH}_2$, $\text{C}_{18}\text{H}_{37}\text{OCH}_2\text{CH}_2$, $\text{CH}_3(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_2$, $\text{C}_2\text{H}_5\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2)_2$, $\text{C}_4\text{H}_9(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_2$, $\text{C}_6\text{H}_{13}(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_2$, $\text{C}_7\text{H}_{15}(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_2$, $\text{C}_8\text{H}_{17}(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_2$, $\text{C}_{10}\text{H}_{21}(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_2$, $\text{CH}_3(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_3$, $(\text{CH}_3)_2\text{NCH}_2\text{CH}_2$ a $\text{C}_7\text{H}_{15}(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_3$.

Výhodnější jsou sloučeniny obecného vzorce I, v němž R je vybrána ze skupiny sestávající z C_2H_5 , C_3H_7 , C_4H_9 , C_7H_{15} , C_8H_{17} , $C_8H_{17}OCH_2CH_2$, $C_{10}H_{21}OCH_2CH_2$, $C_{16}H_{23}OCH_2CH_2$, $C_{18}H_{37}OCH_2CH_2$, $C_8H_{17}(OCH_2CH_2)_2$ a $C_{10}H_{21}(OCH_2CH_2)_2$.

Pro některá farmaceutická provedení podle předloženého vynálezu jsou nejvýhodnější sloučeniny shora uvedeného obecného vzorce I, v němž R znamená skupinu C_8H_{17} nebo $C_8H_{17}OCH_2CH_2$.

Podle jiného aspektu vynálezu se získávají farmaceutické prostředky, které jako účinnou složku obsahují stabilní lipofilní diester chelatačního činidla podle vynálezu a farmaceuticky přijatelné ředidlo nebo nosič. Farmaceutické prostředky mohou být v kapalně nebo pevně dávkové formě a mohou být podávány orálně, parenterálně nebo intranazálně.

Lipofilní diestery chelatačních činidel podle vynálezu jsou užitečné pro léčení nebo předcházení poruch souvisejících s ionty kovů, například poruch souvisejících s abnormálními hladinami manganatých, hořečnatých, měďnatých, zinečnatých, železnatých, kademnatých, rtuťnatých, kobaltnatých a zvláště vápenatých iontů. V ještě jiném aspektu tedy předložený vynález poskytuje způsob léčení onemocnění nebo poruchy související s nadbytkem dvojmocných iontů kovů, který se vyznačuje tím, že zahrnuje podávání jedinci, který to potřebuje, terapeuticky efektivního množství stabilního lipofilního diesteru farmaceuticky přijatelného chelatačního činidla dvojmocných iontů kovů. Zvláště pak předložený vynález poskytuje způsob léčení onemocnění nebo poruchy související s nadbytkem intracelulárních vápenatých iontů, jako je mozková a srdeční ischemie, infarkt, infarkt myokardu, epilepsie, Alzheimerova choroba, Parkinsonova choroba, akutní zánět, urinární inkontinence, hypertrofie prostaty, svalové křeče, arteriální hypertenze, astma a syndrom podráždění střev. Uvedený způsob zahrnuje podávání jednotlivci, který to potřebuje, terapeuticky efektivního množství farmaceuticky přijatelného diesteru chelatačního činidla podle

vynálezu. Sloučeniny podle vynálezu mohou být užitečné také při lékařském ošetření, jako je otevřená operace srdce.

V následující části popisu budou stručně popsány obrázky.

Tento vynález bude pochopen a plněji ukázán níže uvedeným podrobným popisem spolu s dále popsánymi obrázky.

Obr. 1A až C ukazuje koncentrační změny tří dvojmocných iontů kovů a) Fe^{++} , b) Zn^{++} a c) Ca^{++} ve vodném (otevřené symboly) a oktanolovém (plné symboly) roztoku v přítomnosti různých koncentrací buď dioktylethylenglykolesteru BAPTA (DP-BASPTA-99, čtverečky) nebo BAPTA (trojúhelníky).

Obr. 2 ukazuje účinek diethylesteru BAPTA (DP-BAPTA-23) na intracelulární koncentraci Ca^{++} v kultivovaných hippokampálních neuronech, jak to bylo sledováno fluorescencí barviva Fluo-3/AM.

Obrázek 3 ukazuje graf fluorescenčních změn ($\Delta F/F$) barviva Fluo-3/AM, z poměru pěti kultivovaných hippokampálních neuronů, což představuje účinek různých koncentrací DP-BASPTA-99 (0,1 $\mu\text{g/ml}$, 1 $\mu\text{g/ml}$ a 10 $\mu\text{g/ml}$) na draslíkem indukované zvýšení koncentrace intracelulárních vápenatých iontů. Hvězdičky (*) znamenají K^+ puls.

Obrázek 4 ukazuje Na/K-ATP-asovou aktivitu (jako % vzhledem ke kontrole bez léčiv) měřenou v myším kortexovém homogenátu v přítomnosti různých koncentrací diethylesteru BAPTA (DP-BAPTA-27).

Obr. 5 ukazuje potenciál mmebránového působení ve stimulovaných kultivovaných kardiomyocytech předinkubovaných následujícím způsobem: 1 - kontrola, bez přidání, 2 - ouabain, 10^{-6}M , 6 min; 3 - ouabain, 10^{-6}M , 10 min; 4 - ouabain, 10^{-6}M , 13 min; 5 - ouabain, 10^{-6}M + DP-BAPTA-23, 10^{-10} mg/ml, 35 min.

Obrázek 6 ukazuje glutamátem indukovanou smrt buněk v přítomnosti různých koncentrací DP-BAPTA-99 přidaných 1 hodinu před glutamátovým poškozením.

Obrázek 7 ukazuje glutamátem indukovanou smrt buněk v přítomnosti DP-BAPTA-99 přidaného v různých dobách, jak ukazuje následující glutamátové poškození.

Obrázek 8 ukazuje neuronovou specifickou enolasovou aktivitu (NES) měřenou v seru mongolských gerbil 24 hodin po globální ischemii předního mozku jako funkci jejich léčení; $t = 0$ a $t = +3h$ znamená čas (v hodinách) vzhledem k nástupu reperfuse, jestliže se i.p. podá dioktylester BAPTA (DP-BAPTA-60, šedé sloupky) a dioktylethyleglykolester BAPTA (DP-BAPTA-99, tmavé sloupky).

Obr. 9A a B ukazují neuronovou specifickou enolasovou aktivitu (NES) měřenou v seru mongolských gerbil 24 a 72 hodin po globální ischemii předního mozku. DP-BAPTA-60 (černé sloupky) byl podáván orálně podle dvou schemat: A) dávka 0,5 mg/kg 4 hodiny před nástupem reperfuse s následující další dávkou 0,5 mg/kg na počátku reperfuse a B) 0,5 mg/kg denně po dobu 3 dnů od ischemie. NSE aktivita u kontrolních zvířat ošetřených roztokem ředidla je uvedena jako světlé sloupky.

Obr. 10 ukazuje dobu přežití (v hodinách) mongolských gerbil od 20 minut po globální ischemii předního mozku. Zvířata dostala buď roztok ředidla (světlé sloupky), 10 $\mu\text{g/kg}$ DP-BAPTA-60 (šedé sloupky) nebo DP-BAPTA-99 (tmavé sloupky) v jediné i.p. dávce při nástupu reperfuse.

Obrázek 11 ukazuje histopatologickou analýzu ischemicky indukovaného poškození mozku (0 = normální, 1 = minimální, 2 = mírné, 3 = přiměřené, 4 = značné) v různých oblastech hippocampu (CA-1, CA-2, CA-3 a Dentate gyrus) gerbil

ošetřených DP-BAPTA-60 (šedé sloupky), DP-BAPTA-99 (tmavé sloupky) nebo solným roztokem (ředidlo, světlé sloupky).

Obrázek 12 ukazuje antiepileptický ochranný účinek (%) různých koncentrací DP-BAPTA-99 u zvířecího modelu krys Wistar, při čemž epilepsie byla indukována Pilokarpinem, 400 mg/kg. Sledovanými epileptickými příznaky byly: limbické záchvaty (bílé), celkové záchvaty (světle šedě), L-SE (tmavě šedě) a přežití (černě).

V následující části bude tento vynález popsán podrobně.

Podle předloženého vynálezu se získávají sloučeniny, které jsou stabilními diestery chelatačních činidel iontů dvojmocných kovů. Mezi tyto dvojmocné ionty kovů patří, ale bez omezení na ně, manganaté, hořečnaté, mědnaté, kobaltnaté, kade-mnaté, rtuťnaté a olovnaté, výhodněji zinečnaté a železnaté, a nejvýhodněji vápenaté ionty.

V tomto spisu a v nárocích pojem "chelatační činidlo" znamená jakoukoliv molekulu, která je schopna chelatovat dvojmocné ionty kovů, jak je to známo z oblasti techniky. Pojem "stabilní" znamená jakoukoliv molekulu, která je natolik velká, aby ji bylo možné izolovat v podstatě v čistém stavu.

Diestery podle vynálezu jsou lipofilní deriváty chelatačních činidel, jak lze změřit konvenčními způsoby zahmujícími pojmy jejich zvýšených roztřepávacích koeficientů mezi vodu a oktanol při srovnání z nederivatizovanými rodičovskými sloučeninami.

Podle jednoho aspektu vynálezu se získává stabilní karboxylová kyselina diesterifikovaná hydroxylovou sloučeninou, kde karboxylová kyselina znamená farmaceuticky přijatelné chelatační činidlo pro dvojmocné ionty kovu obecného vzorce $(\text{HOOC-CH}_2)_2\text{-N-A-N-(-CH}_2\text{COOH)}_2$, v němž A znamená nasycenou nebo nenasy-cenou, alifatickou, aromatickou nebo heterocyklickou spojovací skupinu, která

obsahuje v přímé vazbě řetězce mezi dvěma vyznačenými atomy dusíku 2 až 8 atomů uhlíku v kontinuálním řetězci, který může být přerušen 2 až 4 atomy kyslíku s tím, že členové řetězce přímo napojení na dva označené atomy dusíku neznamenaají atomy kyslíku, a hydroxylová sloučenina znamená farmaceuticky přijatelný alkohol, který je vybrán ze skupiny nasyceného nebo nenasyceného alkylu s přímým nebo větveným řetězcem, aminoalkylu a substituovaného nebo nesubstituovaného arylalkylu, a farmaceuticky přijatelné soli uvedených diesterifikovaných karboxylových kyselin.

V jednom provedení podle vynálezu je vazebná skupina A vybrána ze skupiny sestávající ze skupiny $(\text{CH}_2\text{CH}_2)_m$, kde m znamená číslo 1 až 4, kde 2 až 4 atomy uhlíku, které nejsou připojeny na atom dusíku, mohou být nahrazeny atomy kyslíku, a skupiny $-\text{CR}=\text{CR}-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CR}'=\text{CR}'$, kde každý pár skupin R-R a R'-R' společně s přilehlou skupinou $-\text{C}=\text{C}-$ tvoří aromatický nebo heterocyklický kruh s 5 nebo 6 atomy uhlíku, kruh tvořený R-R je stejný nebo jiný než kruh tvořený R'-R'.

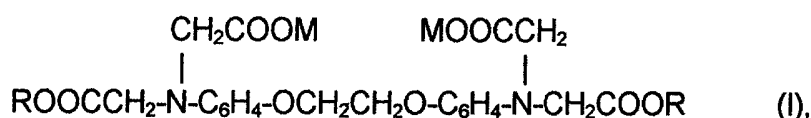
Ve zvláštním provedení je vazebná skupina A vybrána ze skupiny sestávající z $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$ a $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-$ nebo může znamenat $-\text{CR}=\text{CR}-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CR}'=\text{CR}'$, kde každý pár skupin R-R a R'-R' společně s přilehlou skupinou $-\text{C}=\text{C}-$ tvoří aromatický nebo heterocyklický kruh, který je vybrán ze skupiny sestávající z furanu, thiofenu, pyrrolu, pyrazolu, imidazolu, 1,2,3-triazolu, oxazolu, isoxazolu, 1,2,3-oxadiazolu, 1,2,5-oxadiazolu, thiazolu, isothiazolu, 1,2,3-thiadiazolu, 1,2,5-thiadiazolu, benzenu, pyridinu, pyridazinu, pyrimidinu, pyrazinu, 1,2,3-triazinu, 1,2,4-triazinu a 1,2-, 1,3- a 1,4-oxazinů a -thiazinů, kde kruh tvořený R-R je stejný nebo jiný než kruh tvořený R'-R'.

Ve výhodném provedení vazebná skupina A znamená skupinu $-\text{CR}=\text{CR}-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CR}'=\text{CR}'$, kde každý pár skupin R-R a R'-R' společně s přilehlou skupinou $-\text{C}=\text{C}-$ tvoří stejné nebo různé kruhy vybrané z nesubstituovaných a substituovaných benzenových kruhů, v nichž substituované benzenové kruhy obsahují 1 až 4 substituenty vybrané ze skupiny sestávající z nasyceného nebo

nenasyceného alkylu s 1 až 4 atomy uhlíku, nasycené nebo nenasycené alkoxykupiny s 1 až 4 atomy uhlíku, atomu fluoru, chloru, bromu a jodu a skupiny CF_3 nebo jednoho dvojmocného substituentu, který znamená skupinu $-\text{O}-(\text{CH}_2)_n-\text{O}-$ a n znamená číslo 1 až 3.

Běžně je výhodné, aby chelatační činidlo vápníku bylo zahrnuto do léčiva vybraného z ethylen-1,2-diamin-N,N,N',N'-tetraoctové kyseliny, ethylen-1,2-diol-bis-(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraoctové kyseliny a 1,2-bis-(2-aminofenoxy)ethan-N,N,N',N'-tetraoctové kyseliny.

Nejvýhodnější sloučeniny podle předloženého vynálezu jsou sloučeniny obecného vzorce I



v němž substituenty na aromatických kruzích jsou v ortho poloze, R znamená skupinu vybranou ze skupiny sestávající z $\text{C}_n\text{H}_{2n+1}$ (n znamená číslo od 1 do 10), $\text{C}_n\text{H}_{2n+1}(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_m$ (n znamená číslo od 1 do 20 a m znamená číslo od 1 do 6), $(\text{C}_n\text{H}_{2n+1})_2\text{N}(\text{CH}_2)_m$ (n znamená číslo 1 až 6 a m znamená číslo 1 až 6) a substituované nebo nesubstituované skupiny ArCH_2 , a M znamená jakýkoliv fyziologicky přijatelný kation.

Ve zvláště výhodném provedení diester podle vynálezu znamená sloučeninu obecného vzorce I, v němž R je vybrána ze skupiny sestávající z C_2H_5 , C_3H_7 , $\text{iso-C}_3\text{H}_7$, C_4H_9 , C_7H_{15} , C_8H_{17} , $\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$, $\text{CH}_3\text{OCH}_2\text{CH}_2$, $\text{C}_2\text{H}_5\text{OCH}_2\text{CH}_2$, $\text{C}_3\text{H}_7\text{OCH}_2\text{CH}_2$, $\text{C}_4\text{H}_9\text{OCH}_2\text{CH}_2$, $\text{C}_7\text{H}_{15}\text{OCH}_2\text{CH}_2$, $\text{C}_8\text{H}_{17}\text{OCH}_2\text{CH}_2$, $\text{C}_{10}\text{H}_{21}\text{OCH}_2\text{CH}_2$, $\text{C}_{16}\text{H}_{23}\text{OCH}_2\text{CH}_2$, $\text{C}_{18}\text{H}_{37}\text{OCH}_2\text{CH}_2$, $\text{CH}_3(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_2$, $\text{C}_2\text{H}_5\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2)_2$, $\text{C}_4\text{H}_9(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_2$, $\text{C}_6\text{H}_{13}(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_2$, $\text{C}_7\text{H}_{15}(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_2$, $\text{C}_8\text{H}_{17}(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_2$, $\text{C}_{10}\text{H}_{21}(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_2$, $\text{CH}_3(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_3$, $(\text{CH}_3)_2\text{NCH}_2\text{CH}_2$ a $\text{C}_7\text{H}_{15}(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_3$.

Výhodněji je R vybrána ze skupiny sestávající z C_2H_5 , C_3H_7 , C_4H_9 , C_7H_{15} , C_8H_{17} , $C_8H_{17}OCH_2CH_2$, $C_{10}H_{21}OCH_2CH_2$, $C_{16}H_{23}OCH_2CH_2$, $C_{18}H_{37}OCH_2CH_2$, $C_8H_{17}(OCH_2CH_2)_2$ a $C_{10}H_{21}(OCH_2CH_2)_2$.

Nejvýhodněji R znamená skupinu C_8H_{17} nebo $C_8H_{17}OCH_2CH_2$.

V jiném výhodném provedení prostředky podle vynálezu obsahují konjugát farmaceuticky přijatelného chelatačního činidla dvojmocných iontů kovů a monoalkyl nebo monoalkyletheru ethylenglykolů. Mezi běžně výhodné ethylenglykoly patří mono-, di- a tri-ethylenglykoly. Je také možné použít tetra-, penta- nebo hexa-ethylenglykoly, ale tyto sloučeniny by vyžadovaly zvláštní reakční podmínky vzhledem k jejich hydrokopickým vlastnostem.

Nečekaně bylo zjištěno, že diestery 1,2-bis(2-aminofenoxy)ethan-N,N,N',N'-tetraoctové kyseliny (zde dále označované jako BAPTA-diester nebo DP-BAPTA) mají velmi zlepšené terapeutické aplikace při srovnání s jinými deriváty tohoto chelatačního činidla vápníku.

Je jasné, že lipofilnost nových BAPTA-diesterů je větší než rodičovských sloučenin. Jejich zvýšená aktivita může existovat díky skutečnosti, že se udržují v plasmě membrány buněk nebo v jiných buněčných membránových složkách nebo v jejich blízkosti a že tedy vykazují zvýšenou kapacitu upravovat buněčné funkce. Je možné, že tyto diestery chelatačních činidel jsou zacíleny do blízkosti buněčné membrány. Bez ohledu na přesný mechanismus působení je popsáno, že tyto diestery mají zvýšený terapeutický profil.

Podle předloženého vynálezu je ukázáno, že lipofilní povaha diesterů závisí na zbytcích připojených ke karboxylovým skupinám molekuly BAPTA stejně jako na protiontech neesterifikovaných karboxylových skupin (označených R a M ve shora uvedeném obecném vzorci I).

Lipofilnost diesterové sloučeniny velice závisí na délce alifatických řetězců v R a dramaticky se zvyšuje, jak se počet atomů uhlíku v R zvyšuje až na 7 atomů. U alifatických řetězců delších než 7 atomů uhlíku je zvýšení na každý atom uhlíku menší. Obecně - mono-, di- nebo tri-ethylenglykoly v poloze R zvyšují lipofilnost sloučeniny. Výběr různých esterifikovaných skupin R může tedy sloužit pro jemné vyladění biologické aktivity navržených sloučenin podle tohoto vynálezu. Výběr protiiontu by také měl být vzat v úvahu u lipofilnosti příslušného diesteru. Například, jak je uvedeno v tabulce 1, bylo pozorováno zvýšenější roztřepání do oktanolu u Ca-soli při srovnání se Na-solemi.

Výběr výhodného alkoholu a protiiontu, který je příslušný, pro jakýkoliv daný prostředek závisí na zamýšleném terapeutickém použití konjugátu a může být optimalizován odborníkem z oblasti techniky v souladu s principy tohoto vynálezu.

Zručný odborník z oblasti techniky si uvědomí, jaký způsob vynálezu lze aplikovat na stavy a onemocnění, která souvisejí s abnormálními hladinami dvojmocných iontů kovů, zvláště vápenatých iontů, takže prostředky podle vynálezu budou obsahovat diester účinné sloučeniny, která je chelatačním činidlem iontů kovů, ale která má optimalizovanou farmakologickou aktivitu.

Mnoho událostí (např. cytotoxické chemikálie, fyzikální stimuly a neúčinná činidla) způsobujících poškození buněčné membrány mohou spustit kaskádu vedoucí nakonec ke stavu, který napodobuje ischemické poškození (Robbins a spol.: *Pathological Basis for Disease* 1984, str. 10, W.B.Saunders Co.). Předložený vynález bude potenciálně použitelný pro chránění buněk za těchto okolností zavedením chelatačního činidla dvojmocných iontů kovů buď intracelulárně, do plasmové membrány nebo do její blízkosti.

Sloučeniny podle vynálezu mohou být užitečné u otevřené chirurgie srdce a při léčení lékařských stavů souvisejících se zvýšenými hladinami iontů dvojmocných

kovů, zvláště vápníku. Mezi tyto stavy mohou patřit, ale bez omezení na ně, mozková a srdeční ischemie, infarkt, infarkt myokardu, epilepsie, chronická neurodegenerativní onemocnění, jako je Alzheimerova choroba, Parkinsonova choroba a akutní zánět, stejně jako onemocnění, která souvisejí s neuronovou a svalovou hyperaktivitou, jako je urinární inkontinence, hypertrofie prostaty, svalové křeče, arteriální hypertenze, astma a syndrom podráždění střev.

V experimentálních modelech poruch souvisejících s abnormálními intracelulárními hladinami vápníku byly testovány různé diestery podle předloženého vynálezu. Mezi tyto experimentální modely patří in vitro a in vivo systémové modely ischemie, srdeční arytmie a epilepsie. Bylo ukázáno, že BAPTA-diestery vykazují významné ochranné aktivity ve všech těchto modelových systémech.

Biologické ochranné účinky testovaných BAPTA-diesterů podle vynálezu byly sledovány, in vitro, monitorováním parametrů buněčné funkce, enzymatických aktivit a přežití po různých poškozeních, jako je glutamátovou toxicitou a anoxií indukovaná smrt neuronových buněk a ouabainem indukovaná toxicita u kardiomyocytů.

Zvířecí modelové systémy celkové ischemie předního mozku indukované u mongolských gerbil a epilepsie indukovaná u krys Wistar představují in vivo modelové systémy.

Bylo ukázáno, že různé diestery BAPTA, syntetizované v naší laboratoři, jsou zvláště účinné jako neuroprotektivní, antiepileptické a kardioprotektivní sloučeniny.

Neuroprotektivní účinky BAPTA-diesterů: BAPTA-diestery podle vynálezu byly ochranou proti glutamátovou toxicitou a anoxií indukované smrti buněk u kultivovaných kortikálních neuronů. Ochranný účinek léčiva byl zřejmý jak tehdy, když DP-BAPTA byl přidán jednu hodinu před, tak až alespoň jednu hodinu po období poškození glutamátem nebo anoxií.

Model ischemie: Celková ischemie předního mozku byla indukována u mongolských gerbil bilaterální celkovou okluzí karotidní arterie. Výsledek poškození mozku byl zřejmý, jak lze posoudit z mikroskopických morfologických dat (histopathologická analýza), změněných buněčných funkcí (NSE enzymatická aktivita) a celkového stavu zvířete (data přežití).

Jak dioktyl-BAPTA (DP-BAPTA-60 tak di(oktyl-ethylenglykol)-BAPTA (DP-BAPTA-99) byly účinné při prevenci neuronového poškození. Testované BAPTA-diesterly zvýšily dobu přežití zvířat 2 až 3krát.

To by mělo být pochopeno tak, že výhodné ochranné účinky BAPTA-diesterů mohou být ukázány na chránění jak fokálních tak celkových ischemických poškození mozku.

Model epilepsie: Epilepsie jsou skupinou poruch, které se vyznačují chronickými, recidivujícími, paroxymálními změnami v neurologické funkci způsobené abnormalitami v elektrické aktivitě mozku. Episody neurologické disfunkce jsou nazývány záchvaty a jsou klasifikovány jako částečné nebo ohniskové záchvaty, celkový záchvat a stav epilepticus. Mezi hlavními příčinami epilepsie u lidí jsou genetická predisposice, trauma hlavy, nádory mozku, cerebrovaskulární příhody a metabolické poruchy.

Epileptické příhody způsobují velkou nepříjemnost a zhoršení každodenního života zasaženého jedinců a v mnoha případech mohou způsobit ohrožení života a smrtelnou hrozbu. V posledních 20 až 30 letech je jako dostupná nejobvykleji používána antiepileptická léčba. Všechny mají svá vlastní omezení související s problémem toxicity. I když se sledují všechna běžně známá antiepileptická léčiva a léčení, včetně chirurgie, neposkytují úplnou prevenci před záchvatem u velkého procenta epileptických pacientů. Problém je zhoršen u pacientů, u kterých se vyvinul status epilepticus, který způsobuje kolem 30 % úmrtnosti. Velmi potřebné je tedy bezpečné a účinné léčivo s minimálními vedlejšími účinky.

Zvířecím modelovým systémem používaným v této studii vyhodnocení ochranných účinků BAPTA-diesterů byla dobře vyvinuta experimentální epilepsie u krys indukovaná pilokarpinem (Turski W.A., E.A.Cavalliero, M.Schwarz, S.J.Czuczwar, Z.Kleinrok a L.Turski: "Limbic seizures produced by pilocarpine in rats: Behavioral Electroencephalographic and Neuropathological Study", *Behavioral Brain Research* **1983**, 9, 315 až 335.).

Di(oktyl)ethylenglykol)-BAPTA (DP-BAPTA-99) byl schopen zabránit celkovým záchvatům a statutu epilepticus u zvířecího modelového systému stejně jako snižovat úmrtnost.

Kardioprotektivní účinky: Ventrikulární fibrilace (VF) je nejnebezpečnější komplikací infarktu myokardu a srdeční chirurgie. Úspěšně se léčí pomocí kardioverter-defibrilátoru. Nicméně během elektrického šoku existuje riziko poškození bypasu a dalších druhů transplantů. Výhodný je tedy farmakologický přístup k řešení tohoto problému VF v oblasti chirurgie srdce. Klinická farmakologie však nemá uspokojivé léčivo pro tento účel, protože většina známých antiarytmických léčiv zvyšuje požadavky na energii defibrilátoru. Farmakologický přístup je výhodný pro léčení funkčního atrio-ventrikulárního bloku související s ischemií.

Bylo ukázáno, že diethyl-BAPTA (DP-BAPTA-23) odstraňuje zpoždění po depolarizaci v kultivovaných kardiomyocytech, které podlehly episodě toxicity ouabainem. Může být tedy užitečný v klinickém použití pro: 1) profylaxi VF nebo ventrikulární tachyarytmie (VT) a 2) léčení změněné vodivosti. Mnoho antiarytmických léčiv bylo úspěšně použito pro shora uvedené účely. Avšak každé z nich má nějaký (nějaké) vedlejší účinek (účinky): proarytmický účinek, hypotenzi, negativní inotropní účinky. Mechanismus působení diesterů BAPTA není v dnešní době znám. Nemá však fenomenologickou analogii s konvenčními antiarytmickými léčivy. Žádné ze známých antifibrilačních léčiv není schopno zlepšit srdeční vodivost. Tyto nevýhody známých antifibrilačních léčiv ukazují na nečekané lékařské použití, které ukazuje

užitečnost diesterů BAPTA jako nové skupiny antifibrilačního léčiva, která mohou být zvláště užitečná v hrudní chirurgii.

Mělo by být oceněno, že diestery BAPTA v několika testovaných modelových systémech vykazovaly terapeutické účinky jak při způsobu léčení tak při prevenci. Mohou být tedy podávány buď před nebo po poškození pro profylaktické a hojivé účely.

BAPTA-diesterová léčiva podle předloženého vynálezu mohou být tedy užitečná při léčení nebo předcházení patologických procesů souvisejících s nadbytkem dvojmocných iontů kovů, zvláště nadbytkem intracelulárních vápenatých iontů. Tyto patologické stavy jsou například ty, které jsou indukovány u traumatických událostí, jako je poškození mozku, infarkt, ischemie a porušení, nebo u chronických onemocnění, jako je epilepsie, Parkinsonova choroba a Alzheimerova choroba. Navíc i další onemocnění zahrnující hyperaktivitu závislou na vápníku nebo iontovou nerovnováhu, jako je akutní zánět, urinární inkontinence, hypertrofie prostaty, svalová křeč, arteriální hypertenze, astma a syndrom podrážděného střeva, mohou mít všechny prospěch z léčení BAPTA-diesterovými léčivy. Tato léčiva se mohou aplikovat také při udržování zachování blízko normální iontové homeostáze během plánovaných operací, jako je chirurgie otevřeného srdce nebo bypass.

Farmaceutické prostředky, obsahující jako účinnou složku diestery chelatačních činidel, budou obsahovat také jakákoliv farmaceuticky přijatelná ředidla nebo nosiče známé v oblasti techniky. Tyto prostředky mohou být formulovány jako jakýkoliv vhodný prostředek, mezi něž patří, ale bez omezení na ně, roztoky, suspenze, aerosoly, micely, emulze, mikroemulze, tablety a podobné, jak bude požadováno pro příslušnou cestu podávání.

V tomto vynálezu je zahrnuta jakákoliv výhodná cesta podávání, ale bez omezení na ně, mezi které patří orální, intravenózní, intramuskulární, subkutánní, inhalační, intranazální, rektální nebo jiné známé způsoby. Ve výhodných provedeních

se farmaceutické prostředky podle vynálezu podávají intravenózně, orálně nebo intramuskulárně. Dávková rozmezí pro podávání prostředků podle předloženého vynálezu jsou dostatečně velká, aby poskytovala žádaný ochranný účinek. Podávaná dávka bude záviset na věku, pohlaví, zdraví, hmotnosti příjemce, typu současného léčení, pokud nějaké existuje, na frekvenci léčení a na povaze žádaného účinku. Režim dávkování a prostředky podávání budou stanoveny ošetřujícím lékařem nebo jinou zručnou osobou z oblasti techniky.

Bylo ukázáno, že BAPTA-AM, což je známá sloučenina, má účinnou ochrannou aktivitu na buňky u různých patologických procesů, u nichž existují zvýšené hladiny vápníku (Tymianski a spol.: *Neuron* **1993**, *11*, 221 až 235; Tymianski a spol.: *J. Cerebral Blood Flow Metabolism* **1994**, *14*, 911 až 923; Abdel-Hamid a Tymianski: *J. Neuroscience* *17*, 3538 až 3555.). Neregulované zasahování do homeostáze vápníku však způsobuje významné bezpečnostní problémy a zřetelně omezuje potenciál klinických aplikací. Nové diestery, které jsou zde popsány, jsou ve svém působení selektivnější v tom, že se zdá, že neovlivňují intracelulární vápníkovou homeostázi a jsou tedy bezpečnější než dříve známé deriváty BAPTA.

Příklady provedení vynálezu

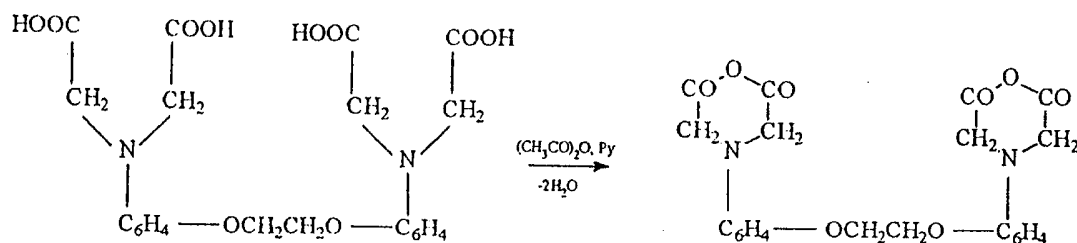
A. Chemické příklady

Příklad 1

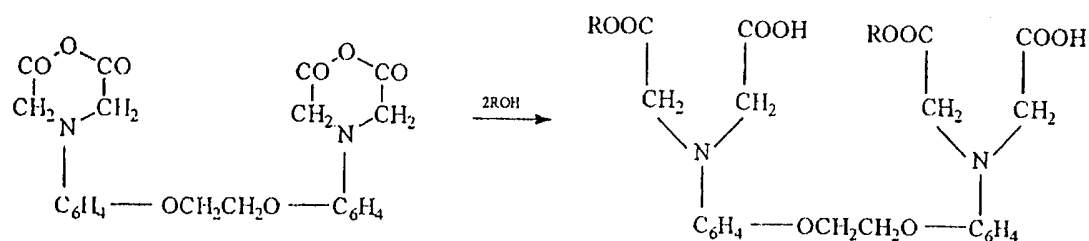
Syntéza diesterů BAPTA alkylu a jejich solí

Syntéza dvojsodných nebo vápenatých solí diesterů 1,2-bis(2-aminofenoxy)-ethan-N,N,N',N'-tetraoctové kyseliny (BAPTA) se provádí ve třech stupních podle následujícího postupu:

Stupeň 1: Příprava anhydridu BAPTA



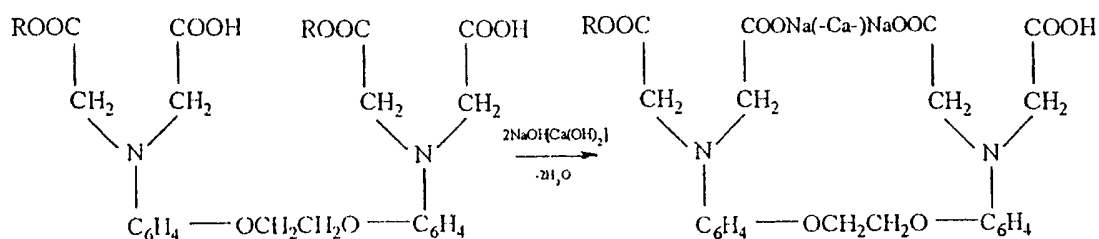
Stupeň 2: Příprava diesteru BAPTA



$R = C_nH_{2n+1}$ ($n=2-8$), $C_nH_{2n+1}(OCH_2CH_2)_m$ ($n=1-7$, $m=1-3$), $(C_nH_{2n+1})_2N(CH_2)_m$ ($n=1-6$, $m=1-6$), $ArCH_2$

Podle dalších výhodných provedení může R znamenat také skupinu C_nH_{2n+1} , kde n znamená číslo 1 až 10, a $C_nH_{2n+1}(OCH_2CH_2)_m$, kde n znamená číslo 1 až 20 a m znamená číslo 1 až 6.

Stupeň 3: Příprava dvojsodné nebo vápenaté soli diesteru BAPTA



Stupeň 1: Příprava anhydridu BAPTA

BAPTA (24 g, 0,05 molu), pyridin (8 g, 0,1 molu) a anhydrid kyseliny octové (95 ml, 1,0 molu) se vloží do jednohrdlé baňky s kulatým dnem (500 ml) se zpětným chladičem (chlazení vodou) a magnetickým míchadlem. Reakční směs se zahřívá 5 hodin na 90 °C za intenzivního míchání magnetickým míchadlem. Teplota se pak sníží na 50 °C a v zahřívání se pokračuje dalších 10 hodin za této teploty. Na konci této 10-hodinové doby se reakční směs ochladí na teplotu místnosti a sraženina se extrahuje filtrací. Sraženina se pak čtyřikrát promyje ethylacetátem (po 50 ml) a dvakrát (po 60 ml) etherem. Sraženina se suší ve vakuu 6 až 8 hodin při 50 °C. Produktem je BAPTA-anhydrid. Výtěžek 80 % hmotn. (17,6 g) bílé pevné látky s t.t. 148 až 149 °C. Analýza: TLC. Sloučenina se během analýzy rozkládá. ¹H NMR spektrum (C₆D₅NO₂, δ, ppm): 4,40 (s, 8H), 4,47 (s, 4H) a 6,85 až 7,01 (m, 8H). IČ spektrum: 1762,9 (s) a 1820,7 cm⁻¹ (s). Pro C₂₂H₂₀O₈N₂ vypočteno: 60,00 % C, 4,54 % H, 6,36 % N, nalezeno: 59,60 % C, 4,66 % H, 6,20 % N.

Stupeň 2: Příprava alkyl nebo aryldiesteru BAPTA

BAPTA anhydrid ze stupně 1 (10 g, 0,023 molu) a odpovídající množství absolutního alkoholu (300 ml) se zavede pod atmosférou argonu do jednohrdlé baňky s kulatým dnem, která má zpětný chladič a magnetické míchadlo. Tato směs se zahřívá na olejové lázni na 90 °C (u methyl a ethylesterů na 70 °C) za intenzivního míchání. Po šesti hodinách se z reakční směsi oddestiluje polovina alkoholu (vysokomolekulární alkoholy se destilují ve vakuu). Získaná směs se ochladí na 0 °C a udržuje se na této teplotě 5 až 8 hodin. Sraženina se od roztoku oddělí filtrací (skleněný filtr N4) ve vakuu a promyje se 3 až 4-krát 40 ml ethanolu, následuje trojí promytí (po 100 ml) ethylacetátem a nakonec trojí promytí diethyletherem (po 150 ml). Produkt se suší ve vakuu 8 hodin.

Chemické/fyzikální specifikace syntetizovaných diesterů BAPTA jsou uvedeny níže.

Ethyldiester BAPTA: výtěžek 90 % (11 g). Bílý prášek. T.t. 161 až 162 °C. TLC analýza. Hliníkové desky se silikagelem 60. Eluce směsí chloroformu s methanolem a vodou (80:20:1,5, obj. díly). Pro detekci se chromatogram postříká indikátorovým sprejem a potom se zahřeje na 350 až 400 °C. Indikátorový sprej obsahuje 4-methoxybenzaldehyd (10 ml), ethanol (200 ml), 98% (hmotn.) kyselinu sírovou (10 ml) a ledovou kyselinu octovou (2 ml). Jedna skvma. R_f 0,3. ^1H NMR spektrum (CD_3OD , δ , ppm): 1,05 až 1,11 (t, 6H), 3,91 až 4,00 (dd, 4H), 4,05 (s, 4H), 4,14 (s, 4H), 4,27 (s, 4H) a 6,83 až 6,96 (m, 8H). Pro $\text{C}_{26}\text{H}_{32}\text{O}_{10}\text{N}_2$ vypočteno: 58,64 % C, 6,03 % H, 5,26 % N, nalezeno: 58,00 % C, 6,00 % H, 5,09 % N.

Propyldiester BAPTA: výtěžek 90 % (11,5 g). Bílý prášek. T.t. 187 °C. TLC analýza. Podmínky pro analýzu diethyl a dipropylesterů BAPTA jsou podobné. Jedna skvma. R_f 0,35. ^1H NMR spektrum [$(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, δ , ppm]: 0,71 až 0,77 (t, 6H), 1,38 až 1,47 (m, 4H), 3,80 až 3,85 (t, 4H), 4,00 (s, 4H), 4,13 (s, 4H), 4,20 (s, 4H) a 6,70 až 6,96 (m, 8H). Pro $\text{C}_{28}\text{H}_{36}\text{O}_{10}\text{N}_2$ vypočteno: 60,00 % C, 6,43 % H, 5,00 % N, nalezeno: 60,25 % C, 6,77 % H, 5,08 % N.

Isopropyldiester BAPTA: výtěžek 80 % (10,2 g). Bílý prášek. T.t. 181 až 182 °C. TLC analýza. Hliníkové desky se silikagelem 60 F_{254} . Eluce směsí chloroformu s methanolem (65:30, obj. díly). Pro detekci se chromatogram postříká indikátorovým sprejem a potom se pyrolyzuje na 350 až 400 °C. Indikátorový sprej obsahuje 4-methoxybenzaldehyd (10 ml), ethanol (200 ml), 98% (hmotn.) kyselinu sírovou (10 ml) a ledovou kyselinu octovou (2 ml). Jedna skvma. R_f 0,72. ^1H NMR spektrum [$(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, δ , ppm]: 1,07 až 1,09 (t, 12H), 4,00 (s, 4H), 4,08 (s, 4H), 4,22 (s, 4H), 4,78 až 4,85 (m, 2H) a 6,71 až 6,98 (m, 8H). Pro $\text{C}_{28}\text{H}_{36}\text{O}_{10}\text{N}_2$ vypočteno: 60,00 % C, 6,43 % H, 5,00 % N, nalezeno: 59,78 % C, 6,50 % H, 5,00 % N.

Butyldiester BAPTA: výtěžek 90 % (12,1 g). Bílý prášek. T.t. 183 °C. TLC analýza. Podmínky pro analýzu diethyl a dibutylesterů BAPTA jsou podobné. Jedna skvma. R_f 0,42. ^1H NMR spektrum [$(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, δ , ppm]: 0,74 až 0,80 (t, 6H), 1,09 až 1,18 (m, 4H),

1,33 až 1,39 (m, 4H), 3,80 až 3,86 (t, 4H), 3,98 (s, 4H), 4,10 (s, 4H), 4,17 (s, 4H) a 6,69 až 6,92 (m, 8H). Pro $C_{30}H_{40}O_{10}N_2$ vypočteno: 61,22 % C, 6,80 % H, 4,76 % N, nalezeno: 61,54 % C, 7,10 % H, 5,03 % N.

Heptyldiester BAPTA: výtěžek 70 % (10,8 g). Bílý prášek. T.t. 146 až 147 °C. TLC analýza. Podmínky pro analýzu ethyl a heptyldiesterů BAPTA jsou podobné. Jedna skvma. R_f 0,50. 1H NMR spektrum $[(CD_3)_2SO, \delta, ppm]$: 0,79 až 0,84 (t, 6H), 1,08 až 1,17 (široký s, 16H), 1,34 až 1,43 (m, 4H), 3,97 až 3,87 (t, 4H), 3,98 (s, 4H), 4,13 (s, 4H), 4,17 (s, 4H) a 6,67 až 6,92 (m, 8H). Pro $C_{36}H_{52}O_{10}N_2$ vypočteno: 64,29 % C, 7,74 % H, 4,16 % N, nalezeno: 64,37 % C, 7,82 % H, 3,88 % N.

Oktyldiester BAPTA: výtěžek 70 % (11,3 g). Bílý prášek. T.t. 155 °C. TLC analýza. Podmínky analýzy diethyl a dioktylesterů BAPTA jsou podobné. Jedna skvma. R_f 0,55. 1H NMR spektrum $[(CD_3)_2SO, \delta, ppm]$: 0,81 až 0,86 (t, 6H), 1,19 až 1,23 (široký s, 20H), 1,29 až 1,34 (m, 4H), 3,83 až 3,87 (m, 4H), 3,98 (s, 4H), 4,11 (s, 4H), 4,19 (s, 4H) a 6,80 až 6,84 (m, 8H). Pro $C_{38}H_{56}O_{10}N_2$ vypočteno: 65,14 % C, 8,00 % H, 4,00 % N, nalezeno: 64,91 % C, 8,20 % H, 3,76 % N.

Benzylidiester BAPTA: výtěžek 70 % (10,6 g). Bílý prášek. T.t. 161 až 163 °C. TLC analýza. Podmínky pro analýzu ethyl a benzylidiesterů BAPTA jsou podobné. Jedna skvma. R_f 0,64 (benzylidiester byl na TLC desku nanesen v roztoku dimethylformamidu). 1H NMR spektrum $[(CD_3)_2SO, \delta, ppm]$: 4,02 (s, 4H), 4,18 až 4,19 (d, 8H), 4,97 (s, 4H), 6,73 až 6,94 (m, 8H) a 7,22 až 7,32 (m, 10H). Pro $C_{36}H_{36}O_{10}N_2$ vypočteno: 65,85 % C, 5,49 % H, 4,27 % N, nalezeno: 65,56 % C, 5,83 % H, 4,12 % N.

2-(Dimethylamino)ethylidiester BAPTA: výtěžek 70 % (9,95 g). Bílý prášek. T.t. 126 až 127 °C. TLC analýza. Hliníkové desky se silikagelem 60 F₂₅₄. Eluce směsí chloroformu s methanolem a vodou (60:40:2, obj. díly). Jedna skvma. R_f 0,2. 1H NMR spektrum $(CDCl_3, \delta, ppm)$: 2,57 (s, 12H), 2,60 až 2,63 (t, 4H), 3,60 (s, 4H), 3,75 až 3,78 (t, 4H), 4,06 (s, 4H), 0,11 (s, 4H) a 6,68 až 6,85 (m, 8H). Pro $C_{30}H_{42}O_{10}N_2$ vypočteno: 58,25 % C, 6,80 % H, 9,06 % N, nalezeno: 57,94 % C, 6,90 % H, 8,97 % N.

Stupeň 3a: Příprava sodných solí diesterů BAPTA

Odpovídající alkyldiester BAPTA (0,019 molu) se dá do Erlenmeyerovy baňky (500ml), která obsahuje magnetické míchadlo. K esteru se přidá 250 ml směsi methanolu s vodou (obj. díly, 1:1). Tato směs se intenzivně míchá, protože ester není v roztoku rozpuštěn. K míchané směsi se přidá koncentrovaný roztok hydrogen-uhličitanu sodného (0,038 molu, 3,19 g) nebo koncentrovaný roztok methoxidu sodného (0,038 molu) ve vodě. Po 5 až 8 hodinách směs zprůhlední. To ukazuje, že alkyldiester je převeden na dvojsodnou sůl. Methanol a voda se odpaří ve vakuu. Získaná sůl se vysuší azeotropickou destilací s ethanolem a diethyletherem. Nakonec se sůl suší ve vakuu (667 až 800 Pa) 8 hodin.

Dvojsodná sůl ethyldiesteru BAPTA: bílý prášek, výtěžek 95 % (hmotn.) (10,4 g). Pro $C_{26}H_{30}O_{10}N_2Na_2$ vypočteno: 54,16 % C, 5,21 % H, 4,86 % N a 7,98 % Na, nalezeno: 54,10 % C, 5,27 % H, 4,65 % N a 8,10 % Na.

Dvojsodná sůl propyldiesteru BAPTA: bílý prášek, výtěžek 95 % (hmotn.) (10,9 g). Pro $C_{28}H_{36}O_{10}N_2Na_2$ vypočteno: 55,63 % C, 5,63 % H, 4,63 % N a 7,61 % Na, nalezeno: 54,76 % C, 6,13 % H, 4,46 % N a 6,73 % Na.

Dvojsodná sůl butyldiesteru BAPTA: bílý prášek, výtěžek 95 % (hmotn.) (11,2 g). Pro $C_{30}H_{38}O_{10}N_2Na_2$ vypočteno: 56,96 % C, 6,01 % H, 4,43 % N a 7,28 % Na, nalezeno: 56,50 % C, 6,00 % H, 4,20 % N a 7,30 % Na.

Dvojsodná sůl heptyldiesteru BAPTA: bílý prášek, výtěžek 90 % (hmotn.) (10,3 g). Pro $C_{36}H_{50}O_{10}N_2Na_2$ vypočteno: 60,33 % C, 6,98 % H, 3,91 % N a 6,42 % Na, nalezeno: 59,88 % C, 7,49 % H, 4,12 % N a 6,76 % Na.

Dvojsodná sůl oktyldiesteru BAPTA: bílý prášek, výtěžek 90 % (hmotn.) (15,7 g). Pro $C_{38}H_{54}O_{10}N_2Na_2$ vypočteno: 61,29 % C, 7,26 % H, 3,76 % N a 6,16 % Na, nalezeno: 60,90 % C, 7,81 % H, 3,26 % N a 6,52 % Na.

Stupeň 3b: Příprava vápenatých solí diesterů BAPTA

Odpovídající diester BAPTA (1 g) se rozpustí v 1 litru směsi ethanolu s vodou (70:30, obj. díly). K tomuto roztoku se přidá molární ekvivalent hydroxidu vápenatého. Získaná směs se míchá magnetickým míchadlem 24 hodin za teploty místnosti. Potom se u solí ethyl-, propyl a butyldiesterů BAPTA roztok zfiltruje papírem Whatmann N1 a odpaří se ve vakuu (2,67 až 4,00 kPa) dosucha. Sraženina se promyje třikrát diethyletherem (po 100 ml) a suší se ve vakuu (267 až 400 Pa) 6 hodin za teploty místnosti.

U vápenatých solí heptyl a oktyldiesterů BAPTA se ethanolový roztok odpaří dosucha. Sraženina se rozpustí v 0,8 litrech ethanolu. Získaná směs se zfiltruje papírem Whatmann N1 a potom se ethanol odpaří ve vakuu (2,67 až 3,33 kPa). Sraženina se promyje třikrát diethyletherem (po 100 ml) a suší se ve vakuu (267 až 400 Pa) 6 hodin za teploty místnosti.

Vápenatá sůl ethyldiesteru BAPTA: bílý prášek, výtěžek 90 % (hmotn.) (0,96 g). Pro $C_{26}H_{30}O_{10}N_2Ca$ vypočteno: 54,70 % C, 5,26 % H, 4,91 % N a 7,01 % Ca, nalezeno: 54,32 % C, 5,40 % H, 4,81 % N a 6,81 % Ca.

Vápenatá sůl propyldiesteru BAPTA: bílý prášek, výtěžek 90 % (hmotn.) (0,98 g). Pro $C_{28}H_{34}O_{10}N_2Ca$ vypočteno: 56,19 % C, 5,68 % H, 4,68 % N a 6,69 % Ca, nalezeno: 56,22 % C, 5,88 % H, 4,51 % N a 6,51 % Ca.

Vápenatá sůl butyldiesteru BAPTA: bílý prášek, výtěžek 90 % (hmotn.) (0,90 g). Pro $C_{30}H_{38}O_{10}N_2Ca$ vypočteno: 57,50 % C, 6,07 % H, 4,47 % N a 6,39 % Ca, nalezeno: 57,18 % C, 6,24 % H, 4,28 % N a 6,11 % Ca.

Vápenatá sůl heptyldiesteru BAPTA: bílý prášek, výtěžek 80 % (hmotn.) (0,85 g). Pro $C_{36}H_{50}O_{10}N_2Ca$ vypočteno: 61,71 % C, 7,14 % H, 4,00 % N a 5,71 % Ca, nalezeno: 61,44 % C, 7,24 % H, 4,18 % N a 6,31 % Ca.

Vápenatá sůl oktyldiesteru BAPTA: bílý prášek, výtěžek 80 % (hmotn.) (0,83 g). Pro $C_{38}H_{54}O_{10}N_2Ca$ vypočteno: 61,79 % C, 7,32 % H, 3,79 % N a 5,42 % Ca, nalezeno: 61,94 % C, 7,14 % H, 4,00 % N a 5,31 % Ca.

Příklad 2

Syntéza BAPTA diesterů alkyletheru mono-, di- a triethylenglykolu a jejich solí

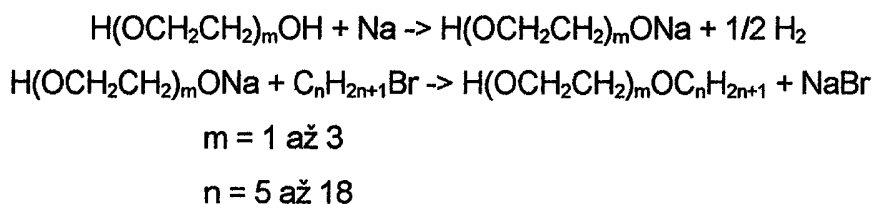
Postup syntézy těchto solí je čtyřstupňový způsob podobný způsobu přípravy solí alkyldiesterů BAPTA.

Stupeň 1: Příprava anhydridu BAPTA

První stupeň přípravy anhydridu BAPTA je identický se stupněm 1 způsobu syntézy alkyldiesterů BAPTA, jak je shora popsán v příkladu 1.

Stupeň 2: Syntéza monoalkyletherů mono-, di- a triethylenglykolu

Syntézy monoalkyletherů mono-, di- a triethylenglykolu se provádějí podle následujícího schematu



0,8 až 0,9 sodíku (nařezaný na malé kousky o průměru 5 až 8 mm) se vloží pod atmosférou argonu do dvojhrdlé baňky s kulatým dnem (250 ml), která nese zpětný chladič a má magnetické míchadlo. K sodíku se také pod argonem přidá ethylenglykol (35 ml, 0,62 molu) a baňka se zahřívá na olejové lázni na 70 °C za intenzivního míchání. Když se většina sodíku rozpustí, kousek po kousku se do reakční směsi přidá zbytek sodíku (typickým množstvím sodíku je 3,9 g, 0,17 molu). Je třeba poznamenat, že rozpouštění sodíku je doprovázeno zvýšením teploty reakční směsi spolu se zvýšením reakční rychlosti. Aby se zabránilo explozi, je nutné přidávat sodík pomalu tak, aby reakce byla dobře kontrolována. Po tom, co se sodík rozpustí, se k reakční baňce připojí kapačka s roztokem odpovídajícího alkylbromidu (21,5 g, 0,12 molu) v tetrahydrofuranu (60 ml). Roztok z kapačky se přikapává do reakční baňky. Teplota reakční směsi se udržuje na 70 °C. Téměř najednou se objeví sraženina bromidu sodného. Jeho množství se během reakce zvyšuje. Po 16 hodinách se reakční směs ochladí na teplotu místnosti a k organickému roztoku se přidá 150 ml vody. Produkt se extrahuje dvěma podíly (po 40 ml) ethylacetátu. Spojený ethylacetátový roztok se promyje vodou a vysuší se síranem sodným. Žlutý roztok produktu v ethylacetátu se odbarví zahřátím s aktivním uhlím. Bezbarvý roztok se od uhlí oddělí odfiltrováním a roztok se odpaří. Získaný produkt se předestiluje ve vakuu a analyzuje se na jeho fyzikální a chemické vlastnosti.

Monoheptylether ethylenglykolu: bezbarvá kapalina, t.v. 95 °C/133 Pa. Výtěžek 70 % (hmotn.)(13,4 g). TLC analýza. Hliníkové desky se silikagelem 60 F₂₅₄. Eluce směsí ethylacetátu s hexanem (2:1, obj. díly). Indikátor: 4-methoxybenzaldehyd (10 ml), ethanol (200 ml), 98% (hmotn.) kyselina sírová (10 ml) a ledová kyselina octová (2 ml). Pro detekci se chromatogram postříká indikátorem a potom se zahřeje na 350 °C. Jedna skvrna. R_f 0,8. ¹H NMR spektrum (CDCl₃, δ, ppm): 0,84 až 0,90 (t, 3H), 1,27 až 1,33 (široký s, 8H), 1,55 až 1,61 (m, 2H), 2,25 až 2,30 (t, 1H, signál OH-skupiny, jeho poloha je proměnlivá), 3,43 až 3,54 (m, 4H), 3,69 až 3,75 (m, 2H).

Heptylether diethylenglykolu: bezbarvá kapalina, t.v. 100 °C/133 Pa. Výtěžek 70 % (hmotn.) (17,1 g). TLC analýza. Podmínky analýzy heptyletheru mono- a diethylen-

glykolu jsou analogické. Jedna skvma. R_f 0,4. ^1H NMR spektrum (CDCl_3 , δ , ppm): 0,84 až 0,90 (t, 3H), 1,27 až 1,32 (široký s, 8H), 1,55 až 1,61 (m, 2H), 2,71 (t, 1H, signál OH-skupiny), 3,45 až 3,48 (t, 2H), 3,58 až 3,75 (m, 8H).

Heptylether triethylenglykolu: bezbarvá kapalina, t.v. $107^\circ\text{C}/133\text{ Pa}$. Výtěžek 70 % (hmotn.) (20,8 g). TLC analýza. Podmínky analýzy monoheptyletheru mono- a triethylenglykolu jsou analogické. Jedna skvma. R_f 0,3. ^1H NMR spektrum (CDCl_3 , δ , ppm): 0,84 až 0,90 (t, 3H), 1,26 až 1,29 (široký s, 8H), 1,54 až 1,57 (m, 2H), 2,72 (t, 1H, signál OH-skupiny), 3,41 až 3,47 (t, 2H), 3,58 až 3,74 (m, 12H).

Oktylether monoethylenglykolu: bezbarvá kapalina, t.v. $60^\circ\text{C}/67\text{ Pa}$. Výtěžek 85 % (hmotn.). TLC analýza. Podmínky analýzy dioktyletheru ethylenglykolu jsou stejné jak shora uvedeno. Jedna skvma. R_f 0,7. ^1H NMR spektrum (CDCl_3 , δ , ppm): 0,83 až 0,89 (t, 3H), 1,25 až 1,27 (široký s, 10H), 1,54 až 1,57 (m, 2H), 2,39 (t, 1H), 3,41 až 3,52 (m, 4H), 3,67 až 3,73 (m, 4H).

Stupeň 3: Syntéza BAPTA diesterů monoalkyletherů mono-, di- a triethylenglykolu

BAPTA anhydrid ze stupně 1 (1,5 g, 0,0034 molu) a odpovídající monoalkylether mono-, di- nebo triethylenglykolu ze stupně 2 (10 až 12 ml) se vloží pod atmosférou argonu do jednohrdlé baňky s kulatým dnem (50 ml), která má zpětný chladič a magnetické míchadlo. Tato směs se zahřívá na olejové lázni na 115 až 120°C za intenzivního míchání. Po 1 až 1,5 hodiny směs zprůhlední. V zahřívání se pokračuje dalších 1,5 hodiny, dokud reakce není ukončena. Baňka se pak ochladí na teplotu místnosti a přidá se 100 ml petroletheru (t.v. 60 až 80°C). Vytvořená sraženina se extrahuje odstředováním a promyje se třikrát petroletherem (po 40 ml). Pevný produkt se suší ve vakuu 5 hodin a analyzuje se, aby se ověřily vlastnosti produktu, které jsou uvedeny v příkladech následujících sloučenin.

BAPTA diester methylethylenglykolu: Bílá pevná látka, t.t. 151 až 152°C . Výtěžek 90 % (hmotn.) (1,81 g). TLC analýza. Hliníkové desky se silikagelem 60 F_{254} . Eluce

směsí chloroformu s methanolem (1:1, obj. díly). Pro vyvinutí se chromatogram postříká indikátorem a potom se pyrolyzuje na 100 až 150 °C. Složení indikátorového spreje: 4-methoxybenzaldehyd (10 ml), ethanol (200 ml), 98% (hmotn.) kyselina sírová (10 ml) a ledová kyselina octová (2 ml). Jedna skvma. R_f 0,14. ^1H NMR spektrum (CD_3OD , δ , ppm): 3,33 (s, 6H), 3,47 až 3,51 (t, 4H), 3,66 (s, 4H), 3,85 (s, 4H), 4,02 až 4,06 (t, 4H), 4,35 (s, 4H), 7,02 až 7,11 (m, 8H). Pro $\text{C}_{28}\text{H}_{36}\text{O}_{12}\text{N}_2$ vypočteno: 56,76 % C, 6,08 % H a 4,73 % N, nalezeno: 56,38 % C, 6,39 % H a 4,72 % N.

BAPTA diester heptylethylenglykolu: Bílá pevná látka, t.t. 111 až 112 °C. Výtěžek 90 % (hmotn.) (2,32 g). TLC analýza. Podmínky TLC analýzy BAPTA diesteru methylethylenglykolu a BAPTA diesteru heptylethylenglykolu jsou stejné. Jedna skvma. R_f 0,4. ^1H NMR spektrum [$(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, δ , ppm]: 0,81 až 0,86 (t, 6H), 1,22 (široký s, 16H), 1,42 (m, 4H), 3,27 až 3,32 (m, 4H), 3,37 až 3,40 (m, 4H), 3,96 až 3,99 (m, 8H), 4,12 (s, 2H), 4,19 (s, 2H), 6,73 až 6,92 (m, 8H). Pro $\text{C}_{40}\text{H}_{60}\text{O}_{12}\text{N}_2$ vypočteno: 63,16 % C, 7,90 % H a 3,68 % N, nalezeno: 63,30 % C, 8,44 % H a 3,76 % N.

BAPTA diester oktylethylenglykolu: Bílá pevná látka, t.t. 121 až 122 °C. Výtěžek 80 % (hmotn.) (1,4 g). TLC analýza. Hliníkové desky se silikagelem 60. Eluce směsí chloroformu s methanolem (1:1, obj. díly). Pro vyvinutí se chromatogram postříká indikátorem a potom se pyrolyzuje na 100 až 150 °C. Složení indikátorového spreje: 4-methoxybenzaldehyd (10 ml), ethanol (200 ml), 98% (hmotn.) kyselina sírová (10 ml) a ledová kyselina octová (2 ml). Jedna skvma. R_f 0,45. ^1H NMR spektrum (CDCl_3 , δ , ppm): 0,84 až 0,89 (t, 6H), 1,26 (široký s, 20H), 1,51 až 1,57 (m, 4H), 3,37 až 3,42 (t, 4H), 3,53 až 3,56 (m, 4H), 3,96 (s, 4H), 4,03 (s, 4H), 4,17 až 4,21 (m, 4H), 4,37 (s, 4H), 6,87 až 6,94 (m, 4H), 7,03 až 7,09 (m, 4H). Pro $\text{C}_{42}\text{H}_{64}\text{O}_{12}\text{N}_2$ vypočteno: 63,96 % C, 8,12 % H a 3,55 % N, nalezeno: 63,57 % C, 8,11 % H a 3,53 % N.

BAPTA diester heptyldiethylenglykolu: Bílá pevná látka, t.t. 95 až 96 °C. Výtěžek 85 % (hmotn.) (2,5 g). TLC analýza. Podmínky analýzy BAPTA diesteru methylethylenglykolu a BAPTA diesteru heptyldiethylenglykolu jsou stejné. Jedna skvma. R_f 0,40. ^1H NMR spektrum [$(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, δ , ppm]: 0,81 až 0,86 (t, 6H), 1,23 (široký s, 16H), 1,45

(m, 4H), 3,30 až 3,35 (m, 8H), 3,40 až 3,46 (m, 12H), 3,97 až 3,99 (m, 8H), 4,13 (s, 4H), 4,19 (s, 4H), 6,74 až 6,92 (m, 8H), 12,37 (s, 2H). Pro $C_{44}H_{68}O_{14}N_2$ vypočteno: 62,26 % C, 8,02 % H a 3,30 % N, nalezeno: 6,47 % C, 8,42 % H a 3,40 % N.

BAPTA diester heptyltriethylenglykolu: Bílá pevná látka, t.t. 63 až 65 °C. Výtěžek 85 % (hmotn.) (2,7 g). TLC analýza. Podmínky analýzy BAPTA diesteru heptyltriethylenglykolu a BAPTA diesteru methylethylenglykolu jsou stejné. Jedna skvrna. R_f 0,40. 1H NMR spektrum $[(CD_3)_2SO, \delta, ppm]$: 0,81 až 0,87 (t, 6H), 1,23 (široký s, 16H), 1,45 (m, 4H), 3,31 až 3,36 (m, 4H), 3,42 až 3,48 (m, 20H), 3,97 až 3,99 (m, 8H), 4,13 (s, 4H), 4,19 (s, 4H), 6,74 až 6,92 (m, 8H), 12,38 (s, 2H).

Stupeň 4a: Příprava dvojsodné soli BAPTA diesterů monoalkyletherů mono-, di- nebo triethylenglykolu

Odpovídající BAPTA diester monoalkylether mono-, di- nebo triethylenglykolu (0,0025 molu) se rozpustí v methanolu (pro rozpuštění 1,0 g BAPTA diesteru je třeba kolem 10 ml alkoholu) a získaný roztok se dá do Erlenmeyerovy baňky (50 ml), která má magnetické míchadlo. K methanolickému roztoku BAPTA diesteru se přidá vodný roztok hydrogenuhličitanu sodného (0,005 molu ve 2 ml) a směs se míchá 2 hodiny za teploty místnosti. Rozpouštědlo se pak ve vakuu odpaří (4 kPa). Získaná sraženina se vysuší třikrát azeotropickou destilací s ethanolem a dvakrát s diethyletherem. Nakonec se získaný produkt promyje hexanem a vysuší se ve vakuu.

Dvojsodná sůl BAPTA diesteru methylmonoethylenglykolu: bílá pevná látka, hydrokopická, výtěžek 95 % (hmotn.) (1,5 g). Pro $C_{28}H_{34}O_{12}N_2Na_2$ vypočteno: 52,80 % C, 5,35 % H, 4,40 % N a 7,23 % Na, nalezeno: 52,20 % C, 5,59 % H, 4,49 % N a 7,30 % Na.

Dvojsodná sůl BAPTA diesteru heptylmonoethylenglykolu: bílá pevná látka, hydrokopická, výtěžek 95 % (hmotn.) (1,9 g). Pro $C_{40}H_{56}O_{12}N_2Na_2$ vypočteno: 59,70

% C, 7,21 % H, 3,48 % N a 5,72 % Na, nalezeno: 59,60 % C, 7,75 % H, 3,51 % N a 5,51 % Na.

Dvojsodná sůl BAPTA diesteru heptyldiethylenglykolu: bílá pevná látka, hydro-skopická, výtěžek 95 % (hmotn.) (2,1 g). Pro $C_{44}H_{66}O_{14}N_2Na_2$ vypočteno: 59,19 % C, 7,40 % H, 3,14 % N a 5,16 % Na, nalezeno: 58,55 % C, 7,43 % H, 3,46 % N a 5,49 % Na.

Dvojsodná sůl BAPTA diesteru heptyltriethylenglykolu: bílý vosk, velmi hydrokopický, výtěžek 90 % (hmotn.) (2,2 g). Pro $C_{48}H_{74}O_{16}N_2Na_2$ vypočteno: 58,77 % C, 7,55 % H, 2,86 % N a 4,69 % Na, nalezeno: 57,98 % C, 8,03 % H, 2,94 % N a 4,64 % Na.

Dvojsodná sůl BAPTA diesteru oktylethylenglykolu: bílá pevná látka, výtěžek 80 % (hmotn.). TLC analýza. Hliníkové desky se silikagelem 60. Eluce směsí chloroformu s methanolem (1:1, obj. díly). Pro vyvinutí se chromatogram postříká indikátorem a potom se pyrolyzuje na 100 až 150 °C. Složení indikátorového spreje: 4-methoxy-benzaldehyd (10 ml), ethanol (200 ml), 98% (hmotn.) kyselina sírová (10 ml) a ledová kyselina octová (2 ml). Jedna skvrna. R_f 0,45. 1H NMR spektrum ($CDCl_3$, δ , ppm): 0,84 až 0,89 (t, 6H), 1,26 (široký s, 20H), 1,51 až 1,57 (m, 4H), 3,37 až 3,42 (t, 4H), 3,53 až 3,56 (m, 4H), 3,96 (s, 4H), 4,03 (s, 4H), 4,17 až 4,21 (m, 4H), 4,37 (s, 4H), 6,87 až 6,94 (m, 4H), 7,03 až 7,09 (m, 4H). Pro $C_{42}H_{64}O_{12}N_2$ vypočteno: 63,96 % C, 8,12 % H a 3,55 % N, nalezeno: 63,57 % C, 8,11 % H a 3,53 % N.

Stupeň 4b: Příprava vápenaté soli BAPTA diesterů monoalkyletherů mono-, di- nebo triethylenglykolu

Odpovídající BAPTA diester monoalkylether(mono-, di- nebo tri)ethylenglykolu (0,0025 molu) se rozpustí v methanolu (250 ml). K tomuto roztoku se přidá 3 až 5 ml vody. Získaný roztok se dá do Erlenmeyerovy baňky (300 ml), která má magnetické míchadlo. K tomuto roztoku se za intenzivního míchání přidá prášek hydridu vápenatého (0,0025 molu). Směs se míchá 3 hodiny za teploty místnosti. Po 3 hodinách se

směs zfiltruje papírovým filtrem (Whatman N1) a získaný roztok se ve vakuu odpaří (1,33 až 2,0 kPa). Sraženina se vysuší třikrát azeotropickou destilací s ethanolem (po 25 až 30 ml) a dvakrát s diethyletherem. Nakonec se produkt promyje hexanem a suší se ve vakuu (667 Pa) 5 hodin za teploty místnosti.

Vápenatá sůl BAPTA diesteru methylmonoethylenglykolu: bílý prášek, výtěžek 90 % (hmotn.) (1,42 g). Pro $C_{28}H_{34}O_{12}N_2Ca$ vypočteno: 53,33 % C, 5,40 % H, 4,44 % N a 6,35 % Ca, nalezeno: 53,74 % C, 5,78 % H, 4,43 % N a 5,90 % Ca.

Vápenatá sůl BAPTA diesteru heptylmonoethylenglykolu: bílý prášek, výtěžek 90 % (hmotn.) (1,79 g). Pro $C_{40}H_{58}O_{12}N_2Ca$ vypočteno: 60,15 % C, 7,27 % H, 3,51 % N a 5,01 % Ca, nalezeno: 60,32 % C, 7,63 % H, 3,54 % N a 4,59 % Ca.

Vápenatá sůl BAPTA diesteru oktylmonoethylenglykolu: bílý prášek, výtěžek 90 % (hmotn.) (1,81 g). Pro $C_{42}H_{64}O_{12}N_2Ca$ vypočteno: 61,01 % C, 7,50 % H, 3,38 % N a 4,84 % Ca, nalezeno: 61,00 % C, 7,82 % H, 3,54 % N a 4,88 % Ca.

Vápenatá sůl BAPTA diesteru heptyldiethylenglykolu: bílá pevná látka, výtěžek 80 % (hmotn.) (1,77 g). Pro $C_{44}H_{66}O_{14}N_2Ca$ vypočteno: 59,59 % C, 7,44 % H, 3,16 % N a 4,51 % Ca, nalezeno: 59,61 % C, 7,79 % H, 3,15 % N a 4,04 % Ca.

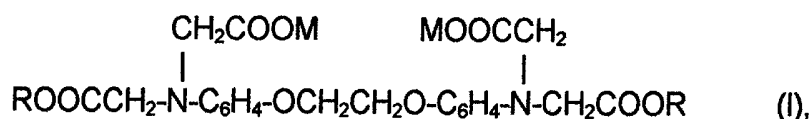
Vápenatá sůl BAPTA diesteru methyltriethylenglykolu: bílá pevná látka, výtěžek 80 % (hmotn.) (1,61 g). Pro $C_{36}H_{50}O_{16}N_2Ca$ vypočteno: 53,60 % C, 6,20 % H, 3,47 % N a 4,96 % Ca, nalezeno: 53,95 % C, 6,33 % H, 3,20 % N a 4,73 % Ca.

Příklad 3

Meření in vitro lipofilnosti BAPTA diesterových solí

Hodnoty lipofilnosti několika BAPTA diesterových solí podle vynálezu byly studovány srovnáváním rozpustnosti těchto sloučenin v organickém versus vodném

rozpouštědle. Jako organický a vodný roztok byl použit oktanol a fyziologický solný roztok. Roztřepávací koeficienty (P_c), tj. distribuční poměr mezi organickou a vodnou fází, byl stanoven pro několik specifických BAPTA diesterových solí obecného vzorce



v němž substituenty na aromatických kruzích jsou v ortho poloze, R znamená skupinu $\text{C}_n\text{H}_{2n+1}$ (n znamená číslo od 2 do 8) nebo $\text{C}_n\text{H}_{2n+1}(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_m$ (m znamená číslo od 1 do 3 a n znamená číslo od 1 do 18) a M znamená sodný nebo vápenatý kation podle toho, jak je uvedeno.

Výsledky, které uvádějí vypočtené $\text{Log } P_c$, jsou uvedeny v tabulce 1.

Tabulka 1

Roztřepávací koeficienty (P_c) BAPTA diesterů mezi oktanol a solný roztok

R v obecném vzorci I	$\text{Log } P_c^{\text{a)}}$	
	M = Na^+	M = Ca^{++}
b)	-3,3 ^{c)}	-1,71 ^{d)}
C_2H_5	-1,61	-1,33
C_3H_7	-0,63	-0,51
C_4H_9	-0,01	0,32
C_7H_{15}	0,82	0,76
C_8H_{17}	0,85	0,79
$\text{CH}_3\text{OCH}_2\text{CH}_2$	-2,27	-1,85

$C_2H_5OCH_2CH_2$	-1,41	-0,99
$C_3H_7OCH_2CH_2$	-0,81	-0,48
$C_4H_9OCH_2CH_2$	-0,06	0,14
$C_7H_{15}OCH_2CH_2$	1,34	1,00
$C_8H_{17}OCH_2CH_2$	0,80	1,10
$C_{10}H_{21}OCH_2CH_2$	1,90	1,50
$C_{16}H_{33}OCH_2CH_2$	1,67	e)
$C_{18}H_{37}OCH_2CH_2$	1,50	e)
$CH_3(OCH_2CH_2)_2$	-1,82	-1,18
$C_2H_5(OCH_2CH_2)_2$	-1,20	-0,73
$C_4H_9(OCH_2CH_2)_2$	-0,29	0,03
$C_6H_{13}(OCH_2CH_2)_2$	0,83	0,95
$C_7H_{15}(OCH_2CH_2)_2$	1,30	0,95
$C_8H_{17}(OCH_2CH_2)_2$	e)	1,20
$C_{10}H_{21}(OCH_2CH_2)_2$	1,25	1,02
$CH_3(OCH_2CH_2)_3$	-1,93	-1,00
$C_7H_{15}(OCH_2CH_2)_3$	e)	e)

a) při 26 °C; b) BAPTA; c) tetrasodná sůl; d) dvojjápenatá sůl;

e) nestanoveno

Je třeba si uvědomit, že většina nových diesterů BAPTA je významně lipofilnější než přírodní BAPTA. Je zajímavé, že roztřepávací koeficienty jsou také ovlivněny výběrem protiiontů. Obecně platí, že vápenaté soli diesterů BAPTA jsou lipofilnější než jejich odpovídající sodné soli.

Příklad 4: In vitro účinky BAPTA diesterů na distribuci Ca^{++} , Fe^{++} a Zn^{++} iontů ve vodě/oktanolu

Bylo zkoumány chelatační aktivity nových BAPTA diesterů podle vynálezu ve vodném a hydrofobním prostředí a byly zde ukázány účinky dioktylglykolesteru

BAPTA (DP-BAPTA 99, dvíjsodná sůl) na tři různé dvojmocné ionty kovů: Fe^{2+} , Zn^{2+} a Ca^{2+} .

Hydrofilní/hydrofobní systém použitý v této řadě pokusů sestával z 15 ml oktanolu a 15 ml solného roztoku o $\text{pH} = 6,5$. DP-BAPTA 99 byl rozpuštěn v oktanolovém roztoku před tím, než byla tato fáze smíchána se solným roztokem. Koncentrace DP-BAPTA v různých pokusech se pohybovala od $2,1 \cdot 10^{-6}$ do $5,5 \cdot 10^{-4}$ molu/l v pokusech s Ca^{2+} a od $5,4 \cdot 10^{-6}$ do $1,4 \cdot 10^{-3}$ molu/l v pokusech buď se Zn^{2+} nebo Fe^{2+} , jak je uvedeno pro každý bod na obr. 1A až C. Odpovídající ionty kovů byly přidány ve vodném roztoku jako chloridy v následujících koncentracích: FeCl_2 $2 \cdot 10^{-3}$ mol/l, ZnCl_2 10^{-4} mol/l a CaCl_2 $2 \cdot 10^{-3}$ mol/l.

Oktanolová a puřrová fáze byly smíchány a míchány 1 hodinu za teploty místnosti, následovalo odstřeřování 10 minut při 4000 otáček/min, aby se oddělila směs těchto dvou fází.

Pro vodné a oktanolové vzorky byly použity různé analytické postupy: i) Vodné vzorky byly analyzovány proti ICP standardům od Merk. Ca a Zn byly stanoveny v testovaných roztocích induktivně kopulovanou plasmovou atomovou emisní spektrometrií. Byl použit model ICP-AES "Spectroflame Modula E" od Spectro, Kleve, Německo, se standardním nebulizerem se zkříženým tokem a fixovanou EOP lampou. Výkon byl 1,2 kW, tok chladícího činidla 15 l/min, pomocný průtok 0,5 l/min a průtok nebulizeru 0,5 l/min. ii) Oktanolové vzorky, každý po 2 ml, ve skleněných zkumavkách, byly přeneseny do zahřívacího bloku. Odpaření oktanolu se provede kombinací zahřátí na 150 °C a kontinuálním proplachováním dusíkem. Zbytek byl rozpuštěn ve 2 ml koncentrované kyseliny dusičné a zahříván jednu hodinu na 120 °C. Zkumavky byly nechány ochladit na teplotu místnosti před tím, než byla přidána deionizovaná voda na konečný objem 10 ml.

Bylo ukázáno, že diotkylethylenglykolester BAPTA je 10 000krát lipofilnější než sodná sůl rodičovské molekuly BAPTA a že je převážně rozpuštěn v organickém rozpouštědle, které zde představoval oktanol.

Dále pak, jak je uvedeno na obr. 1A až C, BAPTA diestery zprostředkují přenos iontů kovů z vody do oktanolu a akumulaci těchto iontů v organické fázi, zatímco BAPTA nikoliv. Tento preferenční chelatační účinek BAPTA diesteru je zřejmý v přenosu Zn^{++} iontů z vody do oktanolu při tak nízké koncentraci léčiva, jako je 10 μM a při 250 až 500 μM pro odpovídající přenos iontů Ca^{++} a Fe^{++} .

B. Biologické hodnocení diesterů BAPTA

Nové diestery chelatačních činidel podle vynálezu byly testovány v různých biologických modelových systémech na jejich ochranné účinky na buňky nebo orgány v kultuře podléhající poškození zahmující abnormální hladiny vápníku. Výsledky pokusů prováděných in vitro (buňky tkáňové kultury, mozkové homogenáty) a in vivo (mongolské gerbily a krysy Wistar) jsou zde dále uvedeny.

Příklad 5

Účinky BAPTA diesterů na intracelulární koncentraci Ca^{++} (studie in vitro)

Chelatační účinky dvou různých BAPTA diesterů na intracelulární Ca^{++} koncentraci byly studovány in vitro v kultivovaných neuronových buňkách krysího hippocampu a byly sledovány fluorescencí.

Buněčná kultura

Primární disociované kultury krysího hippocampu byly připraveny z plodů E19 a byly nechány růst na 13mm krycích sklíčkách 104 týdny. Ve stručnosti - buňky byly vysety v DMEM obsahujícím 10% (hmotn.) koňské serum a 10% (hmotn.) plodové

telecí serum, které bylo po 1 týdnu nahrazeno DMEM obsahujícím 10% (hmotn.) koňské serum. Proliferace glié, tj. podpůrné nervové tkáně, byla blokována inkubací s 5-fluor-2'-deoxyuridinem 3 dny, počínaje 5. den od vyšetí. Pro Ca^{++} zobrazení byla krycí skla promyta záznamovým médiem a inkubována se $3\mu\text{m}$ Fluo-3/AM (molekulové sondy) v přítomnosti 0,2 % (hmotn./obj.) kyseliny pluronové (F127) 1 až 1,5 hodinu za třepání za teploty místnosti. Kultury byly pak promývány alespoň jednu hodinu v záznamovém mediu a byly použity během následující 1 až 3 hodin.

Roztoky a léčiva

Záznamové medium obsahovalo: 129mM NaCl, 4mM KCl, 1mM MgCl_2 , 2mM CaCl_2 , 4,2mM glukosu a 10mM HEPES, pH bylo upraveno NaOH na 7,4 a osmolalita na 320 mOsm přidáním sacharosy. BAPTA-diester diethyl-BAPTA (DP-BAPTA 23) nebo dioktyl-ethylenglykol-BAPTA (DP-BAPTA 99), oba jako dvojsodné soli, byly připraveny v záznamovém mediu ze zmrazených zásob před použitím. BAPTA-diester, jak je uvedeno v každém pokusu, byl nanesen na konečnou koncentraci 0,1 mM tlakovou pipetou s průměrem špičky $2\mu\text{m}$ a umístěn přibližně $50\mu\text{m}$ od buňky. Léčiva byla aplikována pipetou s tlakovým pulsem 0,5 až 5 sekund.

Zobrazování

Po naplnění barviva, Fluo-3/AM (molekulové sondy), byla skleněná krycí sklíčka umístěna na konfokální laserový skanovací mikroskop (Leica, Heidelberg, Německo) a superfusována záznamovým médiem obsahujícím $1\mu\text{M}$ tetrodoxin (TTX) rychlostí 3 až 5 ml/min za teploty místnosti. Konfokální laserový skanovací mikroskop je opatřen argon-iontovým laserem pro excitaci při vlnové délce 488 nm. Laserové světlo bylo sníženo na 1 až 3 % nominální intenzity, abychom se vyhnuli fotodynamickému poškození. Obrazy 256×256 pixelů byly snímány 63x objektivem pro ponoření do vody. Úplná trojrozměrná rekonstrukce buněk byla provedena z 15 až 20 postupných $0,5$ až $1,0\mu\text{m}$ optických sekcí buňkou, jestliže je to potřeba. Intenzita fluorescence byla kvantitativně vyhodnocena použitím softwaru pro analýzu Leica a

Adobe Photoshop (Adobe Systems). Změny fluorescence Fluo-3 byly standardizovány podělením čisté fluorescence předem ošetřenou fluorescencí ($\Delta F/F$).

Hippokampální neuronové buňky vyrostlé v DMEM mediu obsahujícím 2,4mM Ca^{++} byly buď ošetřeny ředidlem, tj. záznamovým mediem (obr. 2, snímek 1,2), nebo DP-BAPTA 22 (obr. 2, snímky 3 až 11). Přidání léčiva (1 mM v 9 msekundovém pulsu indukovalo snížení hladin intracelulárního vápníku, což se projevuje snížením fluorescence zaznamenané v ošetřených buňkách. Po tomto dočasném snížení koncentrace Ca^{++} následovala úplná regenerace během 7 až 8 vteřin po vymytí léčiva z buněk (viz obr. 2, snímky 12 až 20). Krátké amplifikace stejného množství léčiva indukovala kratší a menší snížení fluorescence ve stejné buňce (date nejsou uvedena).

Je důležité poznamenat, že stejné koncentrace tetrasodné soli rodičovského léčiva, BAPTA- Na_4 , což je léčivo, které neprochází membránou buňky, podporovaly pouze nevýznamná zvýšení intracelulárního Ca^{++} , když byly aplikovány na povrch kultivovaných neuronů krysího hippocampu (date nejsou uvedena).

Na obr. 3 je demonstrován účinek BAPTA diesterů na draslíkem indukované zvýšení koncentrací intracelulárních Ca^{++} .

Hippokampové neuronové buňky byly kultivovány jak shora popsáno a byly vystaveny 40milisekundovým K^+ pulsům (aplikovaným z pipety obsahující 100mM KCl) v časových bodech, které jsou označeny hvězdičkami (*). Za kontrolních podmínek každý takový K^+ puls vedl ke 3 až 4násobnému zvýšení koncentrace intracelulárních Ca^{++} iontů, zaznamenaných jako přechodné zvýšení fluorescenčního signálu.

Buňky byly pak promývány 0,1, 1,0 nebo 10,0 $\mu\text{g/ml}$ dioktylethylenglykol-BAPTA (DP-BAPTA 99) 5 minut před každým zaznamenáváním. Výsledky

uvedené na obr. 3 jsou grafickým znázorněním změn fluorescence zprůměrovaných z pěti jednotlivých hippocampových neuronových buněk.

Jak je uvedeno na obr. 3, BAPTA diester zesiluje draslíkem indukované zvýšení koncentrace intracelulárních vápenatých iontů a ukazuje tento účinek v závislosti na koncentraci.

Příklad 6

Účinky BAPTA diesterů na Na/K-ATPasovou aktivitu

Fernandes a spol. (*Neurochem. Int.* **1996**, 28, 497 až 500.) studovali aktivitu enzymu Na/K-ATPasy v krysím hippocampu během experimentální epilepsie vyvolané injekcí pilokarpinu. Podle této studie bylo zjištěno, že enzymová aktivita se snižuje během akutního a tichého období a zvyšuje (i když ne na normální hladiny) během chronické fáze epilepsie. Možným závěrem z těchto výsledků může být to, že změny v Na/K-ATPasové aktivitě mohou být zahmuty v objevením se spontánních recidivujících záchvatů po poškození mozku, které bylo indukováno injekcí pilokarpinu.

Pilokarpinem indukované záchvaty jsou považovány za model pro několik typů lidských epilepsií a jejich vývoj. Předpokládá se, že snížená aktivita enzymu Na/K-ATPasy, vedoucí ke zvýšeným extracelulárním hladinám K^+ , může být příspěvkem k epileptickému stavu a jeho rozvoji.

Účinky BAPTA-diesterů na Na/K-ATPasovou aktivitu byly tedy zkoumány v homogenátech myšího mozku ošetřených různými koncentracemi diethyl-BAPTA (DP-BAPTA 27, dvojsodná sůl). Testované koncentrace BAPTA-diesteru byly v rozmezí od 10^{-7} do 10^2 $\mu\text{g/ml}$.

Příprava homogenátu myšího mozku

Myší samci CD-1 (ve stáří 10 až 21 dnů) byly rychle dekapitací usmrčeny. Lebka byla otevřena, mozky byly odstraněny a rozříznuty na dva. Kortex byl izolován, vložen do sodného Ringerova pufru, promyt třikrát ledem ochlazeným PBS a udržován na ledu. Mozková tkáň byla homogenizována použitím zařízení Polytron při 14 000 otáčkách za minutu čtyřikrát 30 vteřin v ledu. Homogenizační pufr obsahoval: 250mM sacharosu, 1mM EGTA, 20mM HEPES-Tris, pH 7,4, a proteasový inhibitor PMSF.

Homogenát byl odstřeďován na Sorvalově chlazené odstředivce při 27 000xg po dobu 30 minut. Membránová frakce byla izolována a resuspendována v homogenizačním pufru. Čerstvý DP-BAPTA 27 byl pro každý pokus naředěn ze zásobního roztoku (1 mg/ml) a přidán k ATPasovému reakčnímu mediu na uvedené konečné koncentrace.

Na/K-ATPasový test

Na/K-ATPasa byla měřena jak dříve popsáno (Norby J., G. Coupled: "Assay of the Na^+ - K^+ ATPase Activity", *Methods in Enzymology* **1988**, 156, 116 až 119.) v nepřítomnosti a v přítomnosti Na/K-ATPasového inhibitoru, ouabain (3 mM). Obsah proteinu byl stanoven použitím testu Bio Rad-Bradford jak dříve popsáno (Bradford M.: "Protein assay", *Ann. Biochem.* **1978**, 72, 248 až 257.).

Jak je uvedeno na obr. 4, DP-BAPTA 27 indukoval zvýšení (závislé na dávce) aktivity Na/K-ATPasy v myším cerebrálním kortexu, tedy za fyziologických podmínek, což vede k nižším hladinám extracelulárních K^+ iontů.

Příklad 7

Účinky BAPTA-diesterů na buněčné kardiacké funkce

Kardioprotektivní účinnost diethyl-BAPTA (DP-BAPTA-23) byla vyhodnocována zkoumáním účinku tohoto léčiva na membránový potenciál v kultivovaných kardiomyocytech.

Ventrikulární myocyty byly získány z dospělých morčat (350 až 400 gramů) enzymatickým disociačním postupem (Isenberg G. a Klockner U.: *Pflugers Arch.* **1982**, 395, 6 až 18.). Buňky byly upevněny na podstavu inertního mikroskopu (Nikon, Diaphot-Tmd, Tokyo, Japonsko) v 0,5ml záznamové lázni. Tato lázeň byla promývána Tyrodovým roztokem (140mM NaCl, 4mM KCl, 1,8mM CaCl_2 , 1mM MgCl_2 , 10mM glukosa a 5mM Hepes, pH 7,4) rychlostí 1 až 2 ml/min. Myocyty byly stimulovány při 0,2 Hz a studovány za teploty místnosti (24 až 25 °C). Náplast'ové elektrody byly připraveny ze skleněných mikropipet a měly odpor na špičce 2 až 4 M Ω , když byly naplněny pipetovacím roztokem, který obsahoval 120mM K-aspartát, 20mM KCl, 3,5mM MgCl_2 , 20mM KH_2PO_4 , 3mM Na_2ATP , 10mM glukosu a 1mM EGTA, pH 7,4.

Akční potenciály byly zaznamenávány z ventrikulárních myocytů morčat zařízením Axon 200A (Axon Instruments, Inc., Foster City, Ka., USA), jak dříve popsáno (Felzen a spol.: *Pflugers Arch.*, **1995**, 427, 422 až 431; Felzen a spol.: *Circ. Res.* **1996**, 78, 253 až 261.).

Bylo zjištěno, že 10^{-11} až 10^{-14} molu/l DP-BAPTA 23 indukuje hyperpolarizaci snížením (8 mV) odpočívajících potenciálů kultivovaných kardiomyocytů a zkrácením trvání jejich akčního potenciálu (výsledky nejsou uvedeny).

Na obrázku 5 jsou uvedena měření membránového potenciálu u stimulovaných myocytů inkubovaných v nepřítomnosti (křivka 1, kontrolní buňky) nebo v přítomnosti 10^{-6} M ouabainu 6 minut (křivka 2), 10 minut (křivka 3) a 13 minut (křivka

4) při srovnání s membránovým potenciálem měřeným u stimulovaných myocytů inkubovaných ouabainem a 1^{-10} mg/ml DP-BAPTA 23 35 minut (křivka 5).

Jak lze vidět na obrázku 5, třináctiminutová inkubace s Na/K-ATPase ovým inhibitorem, ouabainem, indukovala zpoždění po depolarizaci (DAD) u kardiomyocytů (označených šipkami na křivce 4). Tato odpověď, charakterizující toxicitu ouabainu, byla odstraněna DP-BAPTA 23 (křivka 5).

Příklad 8

Účinky BAPTA diesterů na glutamát indukovanou smrt neuronových buněk

Neuroprotektivní potenciál BAPTA diesterů podle vynálezu byl vyhodnocován v in vitro modelovém systému glutamátové toxicity.

Neonatální kortikální neurony z krys byly vysety na desky s 24 jamkami a byly kultivovány v tkáňové kultuře, jak je popsáno Sattlerem a spol. (*J. Cereb. Blood Flow Metab.* **1997**, 17, 456.).

Buňky byly promyty jednou 0,5 ml/jamku kontrolního roztoku, aby se odstranily jakékoliv serové proteiny. Kontrolní roztok obsahoval: 121mM NaCl, 5mM KCl, 10mM Hepes kyselinu, 7mM Hepes-sodnou sůl, 1mM pyruvát sodný, 1,8mM CaCl_2 , 3mM NaHCO_3 , 0,01mM glycin a 20mM D-glukosu, pH 7,4 (Sigma).

DP-BAPTA 23 byl nejdříve rozpuštěn v DMSO a dále zředěn v kontrolním roztoku na koncentrace 300, 100, 30, 10 a 3 μM . Množství DMSO přidané k buňkám by nemělo přesahovat 1 % hmotn. Kultivované neuronové buňky byly naplněny testovaným DP-BAPTA-23 (0,5 ml/jamku) a byly inkubovány 1 hodinu při 37 °C ve zvlhčované komoře. Medium na deskách bylo pak odpipetováno a nahrazeno čerstvým kontrolním roztokem a inkubace probíhala dalších 30 minut při 37 °C. Do každé jamky byl přidán propidiumjodid (PI) ze zásobního roztoku o koncentraci 1

mg/ml (Molecular Probes Inc., kat. č. P-1304) na konečnou koncentraci 50 μ g/ml a byla odečtena základní fluorescence. Buňky pak byly ošetřovány 300mM L-glutamátem (Sigma) 1 hodinu za teploty místnosti v nepřítomnosti nebo v přítomnosti různých koncentrací DP-BAPTA-23, jak je uvedeno u každého pokusu.

V těch postupech, kde byly buňky ošetřeny BAPTA-diesterem před poškozením glutamátem, bylo léčivo přítomno v mediu během doby poškozování (obr. 6). V ostatních případech byl DP-BAPTA přidán pouze po následujícím glutamátovém poškození v době, která je uvedena (obr. 7).

Kontrolní roztok bez glutamátu byl přidán ke kontrolním jamkám obsahujícím testovaný BAPTA-diester, aby se zkontrolovala hladina toxicity způsobená samotnou sloučeninou.

Po poškození bylo medium s glutamátem odstraněno a nahrazeno stejným mediem bez glutamátu, ale obsahujícím PI (50 μ g/ml). Měření PI fluorescence byla prováděna v jednodinových intervalech po dobu 24 hodin.

Odečtení pozadí při měření fluorescence bylo normalizováno na měření fluorescence PI u identických kultur vystavených působení 1mM NMDA po dobu 1 hodiny. Smrt buněk byla sledována odečítáním fluorescence ve skaneru desek Cytofluor II Multi-well plate scanner (PerSeptive Biosystems). Glytamátové poškození vedlo k téměř 100% smrti neuronových buněk během 24 hodin.

Frakce mrtvých buněk byla vypočtena následujícím způsobem:

$$\text{Frakce mrtvých buněk} = (F_t - F_0) / F_{\text{NMDA}}$$

kde F_t = fluorescence PI v čase t , F_0 je počáteční fluorescence PI v čase 0 a F_{NMDA} = fluorescence OPI s odečteným pozadím identické kultury ze stejné pitvy a stejného

vyšetří, po 24 hodinách a po 60 minutách vystavení působení 1mM N-methyl-D-aspartátu (NMDA).

Jak je uvedeno na obr. 6, DP-BAPTA-23 snižuje glutamátem indukovanou smrt neuronových buněk způsobem závislejícím na dávce. Tento ochranný účinek je zřejmý při tak nízké koncentraci BAPTA-diesteru, jako je 30 μ M.

Navíc byl tento neuroprotektivní účinek ukázán tehdy, když DP-BAPTA (100 μ M) byl přidán jednu hodinu před poškozením glutamátem (obr. 6) s Glu nebo až 60 minut po poškození glutamátem (viz obr. 7).

Příklad 9

Neuroprotektivní účinky BAPTA-diesterů - model celkové ischemie předního mozku

Neuroprotektivní účinek BAPTA diesterů podle vynálezu byl dále zkoumán na modelu celkové ischemie předního mozku mongolských gerbil.

Zvířata

Pro tuto studii byly použity samci mongolských gerbil o hmotnosti 60 až 70 g (Charles River Laboratories, USA).

Indukce ischemie

Anestezie byla u gerbil provedena halothanem (4%) v anestetické komoře (30 % kyslíku a 70 % oxidu dusného) a byla udržována 1% halothanem ve 30 % kyslíku a 70 % oxidu dusného použitím lícní masky. Pro indukci ischemie byly obě karotidní arterie izolovány středním řezem v krku a dočasně okludovány po dobu 10 nebo 20 minut, jak uvedeno, arteriálními uzávěry. Během celé doby cerebrální ischemie, když byly uzávěry na místě, byla anestezie udržována pouze 30 % kyslíku a 70 % oxidu

dusného bez halothanu. Rektální teplota, sledovaná rektální sondou, byla během ischemie udržována na 37 až 37,5 °C použitím zahřívací lampy a hřejícího polštářku. Když se aplikují, testované BAPTA diestery se podávají zvířatům buď parenterálně i.p. nebo orálně v dobách a dávkách, jak jsou uvedeny u příslušného pokusu. Kontrolní zvířata byla ošetřena samotným ředidlem, tj. 0,9% (hmotn.) roztokem NaCl místo BAPTA diesterové sloučeniny.

Studie životnosti

Bylo sledováno přežívání zvířat od 20 minut po celkové ischemii předního mozku až do 10 dnů po ischemii.

Statistika

Statistická analýza byla prováděna použitím Studentova t-testu s Bonferroniho opravami s hladinou významnosti $p < 0,05$.

Test neuronově specifické enolasy (NSE)

Z orbitálního sinusu gerbil byly odebrány vzorky krve 24 a 72 hodin po 10minutové cerebrální ischemii. Vzorky krve byly odstředovány 5 minut při 3000 otáčkách za minutu, aby se získalo serum (frakce supernatantu). NSE aktivita v seru byla stanovována radioimunotestem použitím sestavy NSE (Pharmatope Ltd., Izrael).

Enzymatická aktivita neuronově specifické enolasy (NSE) v seru byla použita pro vyhodnocení účinnosti testovaných BAPTA diesterů při prevenci neuronového poškození. Bylo zjištěno, že při experimentální celkové ischemii byly NSE hladiny zvýšeny v seru od 2 do 192 hodin po ischemii, což odpovídá zpoždění smrti neuronových buněk, ke které za těchto podmínek dochází. NSE tedy může sloužit jako kvantitativní marker pro stupeň neuronového poškození.

Na obr. 8, 9 a 10 jsou souhrnně uvedeny výsledky pokusů, v nichž dva BAPTA diestery podle vynálezu, dioktyl-BAPTA (DP-BAPTA-60, dvojsodná sůl) a dioktylethylenglykol-BAPTA (DP-BAPTA-99, dvojsodná sůl), byly testovány na jejich účinek chránící neurony. V modelovém systému celkové ischemie předního mozku mongolských gerbil byly zkoumány různé režimy a způsoby podávání léčiva. Sledovanými parametry byly: i) aktivita neuronově specifické enolasy ve zvířecím seru jako indikátor smrti neuronových buněk (obr. 8 a 9) a ii) přežití zvířat (obr. 10).

Jak je uvedeno na obr. 8, jediná dávka 5 $\mu\text{g/kg}$ buď DP-BAPTA-60 (šedé sloupečky) nebo DP-BAPTA-99 (černé sloupečky) podávané i.p. ischemickým gerbilám bezprostředně po nástupu reperfuse ($t = 0$) nebo 3 hodiny po počátku reperfuse ($t = 3$), zabránila neuronovému poškození. Tyto výsledky ukazují, že DP-BAPTA léčiva působí jak způsobem léčivým tak preventivním.

Na obr. 9 je ukázán neuroprotektivní účinek DP-BAPTA 99 podávaného orálně podle dvou schemat: a) dávka 0,5 mg/kg 4 hodiny na před nástupem reperfuse s následujícím podáním další dávky 0,5 mg/kg na počátku reperfuse, a b) 0,5 mg/kg denně po dobu 3 dnů od ischemie. V obou případech DP-BAPTA 99 vykazuje silný ochranný účinek demonstrováný významným snížením aktivity NSE v seru, měřeno 24 h a 72 h po celkové cerebrální ischemii.

V jiném pokusu byl ochranný účinek BAPTA diesterů vyhodnocen sledováním doby přežití gerbil, které byly po dobu 20 minut vystaveny celkové ischemii předního mozku, jak je shora popsáno. Testovaná zvířata ($N = 15$ v každé skupině) dostala 10 $\mu\text{g/kg}$ DP-BAPTA-60 nebo DP-BAPTA-99 podaných i.p. v jediné dávce při nástupu reperfuse. Kontrolní zvířata ($N = 30$) dostala roztok ředidla.

Jak je uvedeno na obr. 10, jak DP-BAPTA-60 tak DP-BAPTA-99 prodloužily přežití zvířat dvakrát, respektive třikrát.

Shmuto - bylo ukázáno, že BAPTA diestery jsou účinné jak při způsobu léčení tak předcházení při ochraně proti neuronovému poškození způsobeného ischemií a že praktickými je jak podávání léčiva parenterální tak orální.

Důležité je také poznamenat, že jak dvojsodné tak vápenaté soli dioktyl-BAPTA byly stejně účinné v jejich neuroprotektivní schopnosti. Na druhou stranu v tomto modelovém systému sodná sůl dioktylethylenglykol-BAPTA (DP-BAPTA-99) vykazovala mnohem význačnější neuroprotektivní aktivitu při srovnání s vápenatou solí této molekuly.

Příklad 10

Histopatologická analýza neuroprotektivních účinků BAPTA diesterů

Aby se dále zjistila neuroprotektivní aktivita BAPTA diesterů, byla provedena podrobná semikvantitativní mikroskopická patologická analýza na vzorcích mozku zvířat, které byly podrobeny indukci celkové ischemie předního mozku, která byla provedena buď v nepřítomnosti nebo v přítomnosti BAPTA diesteru.

Byly testovány dva v současné době neuroprotektivně nejúčinnější BAPTA diestery podle vynálezu, tj. dioktyl-BAPTA (DP-BAPTA 60) a dioktylethylenglykol-BAPTA (DB-BAPTA 90), oba jako dvojsodné soli.

Třicet devět mongolských gerbil bylo vystaveno desetiminutové celkové ischemii předního mozku, která byla indukována postupem popsáním v příkladu 9. Zvířata byla rozdělena do tří skupin, která bylo ošetřena následujícím způsobem.

Skupina I: 13 gerbil, injekčně i.p. podána jedna dávka 5 μ g DP-BAPTA 60/kg tělesné hmotnosti ihned po ischemii.

Skupina II: 11 gerbil, injekčně i.p. podána jedna dávka 5 μ g DP-BAPTA 99/kg tělesné hmotnosti ihned po ischemii.

Skupina III: 15 gerbil, kontrolní zvířata, kterým bylo injekčně podáno ředidlo, tj. solný roztok.

Tři dny po ischemii byla zvířata reanestetizována ketaminem a ksilazynem, jejich mozky byly chirurgicky odstraněny a byly skladovány ve 4% (hmotn.) formalinu v PBS 7 dnů. Z oblasti dorsálního hippocampu byly odebrány řezy o tloušťce 7 μ m a pro mikroskopické zkoumání byly obarveny hematoxylinem a eosinem.

Byly vyhodnoceny CA-1, CA-2, CA-3 a dentální gyrus podoblasti hippocampu po rozdělení do tří podoblastí: mediální, střední a laterální. Potom byl spočítán celkový počet živých buněk v každé sekci a bylo vyhodnoceno neuronové poškození. Pro hodnocení poškození mozku byla použita dohodnutá stupnice zahrnující pět stupňů: 0 znamená normální tkáň, žádné poškození, 1 znamená minimální poškození, méně než 20 % nekrosy neuronů, 2 znamená mírné poškození, méně než 40 % nekrosy neuronů, 3 znamená střední poškození, méně než 60 % nekrosy neuronů a 4 znamená významné poškození, více než 80 % neuronů je mrtvých.

Jak lze vidět z obrázku 11, DP-BAPTA 99 vykazuje významný neuroprotektivní účinek v CA-1, CA-2, CA-3 a dentální gyrus oblasti hippocampu. Také u DP-BAPTA 60 bylo zjištěno, že je účinný při snížení neuronového poškození indukovaného ischemií v některých oblastech, i když v menším rozsahu než u DP-BAPTA 99.

Příklad 11

Antiepileptický účinek BAPTA diesterů (model in vivo)

Antiepileptická aktivita DP-BAPTA-99 byla sledována na zvířecím modelu krys Wistar, jejichž záchvaty byly indukovány pilokarpinem (400 mg/kg).

Pro tyto pokusy byly použity krysy Wistar o hmotnosti kolem 350 g. DP-BAPTA-99, v různých koncentracích, jak je uvedeno na obr. 12A a B, byl i.p. injekčně podán jednu hodinu před injekcí pilokarpinu. 30 minut před pilokarpinem (400 mg/kg, i.p.) byl injekčně podán methylskopolamin (1 mg/kg), aby se snížily periferní muskarinové účinky pilokarpinu.

Během několika minut po injekci pilokarpinu zvířata vykazovala uvolnění porfinu z oblasti kolem očí, chronickou mastikaci, kývání, myoklonická škubání a vlhké psí třesy. Všechno to jsou stavy limbických záchvatů, srovnatelné se stupni 1 až 2 podle Ricinovy stupnice. Zvířata se potom obvykle blížila ke stupni 3, což zahrnuje třes přední končetiny. Obvykle během 20 minut vykazovala zvířata známky celkového záchvatu. To zahrnuje vztyčení nebo vztyčení a padání se současnou škubavou aktivitou přední končetiny a celkovými klonickými záchvaty. Obvykle během 30 minut jsou krysy ve stavu epilepticus. Tento stav je povahy limbické, přerušované krátkými episodami klonických záchvatů. Status epilepticus je záchvat, který se spontánně nezastaví. U modelu krys to znamená, že pokračuje po dobu více než 5 minut. Po tom, co zvířata byla ve stavu epilepticus 3 hodiny (a pouze ta v tomto stavu), záchvaty byly zastaveny podáním i.p. 10 mg/kg diazepanu a Phenytoinu (60 mg/kg). Úmrtnost během období tohoto období u modelu s vysokou dávkou pilokarpinu je obvykle kolem 30 až 50 %.

Jak je ukázáno na obr. 12, DP-BAPTA-99 nemá žádný účinek na limbické záchvaty, ale je schopen zabránit celkovým záchvatům a zabránit stavu epilepticus u poloviny populace. Navíc toto léčivo snižuje úmrtnost, ke které dochází během tříhodinového stavu epilepticus.

Lze tedy uzavřít, že DP-BAPTA-99 může zabránit šíření (generalizaci) záchvatů.

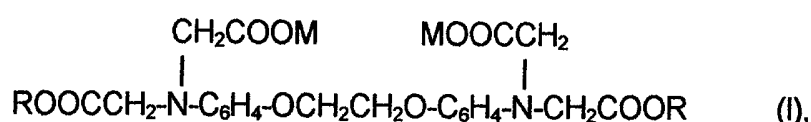
I když je zde předložený vynález podrobně popsán, zruční odborníci z oblasti techniky si uvědomují, že lze udělat různé změny a úpravy. Tento vynález tedy není zkonstruován tak, že je omezen na příslušná popsaná provedení, spíše však rozsah, duch a koncepce tohoto vynálezu budou snadněji pochopitelné odkazem na následující nároky.

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Stabilní diester karboxylové kyseliny a hydroxylové sloučeniny, kde karboxylová kyselina znamená farmaceuticky přijatelné chelatační činidlo pro dvojmocné ionty kovu obecného vzorce $(\text{HOOC-CH}_2)_2\text{-N-A-N-}(\text{-CH}_2\text{COOH})_2$, v němž A znamená nasycenou nebo nenasycenou, alifatickou, aromatickou nebo heterocyklickou spojovací skupinu, která obsahuje v přímé vazbě řetězce mezi dvěma vyznačenými atomy dusíku 2 až 8 atomů uhlíku v kontinuálním řetězci, který může být přerušen 2 až 4 atomy kyslíku s tím, že členové řetězce přímo napojení na dva označené atomy dusíku neznamenaají atomy kyslíku, a hydroxylová sloučenina znamená farmaceuticky přijatelný alkohol, který je vybrán ze skupiny nasyceného nebo nenasyceného alkylu s přímým nebo větve-ným řetězcem, aminoalkylu a substituovaného nebo nesubstituovaného aryl-alkylu, a farmaceuticky přijatelné soli těchto diesterů.
2. Stabilní diester podle nároku 1, v němž vazebná skupina A je vybrána ze skupiny sestávající ze skupiny $(\text{CH}_2\text{CH}_2)_m$, kde m znamená číslo 1 až 4, kde 2 až 4 atomy uhlíku, které nejsou připojeny na atom dusíku, mohou být nahra-zeny atomy kyslíku, a skupiny $-\text{CR}=\text{CR-O-CH}_2\text{CH}_2\text{-O-CR}'=\text{CR}'-$, kde každý pár skupin R-R a R'-R' společně s přilehlou skupinou $-\text{C}=\text{C}-$ tvoří aromatický nebo heterocyklický kruh s 5 nebo 6 atomy kruhu a kruh tvořený R-R je stejný nebo jiný než kruh tvořený R'-R'.
3. Stabilní diester podle nároku 2, v němž vazebná skupina A je vybrána ze skupiny sestávající z $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$ a $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-O-CH}_2\text{CH}_2\text{-O-CH}_2\text{CH}_2-$.
4. Stabilní diester podle nároku 2, v němž vazebná skupina znamená skupinu $-\text{CR}=\text{CR-O-CH}_2\text{CH}_2\text{-O-CR}'=\text{CR}'-$, kde každý pár skupin R-R a R'-R' společně s přilehlou skupinou $-\text{C}=\text{C}-$ tvoří aromatický nebo heterocyklický kruh, který je vybrán ze skupiny sestávající z furanu, thiofenu, pyrrolu, pyrazolu, imidazolu, 1,2,3-triazolu, oxazolu, isoxazolu, 1,2,3-oxadiazolu, 1,2,5-oxadiazolu, thiazolu,

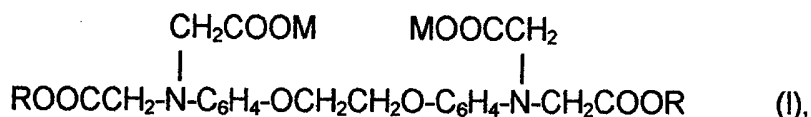
isothiazolu, 1,2,3-thiadiazolu, 1,2,5-thiadiazolu, benzenu, pyridinu, pyridazinu, pyrimidinu, pyrazinu, 1,2,3-triazinu, 1,2,4-triazinu a 1,2-, 1,3- a 1,4-oxazinů a -thiazinů, kde kruh tvořený R-R je stejný nebo jiný než kruh tvořený R'-R'.

5. Stabilní diester podle nároku 4, v němž vazebná skupina A znamená skupinu $-\text{CR}=\text{CR}-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CR}'=\text{CR}'$, kde každý pár skupin R-R a R'-R' společně s přilehlou skupinou $-\text{C}=\text{C}-$ tvoří stejné nebo různé kruhy vybrané z nesubstituovaných a substituovaných benzenových kruhů, při čemž substituované benzenové kruhy obsahují 1 až 4 substituenty vybrané ze skupiny sestávající z nasyceného nebo nenasyčeného alkylu s 1 až 4 atomy uhlíku, nasycené nebo nenasyčené alkoxy skupiny s 1 až 4 atomy uhlíku, atomu fluoru, chloru, bromu a jodu a skupiny CF_3 nebo jednoho dvojjazného substituentu, který znamená skupinu $-\text{O}-(\text{CH}_2)_n-\text{O}-$ a n znamená číslo 1 až 3.
6. Stabilní diester podle nároku 2, v němž je chelatační činidlo vybráno z ethylen-1,2-diamin-N,N,N',N'-tetraoctové kyseliny, ethylen-1,2-diol-bis-(2-aminoe-thylether)-N,N,N',N'-tetraoctové kyseliny a 1,2-bis-(2-aminofenoxy)ethan-N,N,N',N'-tetraoctové kyseliny.
7. Stabilní diester obecného vzorce



v němž substituenty na aromatických kruzích jsou v ortho poloze, R znamená skupinu vybranou ze skupiny sestávající z $\text{C}_n\text{H}_{2n+1}$ (n znamená číslo od 1 do 10), $\text{C}_n\text{H}_{2n+1}(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_m$ (n znamená číslo od 1 do 20 a m znamená číslo od 1 do 6), $(\text{C}_n\text{H}_{2n+1})_2\text{N}(\text{CH}_2)_m$ (n znamená číslo 1 až 6 a m znamená číslo 1 až 6) a substituované nebo nesubstituované skupiny ArCH_2 , a M znamená jakýkoliv fyziologicky přijatelný kation.

8. Stabilní diester podle nároku 7, v němž R znamená monoalkylether mono-, di- nebo tri-ethylenglykolu.
9. Stabilní diester podle nároku 7, v němž R je vybrána ze skupiny sestávající z C_2H_5 , C_3H_7 , $iso-C_3H_7$, C_4H_9 , C_7H_{15} , C_8H_{17} , $CH_2C_6H_5$, $CH_3OCH_2CH_2$, $C_2H_5OCH_2CH_2$, $C_3H_7OCH_2CH_2$, $C_4H_9OCH_2CH_2$, $C_7H_{15}OCH_2CH_2$, $C_8H_{17}OCH_2CH_2$, $C_{10}H_{21}OCH_2CH_2$, $C_{16}H_{23}OCH_2CH_2$, $C_{18}H_{37}OCH_2CH_2$, $CH_3(OCH_2CH_2)_2$, $C_2H_5O(CH_2CH_2)_2$, $C_4H_9(OCH_2CH_2)_2$, $C_6H_{13}(OCH_2CH_2)_2$, $C_7H_{15}(OCH_2CH_2)_2$, $C_8H_{17}(OCH_2CH_2)_2$, $C_{10}H_{21}(OCH_2CH_2)_2$, $CH_3(OCH_2CH_2)_3$, $(CH_3)_2NCH_2CH_2$ a $C_7H_{15}(OCH_2CH_2)_3$.
10. Stabilní diester podle nároku 9, v němž R je vybrána ze skupiny sestávající z C_2H_5 , C_3H_7 , C_4H_9 , C_7H_{15} , C_8H_{17} , $C_8H_{17}OCH_2CH_2$, $C_{10}H_{21}OCH_2CH_2$, $C_{16}H_{23}OCH_2CH_2$, $C_{18}H_{37}OCH_2CH_2$, $C_8H_{17}(OCH_2CH_2)_2$ a $C_{10}H_{21}(OCH_2CH_2)_2$.
11. Stabilní diester podle nároku 9, v němž R znamená skupinu C_8H_{17} .
12. Stabilní diester podle nároku 9, v němž R znamená skupinu $C_8H_{17}OCH_2CH_2$.
13. Farmaceutický prostředek, vyznačující se tím, že jako účinnou složku obsahuje stabilní lipofilní diester chelatačního činidla podle kteréhokoliv z nároků 1 až 12 a farmaceuticky přijatelné ředidlo nebo nosič.
14. Farmaceutický prostředek podle nároku 13, vyznačující se tím, že jako účinnou složku obsahuje sloučeninu obecného vzorce I



v němž substituenty na aromatických kruzích jsou v ortho poloze, R znamená skupinu vybranou ze skupiny sestávající z C_nH_{2n+1} (n znamená číslo od 1 do 10), $C_nH_{2n+1}(OCH_2CH_2)_m$ (n znamená číslo od 1 do 20 a m znamená číslo od 1 do 6), $(C_nH_{2n+1})_2N(CH_2)_m$ (n znamená číslo 1 až 6 a m znamená číslo 1 až 6) a substituované nebo nesubstituované skupiny $ArCH_2$, a M znamená jakýkoliv fyziologicky přijatelný kation.

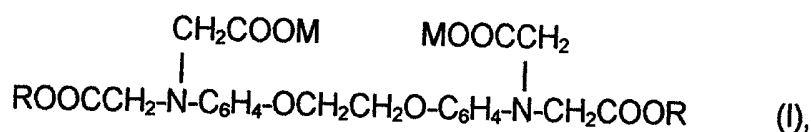
15. Farmaceutický prostředek podle nároku 14, vyznačující se tím, že R je vybrána ze skupiny sestávající z C_2H_5 , C_3H_7 , C_4H_9 , C_7H_{15} , C_8H_{17} , $C_8H_{17}OCH_2CH_2$, $C_{10}H_{21}OCH_2CH_2$, $C_{16}H_{23}OCH_2CH_2$, $C_{18}H_{37}OCH_2CH_2$, $C_8H_{17}(OCH_2CH_2)_2$ a $C_{10}H_{21}(OCH_2CH_2)_2$.
16. Farmaceutický prostředek podle nároku 14, vyznačující se tím, že R znamená skupinu C_8H_{17} .
17. Farmaceutický prostředek podle nároku 14, vyznačující se tím, že R znamená skupinu $C_8H_{17}OCH_2CH_2$.
18. Farmaceutický prostředek podle kteréhokoliv z nároků 15 až 17, vyznačující se tím, že se používá pro léčení onemocnění nebo poruchy související s nadbytkem dvojmocných iontů kovů.
19. Farmaceutický prostředek podle nároku 18, vyznačující se tím, že je určen pro parenterální podávání.
20. Farmaceutický prostředek podle nároku 18, vyznačující se tím, že je určen pro orální podávání.
21. Farmaceutický prostředek podle nároku 18, vyznačující se tím, že dvojmocné ionty kovů jsou vybrány ze skupiny sestávající z Ca^{++} , Cd^{++} , Co^{++} , Cu^{++} , Fe^{++} , Hg^{++} , Mg^{++} , Mn^{++} , Pb^{++} a Zn^{++} iontů.

22. Farmaceutický prostředek podle nároku 18, vyznačující se tím, že onemocnění nebo porucha souvisí se zvýšenými hladinami intracelulárních Ca^{++} iontů.
23. Farmaceutický prostředek podle nároku 22, vyznačující se tím, že onemocnění nebo porucha související s nadbytkem intracelulárních Ca^{++} iontů je vybrána ze skupiny sestávající z mozkové a srdeční ischemie, infarktu, infarktu myokardu, epilepsie, Alzheimerovy choroby, Parkinsonovy choroby, akutního zánětu, urinární inkontinence, hypertrofie prostaty, svalových křečí, arteriální hypertenze, astmatu a syndromu podráždění střev.
24. Farmaceutický prostředek podle nároku 23, vyznačující se tím, že onemocnění nebo porucha související s nadbytkem intracelulárních Ca^{++} iontů znamená mozkovou a srdeční ischemii, infarkt, epilepsii, Alzheimerovu chorobu nebo srdeční arytmii.
25. Použití diesteru jak je definován v kterémkoliv z nároků 1 až 12 pro výrobu léčiva.
26. Způsob léčení onemocnění nebo poruchy související s nadbytkem dvojmocných iontů kovů, vyznačující se tím, že zahrnuje podávání jednotlivci, který to potřebuje, terapeuticky efektivního množství stabilního lipofilního diesteru farmaceuticky přijatelného chelatačního činidla dvojmocných iontů kovů.
27. Způsob léčení onemocnění nebo poruchy související s nadbytkem intracelulárních Ca^{++} iontů, vyznačující se tím, že zahrnuje podávání jednotlivci, který to potřebuje, terapeuticky efektivního množství stabilního lipofilního diesteru farmaceuticky přijatelného chelatačního činidla vápníku.

28. Způsob podle nároku 27, v y z n a č u j í c í s e t í m, že lipofilní diester obsahuje chelatační činidlo s alkoholem, kde chelatační činidlo znamená farmaceuticky přijatelné chelatační činidlo pro vápník obecného vzorce $(\text{HOOC-CH}_2)_2\text{-N-A-N-(-CH}_2\text{COOH)}_2$, v němž A znamená nasycenou nebo nenasyčenou, alifatickou, aromatickou nebo heterocyklickou spojovací skupinu, která obsahuje ve vazbě přímý řetězec mezi dvěma vyznačenými atomy dusíku, 2 až 8 atomů uhlíku v kontinuálním řetězci, který může být přerušen 2 až 4 atomy kyslíku s tím, že členové řetězce přímo napojení na dva označené atomy dusíku neznamenaají atomy kyslíku, a alkohol znamená farmaceuticky přijatelný alkohol, který je vybrán ze skupiny nasyceného nebo nenasyčeného alkylu s přímým nebo větveným řetězcem, aminoalkylu a substituovaného nebo nesubstituovaného alkylu, a farmaceuticky přijatelné soli uvedených diesterifikovaných karboxylových kyselin.
29. Způsob podle nároku 28, v y z n a č u j í c í s e t í m, že vazebná skupina A znamená člen, který je vybrán ze skupiny sestávající ze skupiny $\text{-(CH}_2\text{CH}_2)_m\text{-}$, kde m znamená číslo 1 až 4, kde 2 až 4 atomy uhlíku, které nejsou připojeny na atom dusíku, mohou být nahrazeny atomy kyslíku, a skupiny $\text{-CR=CR-O-CH}_2\text{CH}_2\text{-O-CR'=CR'-}$, kde každý pár skupin R-R a R'-R' společně s přilehlou skupinou -C=C- tvoří aromatický nebo heterocyklický kruh s 5 nebo 6 atomy kruhu a kruh tvořený R-R je stejný nebo jiný než kruh tvořený R'-R'.
30. Způsob podle nároku 28, v y z n a č u j í c í s e t í m, že vazebná skupina A je vybrána ze skupiny sestávající ze skupiny $\text{-CH}_2\text{CH}_2\text{-}$ a skupiny $\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-CH}_2\text{CH}_2\text{-O-CH}_2\text{CH}_2\text{-}$.
31. Způsob podle nároku 28, v y z n a č u j í c í s e t í m, že vazebná skupina znamená skupinu $\text{-CR=CR-O-CH}_2\text{CH}_2\text{-O-CR'=CR'-}$, kde každý pár skupin R-R a R'-R' společně s přilehlou skupinou -C=C- tvoří aromatický nebo heterocyklický kruh, který je vybrán ze skupiny sestávající z furanu, thiofenu, pyrrolu, pyrazolu, imidazolu, 1,2,3-triazolu, oxazolu, isoxazolu, 1,2,3-oxadiazolu, 1,2,5-

-oxadiazolu, thiazolu, isothiazolu, 1,2,3-thiadiazolu, 1,2,5-thiadiazolu, benzenu, pyridinu, pyridazinu, pyrimidinu, pyrazinu, 1,2,3-triazinu, 1,2,4-triazinu a 1,2-, 1,3- a 1,4-oxazinů a -thiazinů, a kruh tvořený R-R je stejný nebo jiný než kruh tvořený R'-R'.

32. Způsob podle nároku 28, v y z n a č u j í c í s e t í m, že vazebná skupina A znamená skupinu $-CR=CR-O-CH_2CH_2-O-CR'=CR'$, kde každý pár skupin R-R a R'-R' společně s přilehlou skupinou $-C=C-$ tvoří stejné nebo různé kruhy vybrané z nesubstituovaných a substituovaných benzenových kruhů, v nichž substituované benzenové kruhy obsahují 1 až 4 substituenty vybrané ze skupiny sestávající z nasyceného nebo nenasyceného alkyly s 1 až 4 atomy uhlíku, nasycené nebo nenasycené alkoxy skupiny s 1 až 4 atomy uhlíku, atomu fluoru, chloru, bromu a jodu a skupiny CF_3 nebo jednoho dvojnásobného substituentu, který znamená skupinu $-O-(CH_2)_n-O-$ a n znamená číslo 1 až 3.
33. Způsob podle nároku 28, v y z n a č u j í c í s e t í m, že chelatační činidlo je vybráno z ethylen-1,2-diamin-N,N,N',N'-tetraoctové kyseliny, ethylen-1,2-diol-bis-(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraoctové kyseliny a 1,2-bis-(2-aminofenoxy)ethan-N,N,N',N'-tetraoctové kyseliny.
34. Způsob podle nároku 28, v y z n a č u j í c í s e t í m, že diester chelatačního činidla znamená sloučeninu obecného vzorce I



v němž substituenty na aromatických kruzích jsou v ortho poloze, R znamená skupinu vybranou ze skupiny sestávající z C_nH_{2n+1} (n znamená číslo od 1 do 10), $C_nH_{2n+1}(OCH_2CH_2)_m$ (n znamená číslo od 1 do 20 a m znamená číslo od 1 do 6), $(C_nH_{2n+1})_2N(CH_2)_m$ (n znamená číslo 1 až 6 a m znamená číslo 1 až 6) a

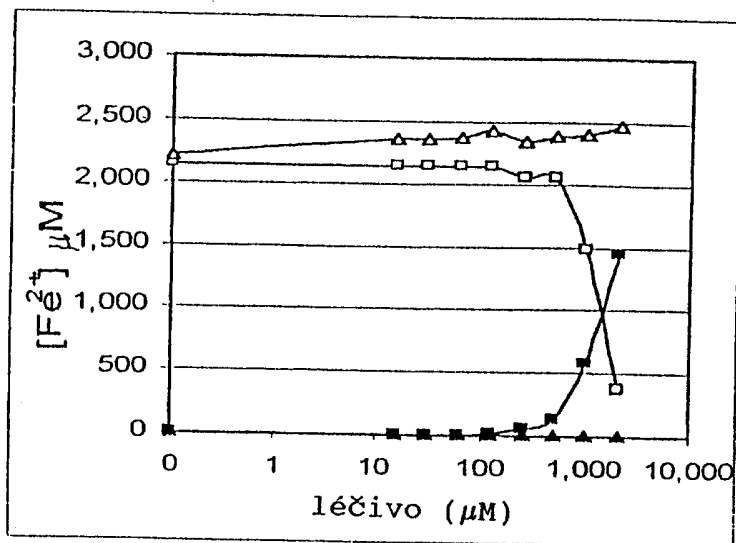
substituované nebo nesubstituované skupiny ArCH_2 , a M znamená jakýkoliv fyziologicky přijatelný kation.

35. Způsob podle nároku 34, v y z n a č u j í c í s e t í m, že R znamená monoalkylether mono-, di- a tri-ethylenglykolu.
36. Způsob podle nároku 34, v y z n a č u j í c í s e t í m, že R je vybrána ze skupiny sestávající z C_2H_5 , C_3H_7 , $\text{iso-C}_3\text{H}_7$, C_4H_9 , C_7H_{15} , C_8H_{17} , $\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$, $\text{CH}_3\text{OCH}_2\text{CH}_2$, $\text{C}_2\text{H}_5\text{OCH}_2\text{CH}_2$, $\text{C}_3\text{H}_7\text{OCH}_2\text{CH}_2$, $\text{C}_4\text{H}_9\text{OCH}_2\text{CH}_2$, $\text{C}_7\text{H}_{15}\text{OCH}_2\text{CH}_2$, $\text{C}_8\text{H}_{17}\text{OCH}_2\text{CH}_2$, $\text{C}_{10}\text{H}_{21}\text{OCH}_2\text{CH}_2$, $\text{C}_{16}\text{H}_{23}\text{OCH}_2\text{CH}_2$, $\text{C}_{18}\text{H}_{37}\text{OCH}_2\text{CH}_2$, $\text{CH}_3(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_2$, $\text{C}_2\text{H}_5\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2)_2$, $\text{C}_4\text{H}_9(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_2$, $\text{C}_6\text{H}_{13}(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_2$, $\text{C}_7\text{H}_{15}(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_2$, $\text{C}_8\text{H}_{17}(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_2$, $\text{C}_{10}\text{H}_{21}(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_2$, $\text{CH}_3(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_3$, $(\text{CH}_3)_2\text{NCH}_2\text{CH}_2$ a $\text{C}_7\text{H}_{15}(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_3$.
37. Způsob podle nároku 34, v y z n a č u j í c í s e t í m, že R je vybrána ze skupiny sestávající z C_2H_5 , C_3H_7 , C_4H_9 , C_7H_{15} , C_8H_{17} , $\text{C}_8\text{H}_{17}\text{OCH}_2\text{CH}_2$, $\text{C}_{10}\text{H}_{21}\text{OCH}_2\text{CH}_2$, $\text{C}_{16}\text{H}_{23}\text{OCH}_2\text{CH}_2$, $\text{C}_{18}\text{H}_{37}\text{OCH}_2\text{CH}_2$, $\text{C}_8\text{H}_{17}(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_2$ a $\text{C}_{10}\text{H}_{21}(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_2$.
38. Způsob podle nároku 37, v y z n a č u j í c í s e t í m, že R znamená skupinu C_8H_{17} .
39. Způsob podle nároku 37, v y z n a č u j í c í s e t í m, že R znamená skupinu $\text{C}_8\text{H}_{17}\text{OCH}_2\text{CH}_2$.
40. Způsob podle kteréhokoliv z nároků 27 až 39, v y z n a č u j í c í s e t í m, že onemocnění nebo porucha související s nadbytkem intracelulárních Ca^{++} iontů je vybrána ze skupiny sestávající z mozkové a srdeční ischemie, infarktu, infarktu myokardu, epilepsie, Alzheimerovy choroby, Parkinsonovy choroby, akutního zánětu, urinární inkontinence, hypertrofie prostaty, svalových křečí, arteriální hypertenze, astmatu a syndromu podráždění střev.

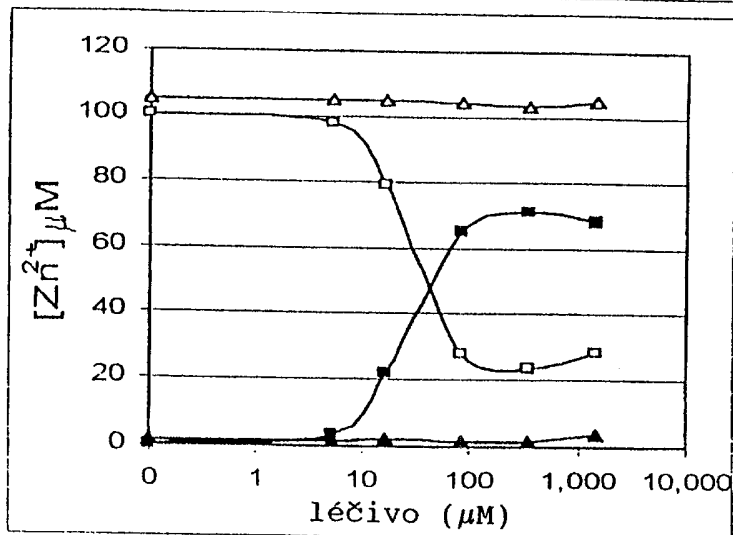
41. Způsob podle kteréhokoliv z nároků 27 až 39, vyznačující se tím, že onemocnění nebo porucha související s nadbytkem intracelulárních Ca^{++} iontů znamená mozkovou a srdeční ischemii, infarkt, epilepsii, Alzheimerovu chorobu nebo srdeční arytmii.

Zastupuje:

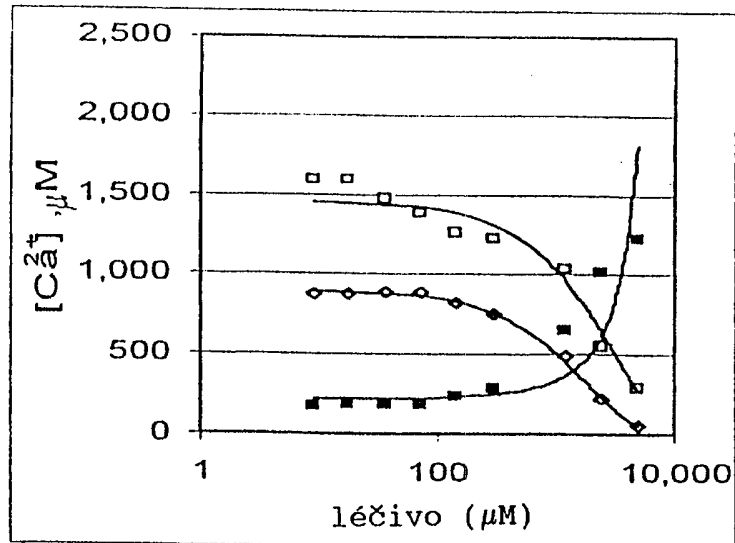
Obr. 1A



Obr. 1 B

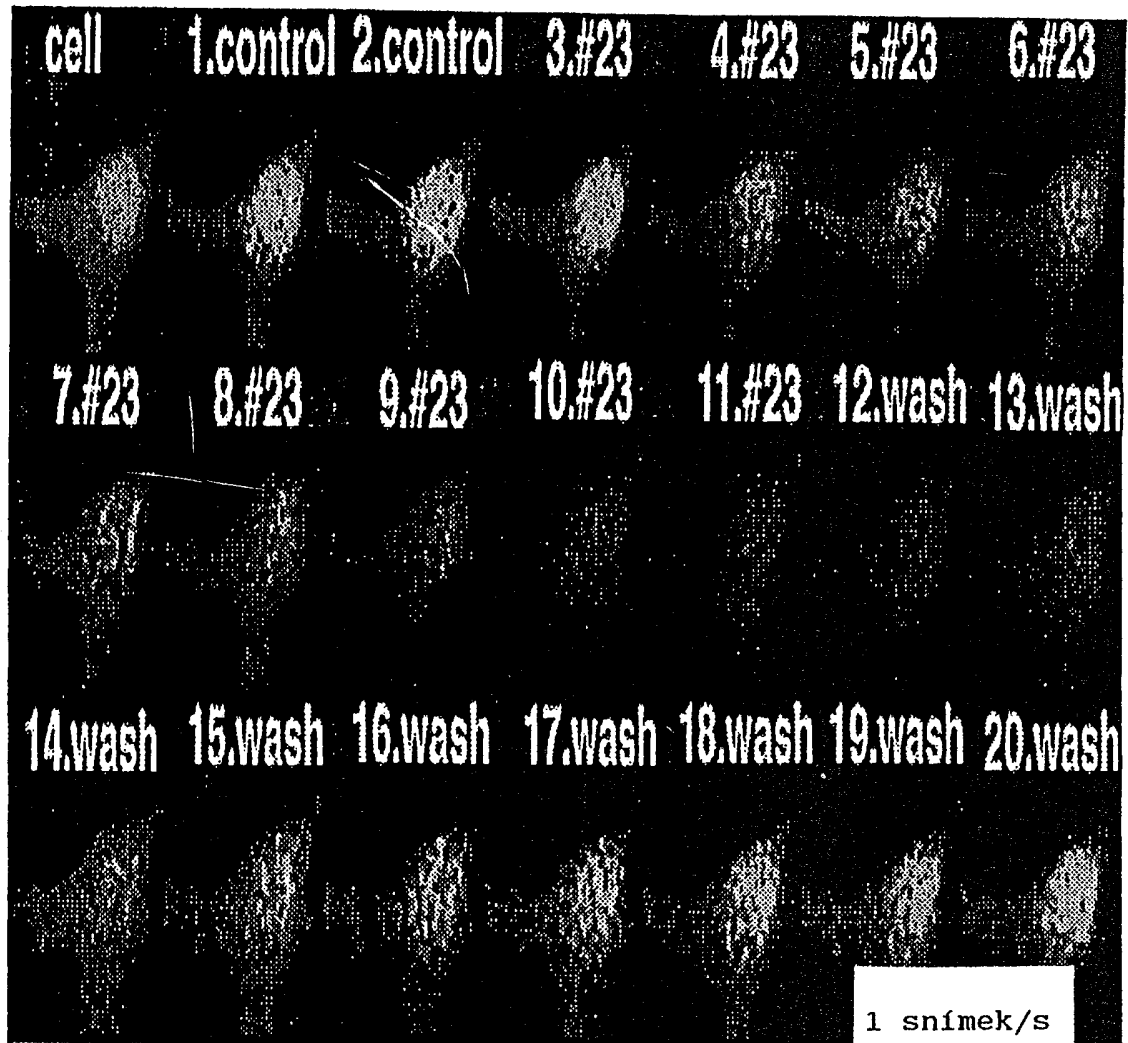


Obr. 1C



7V 2000 - 1065
24.03.00

2 / 12



Obr. 2

Na obrázku 2:

cell znamená buňka

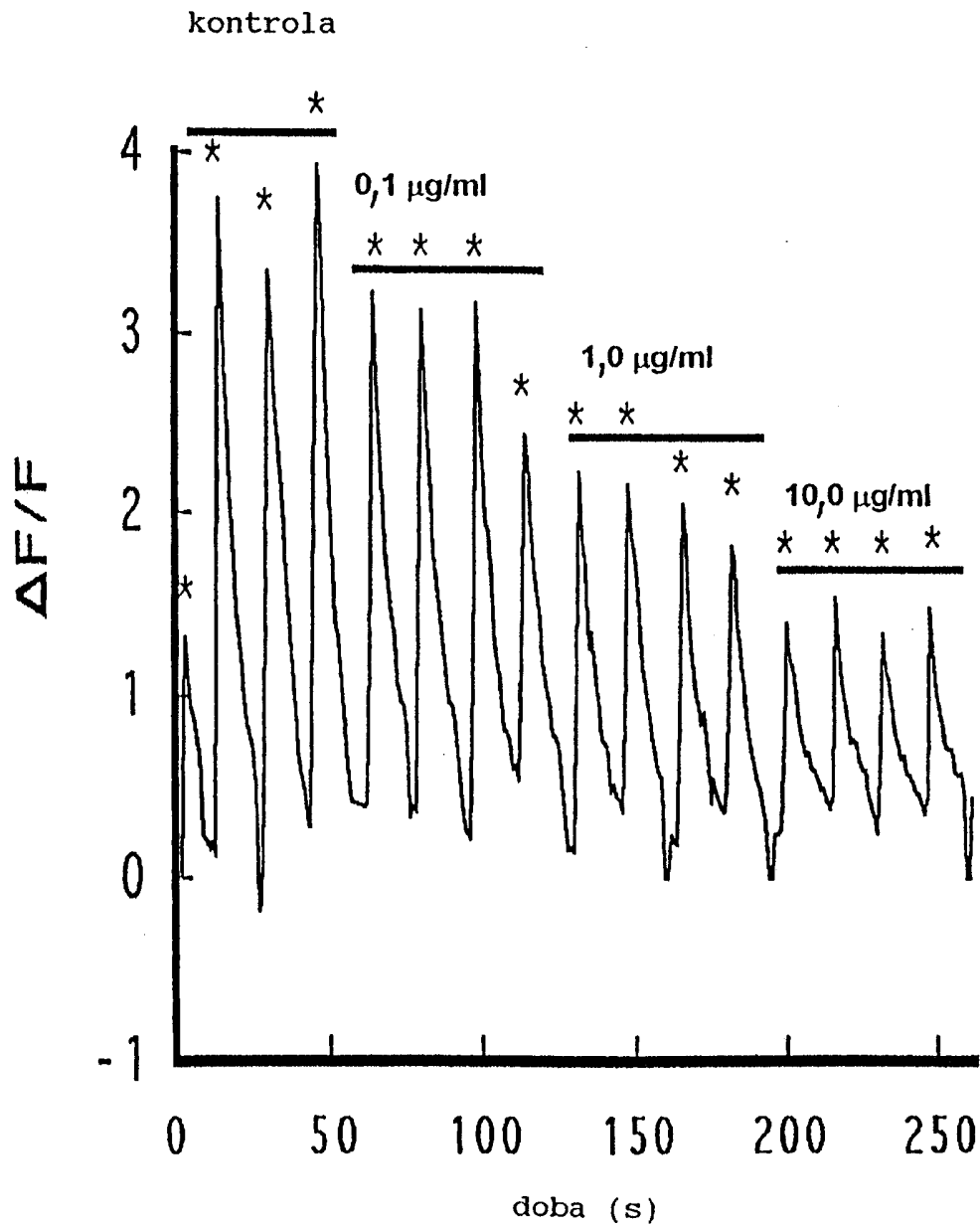
control znamená kontrola

wash znamená promytí

11.4.2000 *[signature]*

24.03.00

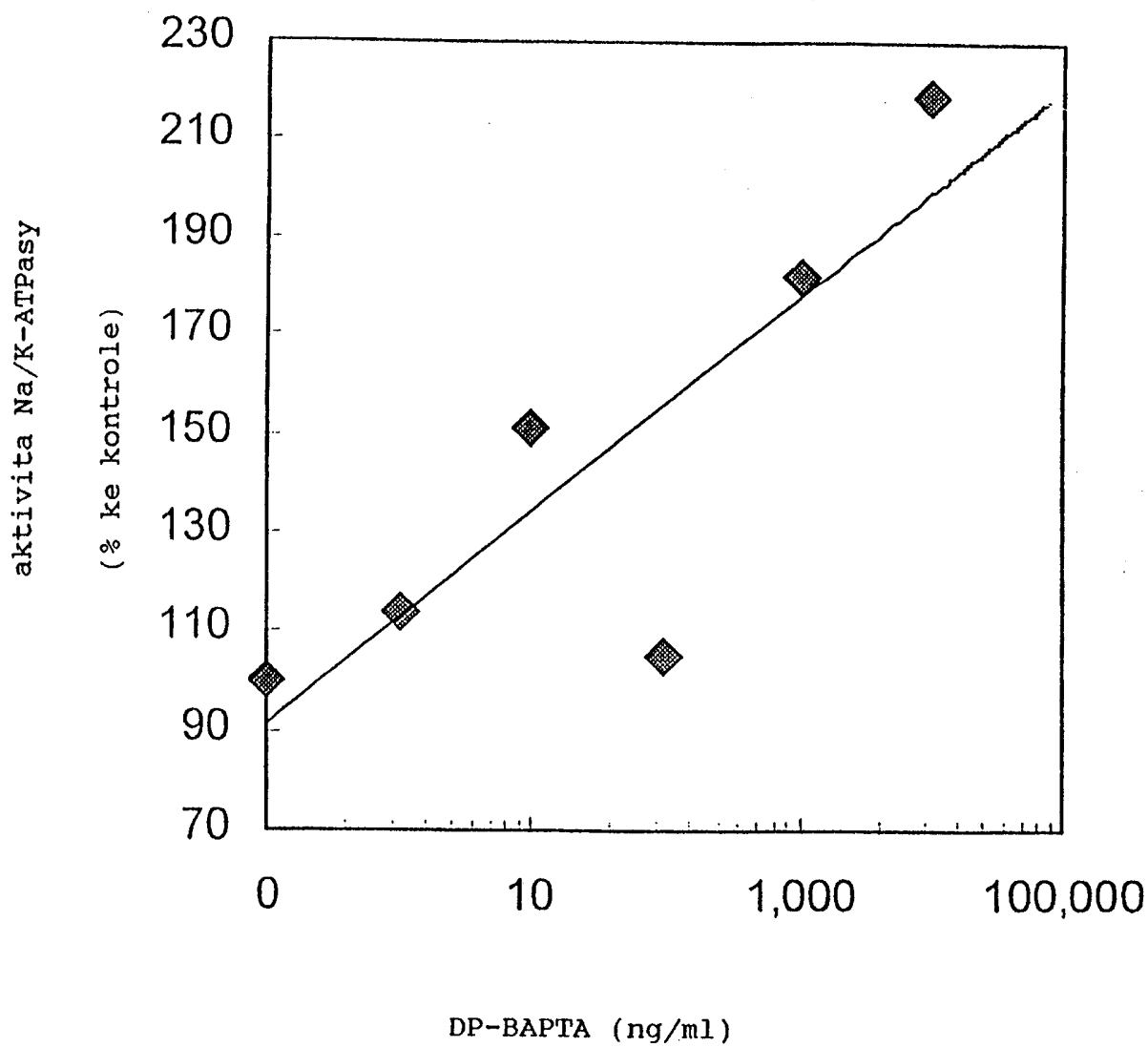
3/12



Obr. 3

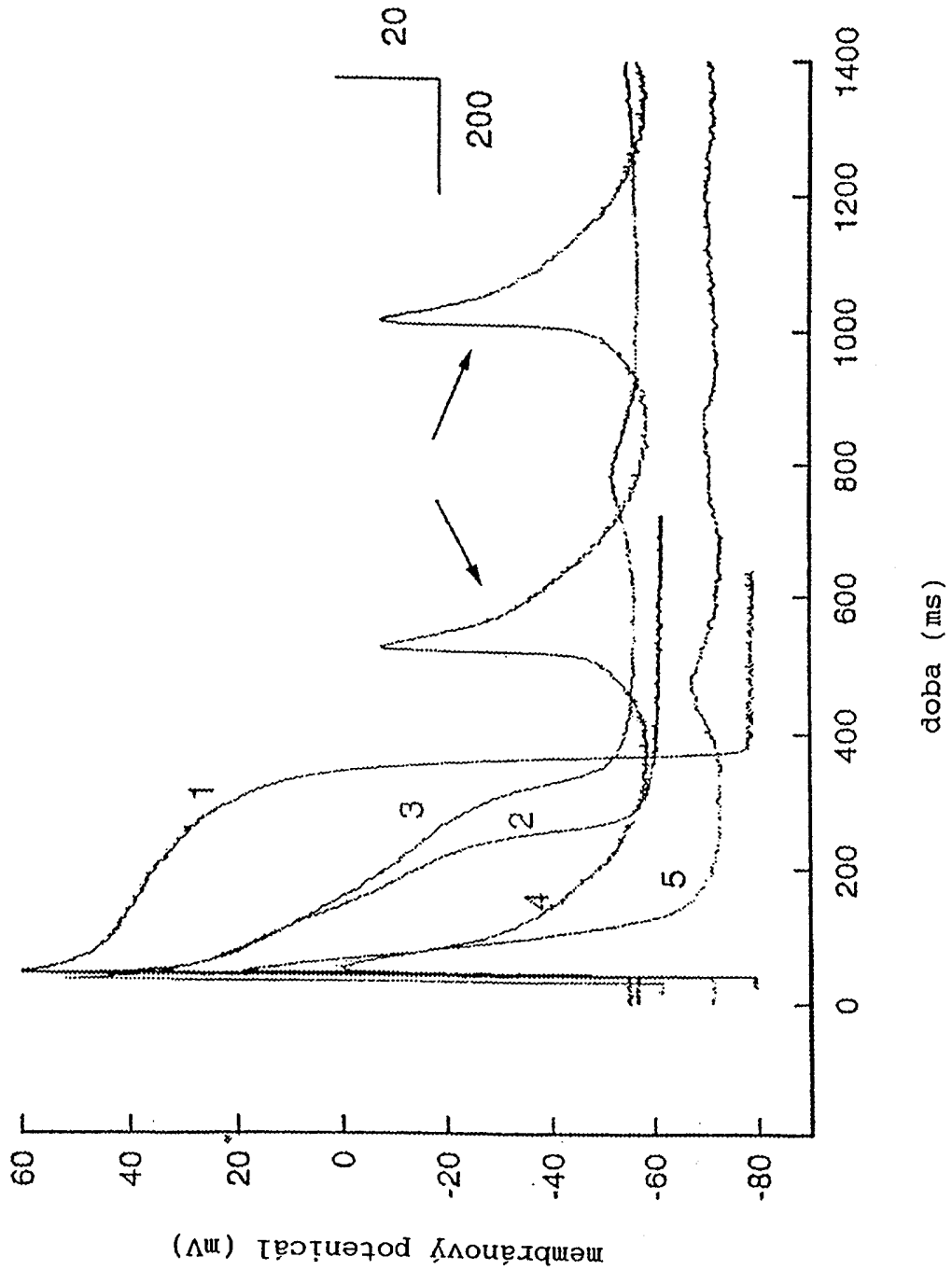
17.4.2000

4 / 12



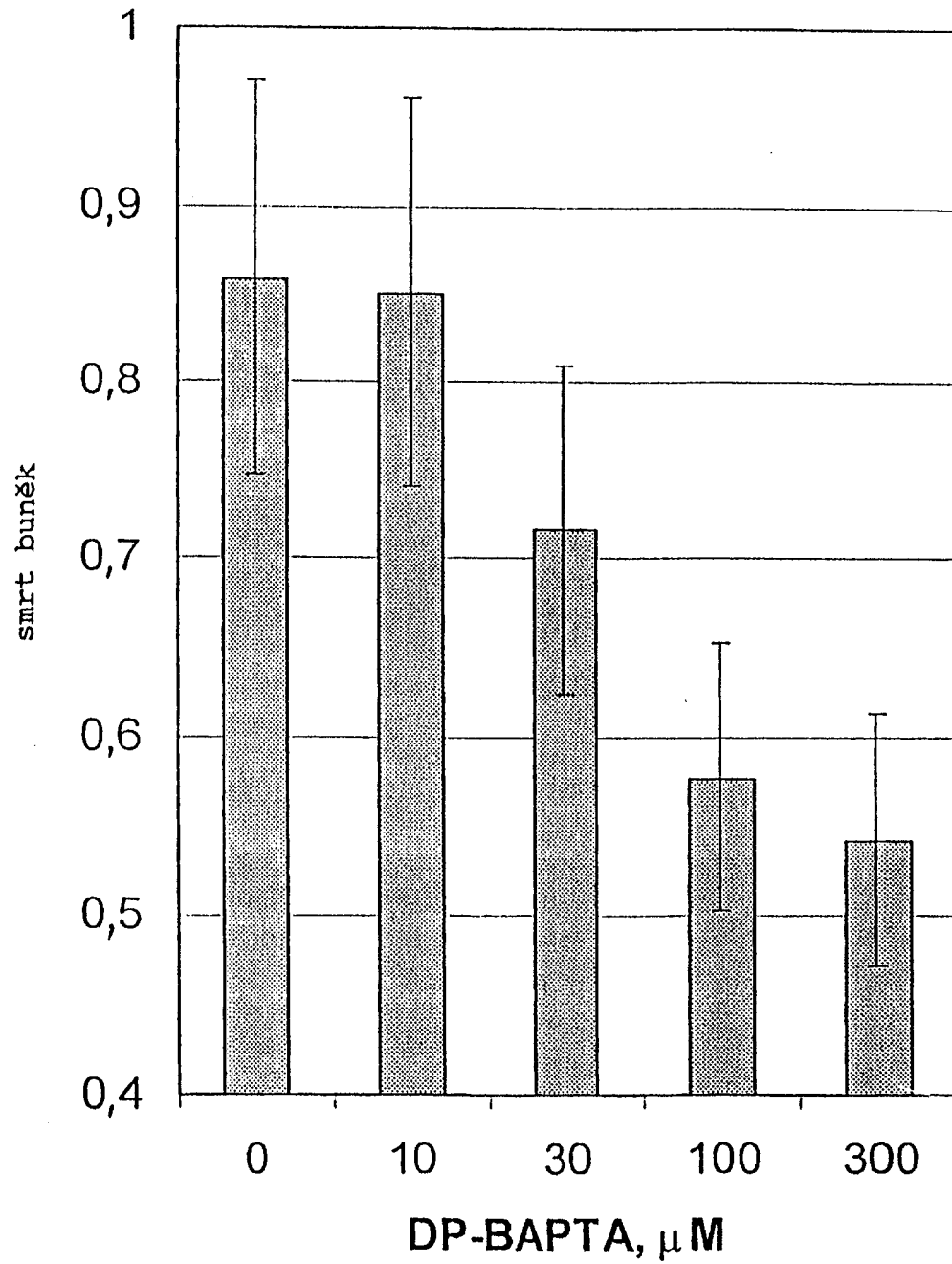
Obr. 4

17.4.2000 *[signature]*



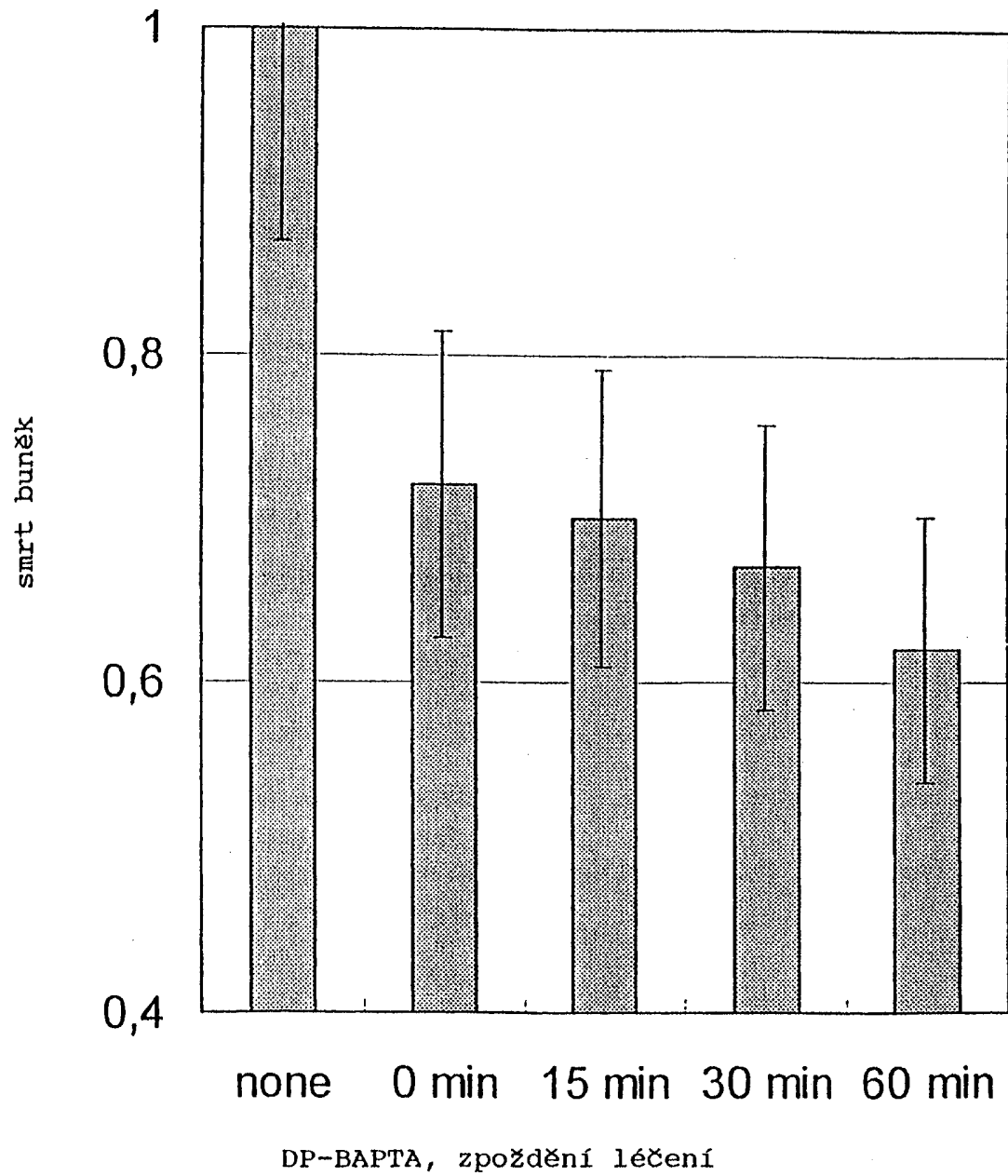
Obr. 5

19. 4. 2000 *[signature]*

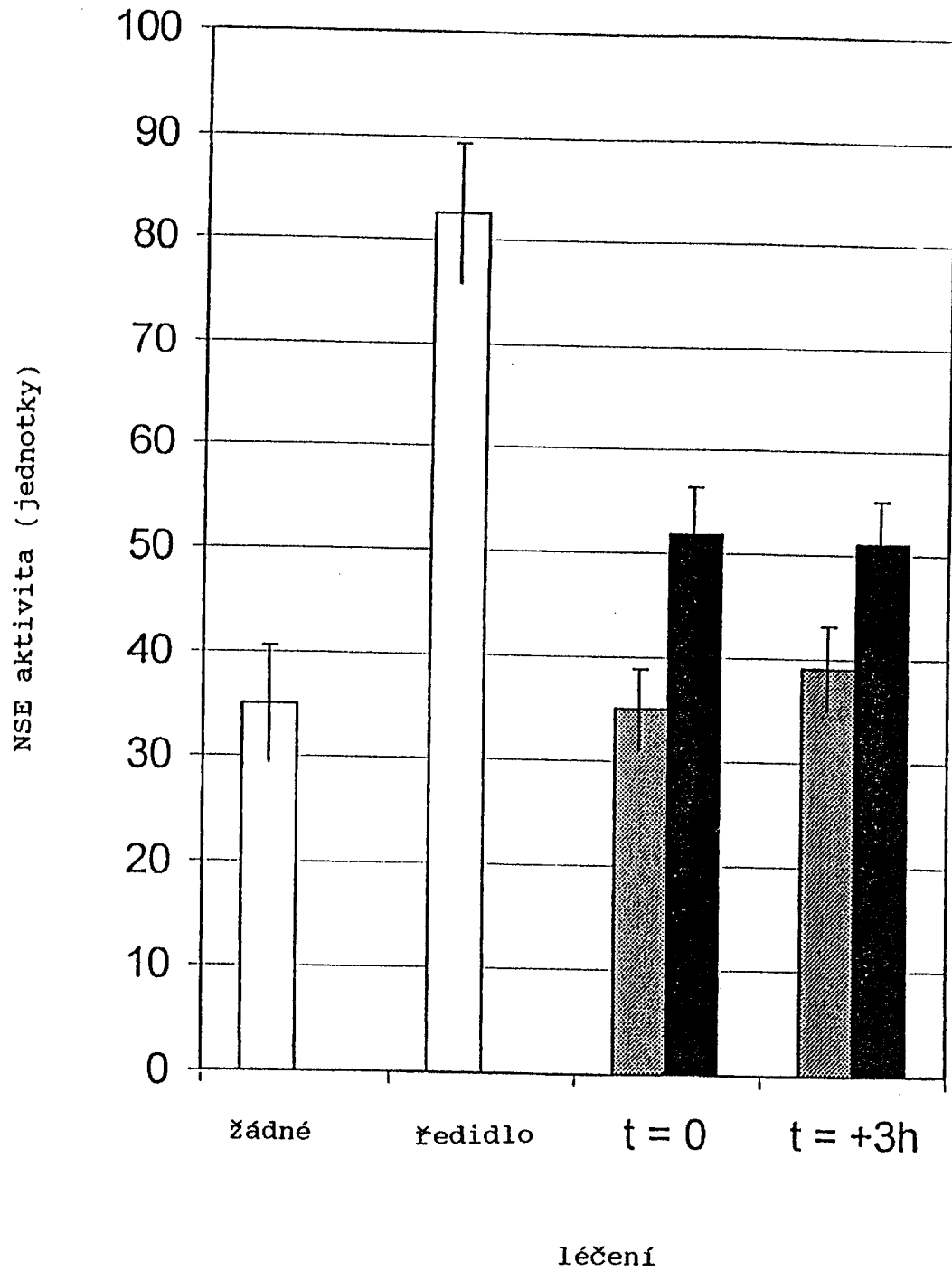


Obr. 6

7/12



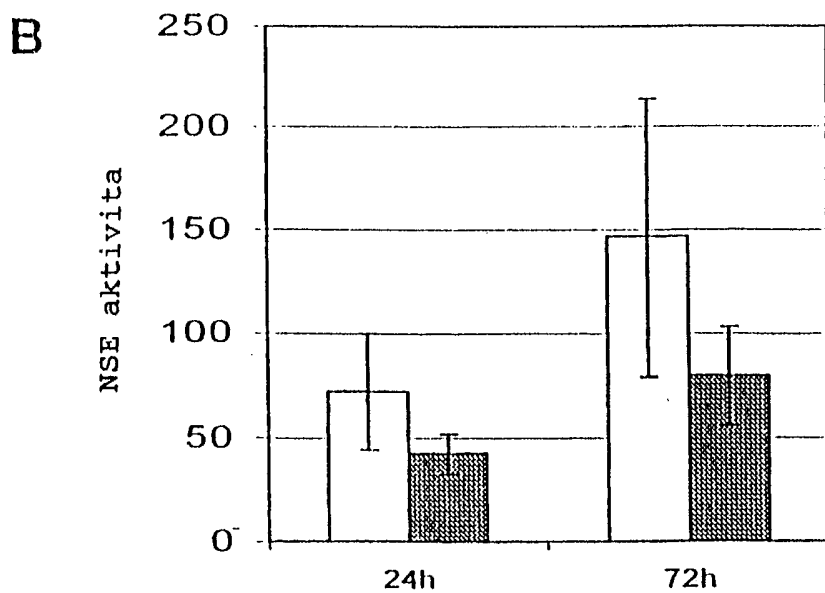
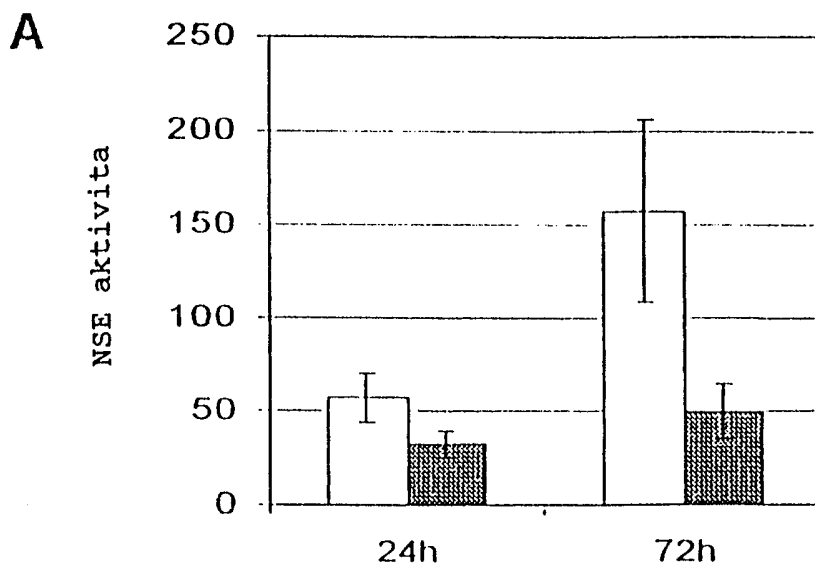
Obr. 7



Obr. 8

17. 4. 2000 *kurva*

9/12

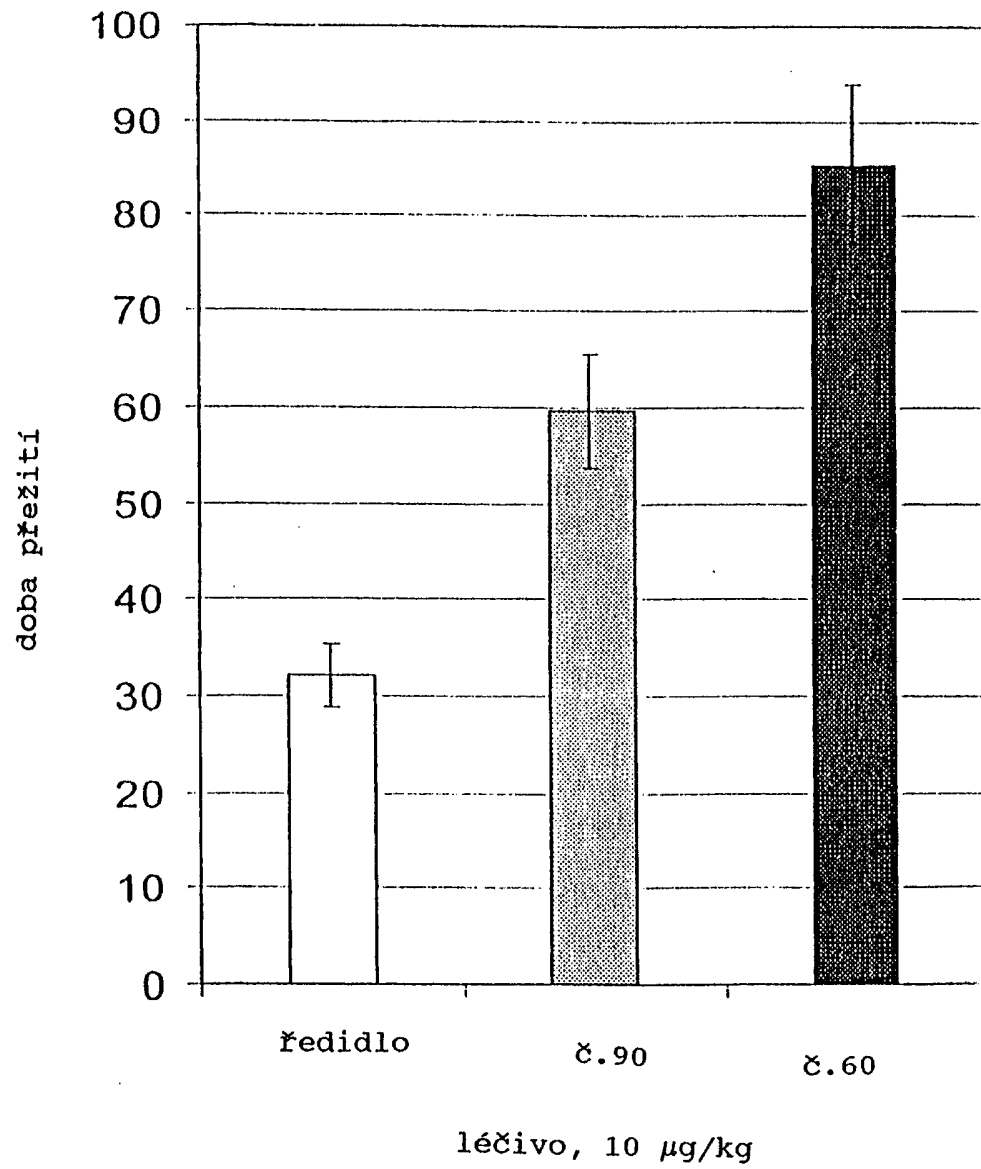


Obr. 9

17. 4. 2000

7V 2000-1065
24.03.00

10/12

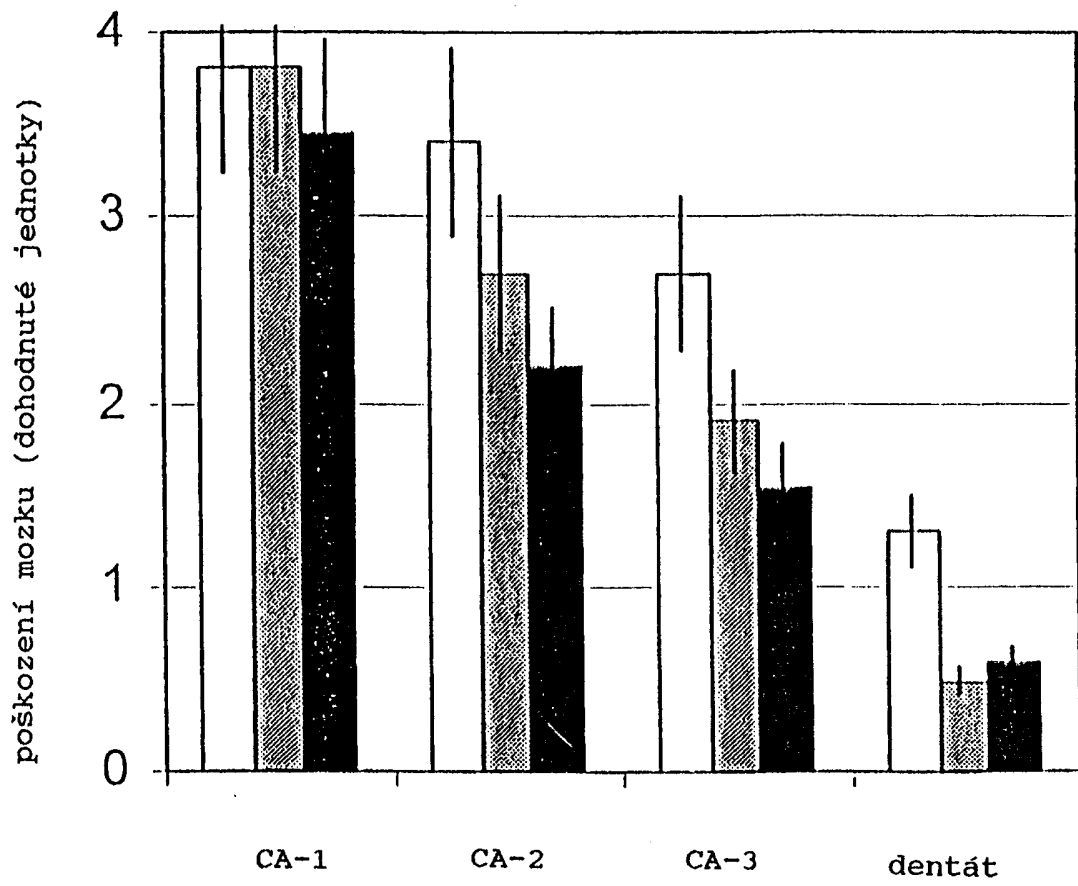


Obr. 10

17.4.2000 *[signature]*

24.03.00

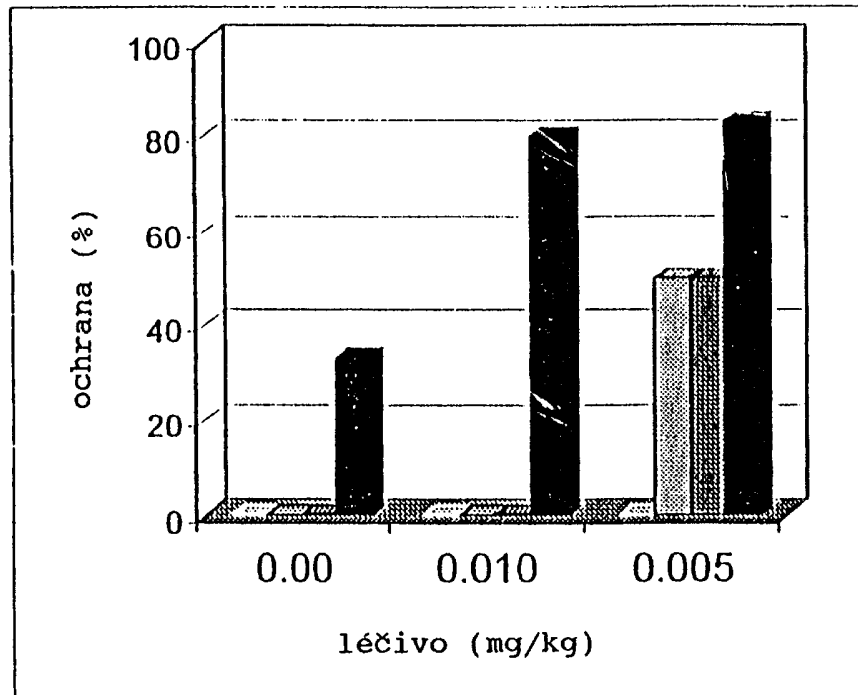
11 / 12



Obr. 11

11. 4. 2000 *hany*

12 / 12



Obr. 12

M. G. 2000 *[signature]*