

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

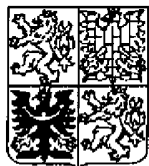
zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

201-99

(19)

ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **25. 07. 97**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **25.07.96**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **96/686346**

(33) Země priority: **US**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **15. 09. 99**
(Věstník č. 9/99)

(86) PCT číslo: **PCT/EP97/04057**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 98/04556**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.⁶:

C 07 D 471/04
A 61 K 31/50

// (C 07 D 471/04,
C 07 D 237:00, C 07 D 221:00)

(71) Přihlášovatel:

MERZ + CO. GMBH & CO., Frankfurt am
Main, DE;

(72) Původce:

Danysz Wojciech, Nidderau, DE;
Gold Markus, Nauheim, DE;
Kalvinsh Ivars, Salaspils, LV;
Parsons Christopher Graham Raphael,
Praunheim, DE;
Piskunova Irene, Riga, LV;
Rozhkov Eugene, Riga, LV;

(74) Zástupce:

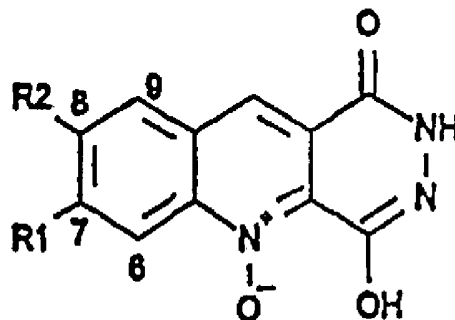
Čermák Karel Dr., Národní 32, Praha 1,
11000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Deriváty pyridazino [4,5-B] chinolin-5-
oxidu, způsob jejich přípravy
a jejich použití jako antagonistů glycinu**

(57) Anotace:

Pyridyl-ftalazindiony mající vzorec /I/, kde
R1 a R2 jsou vybrány ze skupiny zahrnující
vodík, halogen a methoxy nebo kde R1 a R2
dohromady tvoří methylen-dioxyskupinu a je-
jich farmaceuticky přijatelné soli, a farmace-
utické prostředky obsahující tyto sloučeniny
v množství účinném pro antagonizování gly-
cinu místa, jsou užitečné v léčbě neurolo-
gických onemocnění spojených s oxidační to-
xicitou a chybnou funkcí glutamatergního ne-
uronálního přenosu u živých zvířat, včetně
lidí, potřebujících takovou léčbu.



Deriváty pyridazino[4,5-B]chinolin-5-oxidu, způsob jejich přípravy a jejich použití jako antagonistů glycinu

Oblast techniky

Předkládaný vynález se týká nových chemických sloučenin pyrido-ftalazindionů, farmaceutických prostředků obsahujících tyto sloučeniny a jejich použití pro léčbu neurologických onemocnění spojených s excitační toxicitou a chybnou funkcí glutamatergního nervového přenosu.

Dosavadní stav techniky

Glutamat je pravděpodobně hlavní excitační přenašeč v centrálním nervovém systému, ale pravděpodobně se také účastní mnoha patologických dějů a dějů s excitační toxicitou. Proto existuje značný zájem o vývoj antagonistů glutamatu pro terapeutické účely (viz Danysz et al., 1995). Glutamat aktivuje tři typy hlavní ionotropních receptorů, konkrétně receptory pro α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionovou kyselinu (AMPA), kainat a N-methyl-D-aspartat (NMDA) a několik typů metabotropních receptorů. Antagonizace NMDA receptorů má potenciálně široký rozsah terapeutických aplikací. Funkční inhibice NMDA receptorů může být dosažena pomocí účinku na různých rozpoznávacích místech, jako je primární místo pro neuropřenašeč, glycinové místo nesensitivní na strychnin (glycin_B), polyaminové místo a fencyklidinové místo lokalizované uvnitř kationtového kanálu.

Znecitlivění receptoru může představovat fyziologický proces sloužící jako endogenní kontrolní mechanismus pro zabránění dlouhodobé neurotoxické aktivace glutamatových receptorů, ale umožňuje jejich přechodnou fyziologickou aktivaci. V případě NMDA receptorů je ko-agonista glycin endogenním ligandem

inhibujícím takové znečitlivění pomocí aktivace glycin_B místa. Zajímavé je, že ischemie zvyšuje nejen koncentraci extracelulárního glutamatu, ale také glycinu a ačkoliv je druhý uvedený účinek méně výrazný, přetrvává mnohem déle. Proto mohou někteří úplní antagonisté glycinu_B obnovit normální synaptický přenos za takových podmínek zvýšením znečitlivění NMDA receptoru na jeho fyziologickou úroveň. Kromě toho, při podání antagonistů glycinu laboratorním zvířatům bylo naznačeno, že umožňují lepší terapeutické okénko než činidla působící na jiných rozpoznávacích místech NMDA receptorového komplexu. Naneštěstí špatné farmakokinetické vlastnosti většiny antagonistů glycin_B místa donedávna vylučovaly jasné potvrzení této hypotese po systémovém podání. Nicméně, bylo popsáno, že někteří antagonisté glycinu mají velmi dobré terapeutické účinky po systémovém podání v modelech hyperalgesie a jako anxiolytika.

Podstata vynálezu

Nyní jsme vyvinuli serii tricyklických "pyrido-ftalazindionů". Sloučeniny třídy I jsou strukturálně příbuzné s patentovanými antagonisty glycinu_B od Zeneca (ICI, EPA 0516297 A1, 2.12.1992). Třída II sloučenin jsou N-oxidové deriváty těchto sloučenin a nejsou popsány ani naznačeny v patentu pro Zeneca. Sloučeniny třídy II jsou také účinní antagonisté glycinu_B in vitro a vykazují mnohem lepší in vivo systémovou dostupnost a/nebo průnik přes hematoencefalickou bariéru než sloučeniny třídy I. Kromě toho, soli těchto sloučenin, vyrobené například adicí cholinu a 4-tetramethylamoniaku (4-NH₃), mají dále zlepšenou biodostupnost.

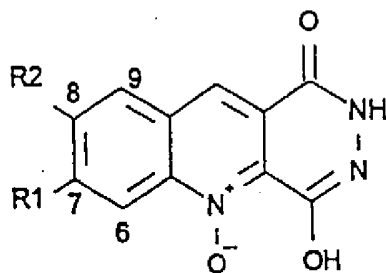
Nové sloučeniny podle předkládaného vynálezu mají předpokládané využití v léčbě následujících onemocnění. 1. Akutní excitační toxicity jako je ischemie při mrtvici, traumatu, hypoxii, hypoglykemií a hepatální encefalopatii. 2. Chronických

neurodegenerativních onemocnění jako je Alzheimerova nemoc, vaskulární demence, Parkinsonova nemoc, Huntingtonova nemoc, roztroušená sklerosa, amyotrofická laterální sklerosa, AIDS-neurodegenerace, olivopontocerebellární atrofie, Tourettův syndrom, onemocnění motorických neuronů, mitochondriální dysfunkce, Korsakoffův syndrom a Creutzfeldt-Jakobova nemoc. 3. Jiných onemocnění souvisejících s dlouhodobými plastickými změnami v centrálním nervovém systému jako je chronická bolest, léková tolerance, závislost a návyk (například na opiáty, kokain, benzodiazepiny a alkohol) a tarditivní dyskinesa. 4. Epilepsie (generalizovaných a částečných záchvatů), schizofrenie, úzkosti, deprese, akutní bolesti, spasticity a tinitu.

Předmětem předkládaného vynálezu je poskytnutí nových a účinnějších pyridino-ftalazindionových sloučenin, farmaceutických prostředků obsahujících tyto sloučeniny, a způsobů léčby neurologických onemocnění spojených s excitační toxicitou a chybou funkcí glutamatergního nervového přenosu. Dalším předmětem předkládaného vynálezu jsou takové nové sloučeniny, prostředky a způsoby, které splňují uvedené teoretické požadavky. Další předměty budou zřejmě z dalšího popisu a ještě další předměty budou jasné odborníkům v oboru.

Vynález proto obsahuje následující aspekty, mimo jiné, jednotlivě nebo v kombinaci:

Sloučeninu vybranou z pyridyl-ftalazindionů majících následující vzorec:



kde R1 a R2 jsou vybrány ze skupiny zahrnující vodík, halogen a methoxy nebo kde R1 a R2 dohromady tvoří methylendioxy a její farmaceuticky přijatelné soli; jako je

sloučenina, kde je sůl vybrána z cholinu a 4-tetramethylamonné soli; jako je

sloučenina, která je vybrána ze skupiny zahrnující
4-hydroxy-1-oxo-1,2-dihydro-pyridazino[4,5-b]-chinolin-5-oxid,
8-chlor-4-hydroxy-1-oxo-1,2-dihydropyridazino[4,5-b]-chinolin-
-5-oxid,
8-brom-4-hydroxy-1-oxo-1,2-dihydropyridazino[4,5-b]-chinolin-
-5-oxid,
8-fluor-4-hydroxy-1-oxo-1,2-dihydropyridazino[4,5-b]-chinolin-
-5-oxid,
7,8-dichlor-4-hydroxy-1-oxo-1,2-dihydropyridazino[4,5-b]-
-chinolin-5-oxid,
7-brom-8-chlor-4-hydroxy-1-oxo-1,2-dihydropyridazino[4,5-b]-
-chinolin-5-oxid, a
7-chlor-8-brom-4-hydroxy-1-oxo-1,2-dihydropyridazino[4,5-b]-
-chinolin-5-oxid, a farmaceuticky přijatelnou sůl jakékoliv z
výše uvedených sloučenin; a jako je sloučenina, která je vybrána
ze skupiny zahrnující
4-hydroxy-1-oxo-1,2-dihydro-pyridazino[4,5-b]-chinolin-5-oxid-
-cholinová sůl,
8-chlor-4-hydroxy-1-oxo-1,2-dihydropyridazino[4,5-b]-chinolin-
-5-oxid-cholinová sůl,
8-brom-4-hydroxy-1-oxo-1,2-dihydropyridazino[4,5-b]-chinolin-
-5-oxid-cholinová sůl,
8-fluor-4-hydroxy-1-oxo-1,2-dihydropyridazino[4,5-b]-chinolin-
-5-oxid-cholinová sůl,
7,8-dichlor-4-hydroxy-1-oxo-1,2-dihydropyridazino[4,5-b]-
-chinolin-5-oxid-cholinová sůl,
7-brom-8-chlor-4-hydroxy-1-oxo-1,2-dihydropyridazino[4,5-b]-
-chinolin-5-oxid-cholinová sůl, a

7-chlor-8-brom-4-hydroxy-1-oxo-1,2-dihydropyridazino[4,5-b]-
-chinolin-5-oxid-cholinová sůl.

Dále, farmaceutický prostředek obsahující jako aktivní složku účinné množství takové sloučeniny pro antagonizaci glycin_B místa; jako je farmaceutický prostředek obsahující jako aktivní složku účinné množství takové sloučeniny pro antagonizaci glycin_B místa ve formě její cholinové soli; jako je

farmaceutický prostředek obsahující jako aktivní složku účinné množství sloučeniny pro antagonizaci glycin_B místa, kde sloučenina je vybrána ze skupiny zahrnující:

4-hydroxy-1-oxo-1,2-dihydro-pyridazino[4,5-b]-chinolin-5-oxid,
8-chlor-4-hydroxy-1-oxo-1,2-dihydropyridazino[4,5-b]-chinolin-
-5-oxid,

8-brom-4-hydroxy-1-oxo-1,2-dihydropyridazino[4,5-b]-chinolin-
-5-oxid,

8-fluor-4-hydroxy-1-oxo-1,2-dihydropyridazino[4,5-b]-chinolin-
-5-oxid,

7,8-dichlor-4-hydroxy-1-oxo-1,2-dihydropyridazino[4,5-b]-
-chinolin-5-oxid,

7-brom-8-chlor-4-hydroxy-1-oxo-1,2-dihydropyridazino[4,5-b]-
-chinolin-5-oxid, a

7-chlor-8-brom-4-hydroxy-1-oxo-1,2-dihydropyridazino[4,5-b]-
-chinolin-5-oxid, nebo farmaceuticky přijatelnou sůl jakékoliv z
výše uvedených sloučenin; a

farmaceutický prostředek obsahující jako aktivní složku účinné množství sloučeniny pro antagonizaci glycin_B místa, kde sloučenina je vybrána ze skupiny zahrnující:

4-hydroxy-1-oxo-1,2-dihydro-pyridazino[4,5-b]-chinolin-5-oxid-
cholinová sůl,

8-chlor-4-hydroxy-1-oxo-1,2-dihydropyridazino[4,5-b]-chinolin-
-5-oxid-cholinová sůl,

8-brom-4-hydroxy-1-oxo-1,2-dihydropyridazino[4,5-b]-chinolin-

14.04.99

-5-oxid-cholinová sůl,
 8-fluor-4-hydroxy-1-oxo-1,2-dihydropyridazino[4,5-b]-chinolin-
 -5-oxid-cholinová sůl;
 7,8-dichlor-4-hydroxy-1-oxo-1,2-dihydropyridazino[4,5-b]-
 -chinolin-5-oxid-cholinová sůl,
 7-brom-8-chlor-4-hydroxy-1-oxo-1,2-dihydropyridazino[4,5-b]-
 -chinolin-5-oxid-cholinová sůl, a
 7-chlor-8-brom-4-hydroxy-1-oxo-1,2-dihydropyridazino[4,5-b]-
 -chinolin-5-oxid, cholinová sůl.

Dále, způsob pro léčbu neurologických onemocnění spojených s excitační toxicitou a chybou funkcí glutamatergního nervového přenosu u živých živočichů, ve kterém je živému živočichu, který potřebuje takovou léčbu, podáno množství takové sloučeniny nebo farmaceutického prostředku, které je účinné pro antagonizaci glycin_u místa; jako je například způsob, ve kterém je sloučenina ve formě cholinové soli; jako je například způsob, ve kterém je sloučenina vybrána ze skupiny zahrnující:

4-hydroxy-1-oxo-1,2-dihydro-pyridazino[4,5-b]-chinolin-5-oxid,
 8-chlor-4-hydroxy-1-oxo-1,2-dihydropyridazino[4,5-b]-chinolin-
 -5-oxid,
 8-brom-4-hydroxy-1-oxo-1,2-dihydropyridazino[4,5-b]-chinolin-
 -5-oxid,
 8-fluor-4-hydroxy-1-oxo-1,2-dihydropyridazino[4,5-b]-chinolin-
 -5-oxid,
 7,8-dichlor-4-hydroxy-1-oxo-1,2-dihydropyridazino[4,5-b]-
 -chinolin-5-oxid,
 7-brom-8-chlor-4-hydroxy-1-oxo-1,2-dihydropyridazino[4,5-b]-
 -chinolin-5-oxid, a
 7-chlor-8-brom-4-hydroxy-1-oxo-1,2-dihydropyridazino[4,5-b]-
 -chinolin-5-oxid, nebo farmaceuticky přijatelnou sůl jakékoliv z
 výše uvedených sloučenin; a jako je
 způsob pro léčbu neurologických onemocnění spojených s

excitační toxicitou a chybnou funkcí glutamatergního nervového přenosu u živých živočichů, ve kterém je živému živočichu, který potřebuje takovou léčbu, podáno množství takové sloučeniny nebo farmaceutického prostředku, které je účinné pro antagonizaci glycin_u místa, kde je sloučenina vybrána ze skupiny zahrnující: 4-hydroxy-1-oxo-1,2-dihydro-pyridazino[4,5-b]-chinolin-5-oxid, cholinová sůl,

8-chlor-4-hydroxy-1-oxo-1,2-dihydropyridazino[4,5-b]-chinolin-5-oxid-cholinová sůl,

8-brom-4-hydroxy-1-oxo-1,2-dihydropyridazino[4,5-b]-chinolin-5-oxid-cholinová sůl,

8-fluor-4-hydroxy-1-oxo-1,2-dihydropyridazino[4,5-b]-chinolin-5-oxid-cholinová sůl,

7,8-dichlor-4-hydroxy-1-oxo-1,2-dihydropyridazino[4,5-b]-chinolin-5-oxid-cholinová sůl,

7-brom-8-chlor-4-hydroxy-1-oxo-1,2-dihydropyridazino[4,5-b]-chinolin-5-oxid-cholinová sůl, a

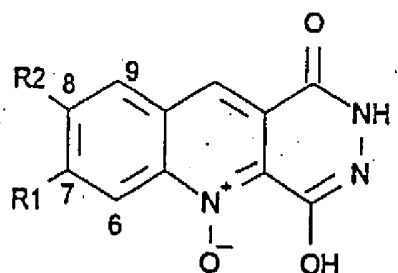
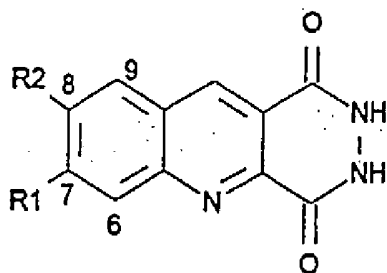
7-chlor-8-brom-4-hydroxy-1-oxo-1,2-dihydropyridazino[4,5-b]-chinolin-5-oxid-cholinová sůl.

Následující popis, příklady a farmakologie jsou uvedeny pro ilustraci a nijak neomezují rozsah předkládaného vynálezu.

Příklady provedení vynálezu

Metody a výsledky

Základní struktura tricyklických "pyrido-ftalazindionů" třídy I a II



14.04.99

R1/R2 = H a/nebo halogen

R1/R2 = H a/nebo O-CH₃

R1/R2 = H a/nebo methylendioxy

Chemická část

Obecný postup pro přípravu dimethyl-chinolin-2,3-dikarboxylat-1-oxidů (3)

Chladný (v ledové lázni) roztok 2-nitrobenzaldehydu 1 (25 mM) a sodíku (27 mM) v bezvodém methanolu (40 ml) se zpracuje během 30 minut s roztokem dimethyl(diethoxyfosfynyl)sukcinatem 2 (30 mM, připraveným technikou popsanou v S. Linke et al., Lieb. Ann. Chem. 1980(4), 542) v bezvodém methanolu (10 ml). Vzniklý tmavý roztok se míchá při 0-5 °C po dobu 1,5 hodiny, rozpouštědlo se odpaří za redukováného tlaku a zbytek se rozdělí mezi ethylacetat a vodu. Ethylacetat se suší přes síran sodný a potom se odpaří za redukováného tlaku. Zbytek se rekrystalizuje z isopropanolu za zisku titulního dimethyl-chinolin-2,3-dikarboxylat-1-oxidu 3 jako špinavě bílého (nebo světle žlutého) prášku.

Fyzikální charakteristiky a ¹H-NMR spektrální data sloučenin 3 jsou uvedeny v tabulkách 1 a 2.

a. 5-brom-4-chlor-2-nitrobenzaldehyd (1f)

Do směsi kyseliny sírové (40 ml) a dusičnanu sodného (2,66 g, 31,3 mM) při 0-5 °C se přidá 3-brom-4-chlorbenzaldehyd (6,25 g, 28,5 mM). Vzniklá směs se míchá při pokojové teplotě po dobu 7 hodin a potom se ředí ledovou vodou (300 ml). Vysrážené pevné látky se filtrují, promyjí se vodou a suší se za zisku prášku. Při rekrystalizaci tohoto materiálu ze směsi isopropanolu a vody (2:1) se získá titulní 2-nitrobenzaldehyd 1f (3,6 g, 51,5%) jako

světle žlutý prášek, t.t. 81 - 82 °C.

Analýza pro $C_7H_3BrClNO_3$:

Vypočítáno (%): C 31,79, H 1,14, N 5,30

Zjištěno (%): C 31,55, H 0,98, N 5,09

1H -NMR ($CDCl_3$) δ : 8,22 (s, 1H), 8,23 (s, 1H), 10,39 (s, 1H).

b. 4-brom-5-chlor-2-nitrobenzaldehyd (1g)

Postupem podle stupně (a) s tou výjimkou, že jako výchozí materiál se použije 4-brom-3-chlorbenzaldehyd (2,97 g, 13,5 mM) se získá titulní sloučenina 1g (1,9 g, 53,0%) jako světle žlutý prášek, t.t. 95 - 98 °C.

Analýza pro $C_7H_3BrClNO_3$:

Vypočítáno (%): C 31,79, H 1,14, N 5,30

Zjištěno (%): C 31,60, H 1,01, N 5,11

1H -NMR ($CDCl_3$) δ : 8,02 (s, 1H), 8,43 (s, 1H), 10,39 (s, 1H).

Obecný postup pro přípravu dimethyl-chinolin-2,3-dikarboxylatů (7)

Roztok N-oxidu 3 (10 mM) a chloridu fosforitého (30 mM) v bezvodém chloroformu (100 ml) se zahřívá při teplotě zpětného toku po dobu 7 hodin. Rozpouštědlo se odpaří za redukováného tlaku a zbytek se rozdělí mezi ethylacetat a vodu. Organická vrstva se suší přes síran sodný a potom se odpaří za redukováného tlaku. Zbytek se rekrystalizuje z isopropanolu za zisku titulního dimethyl-chinolin-2,3-dikarboxylatu 7 jako špinavě bílého (nebo světle žlutého) prášku.

Fyzikální charakteristiky a 1H -NMR spektrální data sloučenin 7 jsou uvedeny v tabulkách 3 a 4.

Obecný postup pro přípravu 4-hydroxy-1-oxo-1,2-dihydropyridazino[4,5-b]-chinolin-5-oxidů (5)

Do míseného roztoku (nebo suspenze) dimethyl-chinolin-2,3-dikarboxylat-1-oxidu 3 (5 mM) ve vroucím ethanolu (25 ml) v atmosféře argonu se přidá hydrát hydrazinu (15 mM) a směs se zahřívá při teplotě zpětného toku po dobu 3 hodin, během nichž se vytvoří tmavá sraženina. Po ochlazení na pokojovou teplotu se reakční směs filtruje a odebraný pevný materiál se promyje ethanolem a etherem a suší se za zisku hydrazinové soli 4. Tento materiál se míchá při 70 - 110 °C po dobu 3 hodin v kyselině octové (15 ml) a po ochlazení na pokojovou teplotu se směs ředí vodou (45 ml), a potom se filtruje za zisku pevného materiálu. Získaný pevný materiál se promyje ethanolem a suší se za zisku tmavě žluté pevné látky. Při několika rekrystalizacích tohoto materiálu z dimethylformamidu se získá titulní 4-hydroxy-1-oxo-1,2-dihydropyridazino[4,5-b]-chinolin-5-oxid 5 jako oranžový prášek.

Fyzikální charakteristiky a ^1H -NMR spektrální data sloučenin 5 jsou uvedeny v tabulkách 5 a 6.

Obecný postup pro přípravu 1,4-dioxo-1,2,3,4-tetrahydropyridazino[4,5-b]-chinolinů (9)

Do míseného roztoku (nebo suspenze) dimethyl-chinolin-2,3-dikarboxylatu 7 (5 mM) ve vroucím ethanolu (25 ml) se přidá hydrát hydrazinu (30 mM) a směs se zahřívá při teplotě zpětného toku po dobu 8 hodin, během nichž se vytvoří sraženina. Po ochlazení na pokojovou teplotu se reakční směs filtruje a odebraný pevný materiál se promyje ethanolem a etherem a suší se za zisku hydrazinové soli 8. Tento materiál se míchá při 70 - 100 °C po dobu 3 hodin v kyselině octové (15 ml) a po ochlazení

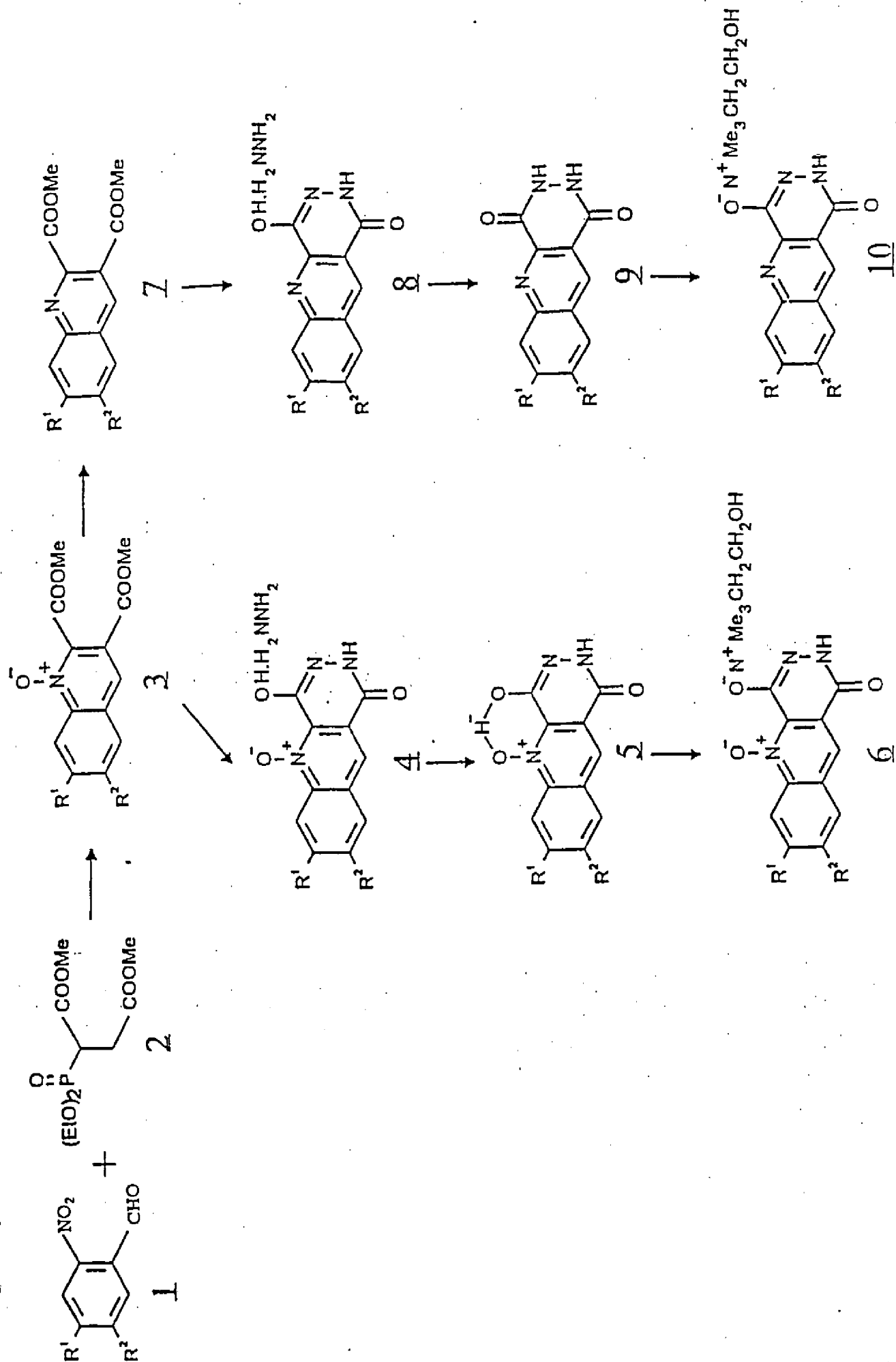
na pokojovou teplotu se směs ředí vodou (45 ml), a potom se filtruje za zisku pevného materiálu. Získaný pevný materiál se promyje ethanolem a etherem a suší se za zisku titulního pyridazino[4,5-b]-chinolinu 9 jako žlutého prášku.

Fyzikální charakteristiky a ^1H -NMR spektrální data sloučenin 9 jsou uvedeny v tabulkách 7 a 8.

Obecný postup pro přípravu 4-hydroxy-1-oxo-1,2-dihydropyridazino[4,5-b]-chinolin-5-oxid-cholinových solí (6) a 1,4-dioxo-1,2,3,4-tetrahydropyridazino[4,5-b]-chinolin, cholinových solí (10)

Do míseného roztoku pyridazino[4,5-b]chinolinu 9 nebo N-oxidu 5 (10 mM) v methanolu (50 ml) se přidá hydroxid cholinu (10,5 mM, 45% hmot. roztok v methanolu. Vzniklý roztok se koncentruje pomocí rotační odparky a pevný zbytek se rekrystalizuje z ethanolu za zisku titulní cholinové soli 10 nebo 6 jako hygroskopického oranžového (nebo červeného) prášku.

Fyzikální charakteristiky a ^1H -NMR spektrální data sloučenin 6 a 10 jsou uvedeny v tabulkách 9, 10 a 11, 12, v příslušném pořadí.



Slouč.	R ¹	R ²	Vzorec (m.h.)	Elementární analýza							t. t. (°C)	Výtěžek (%)
				Vypočítáno (%)			Zjištěno (%)					
				C	H	N	C	H	N			
3a	H	H	C ₁₃ H ₁₁ NO ₃ (261.2)	59.77	4.24	5.36	59.84	4.11	5.31	175-176	61.5	
3b	H	Cl	C ₁₃ H ₁₀ ClNO ₃ (295.7)	52.81	3.41	4.74	52.80	3.32	4.78	126-127	49.0	
3c	H	Br	C ₁₃ H ₁₀ BrNO ₃ (340.2)	45.89	2.96	4.11	45.57	2.75	4.00	168-170	72.0	
3d	H	F	C ₁₃ H ₁₀ FNO ₃ (279.2)	55.86	3.60	5.01	55.19	3.38	4.95	194-196	49.0	
3e	Cl	Cl	C ₁₃ H ₉ Cl ₂ NO ₃ (330.1)	47.30	2.75	4.24	47.18	2.62	4.14	183-186	41.0	
3f	Cl	Br	C ₁₃ H ₉ BrClNO ₃ (374.6)	41.69	2.42	3.74	41.39	2.13	3.65	171-173	60.0	
3g	Br	Cl	C ₁₃ H ₉ BrClNO ₃ (374.6)	41.69	2.42	3.74	41.68	2.25	3.75	206-208	62.5	

Tabulka 2: ^1H -NMR (CDCl_3) spektrální data pro sloučeniny 3

Sloučenina	δ (ppm), J (Hz)
3a	3.98(s, 3H), 4.11, (s, 3H), 7.66-8.05 (m, 3H), 8.43 (s, 1H), 8.75 (dd, $J_1 = 8.5$, $J_2 = 2.0$, 1H)
3b	3.98 (s, 3H), 4.11 (s, 3H), 7.71 (dd, $J_1 = 8.5$, $J_2 = 2.5$, 1H), 7.91 (d, $J = 8.5$, 1H), 8.38 (s, 1H), 8.74 (d, $J = 2.5$, 1H)
3c	3.91 (s, 3H), 4.07 (s, 3H), 7.13 (dd, $J_1 = 9.5$, $J_2 = 2.0$, 1H), 7.44 (d, $J = 2.0$, 1H), 8.22 (s, 1H), 8.58 (d, $J = 9.5$, 1H)
3d	3.98 (s, 3H), 4.11 (s, 3H), 7.48-7.72 (m, 2H), 8.31 (s, 1H), 8.73 (dd, $J_1 = 10.0$, $J_2 = 5.0$, 1H)
3e	3.97 (s, 3H), 4.10 (s, 3H), 8.08(s, 1H), 8.28 (s, 1H), 8.83 (s, 1H)
3f	3.97 (s, 3H), 4.09 (s, 3H), 8.26 (s, 2H), 8.82 (s, 1H)
3g	3.97 (s, 3H), 4.09 (s, 3H), 8.06 (s, 1H), 8.27 (s, 1H), (02 9s, 1H)

Tabulka 3: Připravené dimethylchinolin-2,3-dikarboxylaty 7

Slouč.	R ¹	R ²	Vzorec (m.h.)	Elementární analýza									t. t. (°C)	Výtěžek (%)
				Vypočítáno (%)			Zjištěno (%)							
				C	H	N	C	H	N	C	H	N		
7a	H	H	C ₁₃ H ₁₁ NO ₄ (245.2)	63.67	4.52	5.71	63.48	4.52	5.63		104-106	88.0		
7b	H	Cl	C ₁₃ H ₁₀ ClNO ₄ (279.7)	55.83	3.60	5.01	55.74	3.59	5.00		152-154	90.0		
7c	H	Br	C ₁₃ H ₁₀ BrNO ₄ (324.1)	48.17	3.11	4.32	48.09	3.05	4.26		155-157	81.5		
7d	H	F	C ₁₃ H ₁₀ FNO ₄ (263.2)	59.32	3.83	5.32	59.23	3.79	5.26		119-121	85.0		
7e	Cl	Cl	C ₁₃ H ₉ Cl ₂ NO ₄ (314.1)	49.71	2.89	4.46	49.56	2.85	4.41		113-115	96.0		
7f	Cl	Br	C ₁₃ H ₉ BrClO ₄ (348.6)	43.55	2.53	3.91	43.60	2.48	3.88		128-130	95.0		
7g	Br	Cl	C ₁₃ H ₉ BrClO ₄ (348.6)	43.55	2.53	3.91	43.47	2.51	3.87		142-144	67.0		

Tabulka 4: ^1H -NMR (CDCl_3) spektrální data pro sloučeniny 7

Sloučenina	δ (ppm), J (Hz)
7a	3.98 (s, 3H), 4.06 (s, 3H), 7.58-8.00 (m, 3H), 8.21 (dd, $J_1 = 9.5$, $J_2 = 2.0$, 1H), 8.77 (m, 2H), 8.77 (s, 1H)
7b	3.97 (s, 3H), 4.06 (s, 3H), 7.76 (dd, $J_1 = 9.5$, $J_2 = 2.0$, 1H), 7.90 (d, $J = 2.0$, 1H), 8.67 (s, 1H)
7c	3.97 (s, 3H), 4.07 (s, 3H), 7.90 (dd, $J_1 = 9.5$, $J_2 = 2.0$, 1H), 8.09 (m, 2H), 8.66 (s, 1H)
7d	3.98 (s, 3H), 4.07 (s, 3H), 7.49-7.72 (m, 2H), 8.20 (dd, $J_1 = 10$, $J_2 = 5.0$, 1H), 8.69 (s, 1H)
7e	3.97 (s, 3H), 4.04 (s, 3H), 8.02 (s, 1H), 8.31 (s, 1H), 8.64 (s, 1H)
7f	3.98 (s, 3H), 4.06 (s, 3H), 8.24 (s, 1H), 8.33 (s, 1H), 8.68 (s, 1H)
7g	3.96 (s, 3H), 4.04 (s, 3H), 8.03 (s, 1H), 8.53 (s, 1H), 8.62 (s, 1H)

Tabulka 5: Připravené 4-hydroxy-1-oxo-1,2-dihydropyridazino [4,5-b] -
chinolin-5-oxidy 5

Mrz 2/	glouč.	R ¹	R ²	Vzorec (m.h.)	Elementární analýz						t. t. (°C)	Výtěžek (%)
					Vypočítáno (%)			Zjištěno (%)				
					C	H	N	C	H	N		
499	5a	H	H	C ₁₁ H ₇ N ₃ O ₃ (229.2)	57.65	3.08	18.33	57.56	2.93	18.22	>300	44.5
502	5b	H	Cl	C ₁₁ H ₆ ClN ₃ O ₃ (263.6)	50.11	2.29	15.94	49.34	2.29	15.40	>300	88.0
514	5c	H	Br	C ₁₁ H ₆ BrN ₃ O ₃ (308.1)	42.88	1.96	13.63	42.57	1.91	13.49	>300	78.0
516	5d	H	F	C ₁₁ H ₆ FN ₃ O ₃ (247.2)	55.44	2.44	16.99	53.44	2.35	16.90	297-298	37.0
518	5e	Cl	Cl	C ₁₁ H ₅ Cl ₂ N ₃ O ₃ (298.1)	44.32	1.69	14.10	44.17	1.91	14.34	>300	16.0
551	5f	Cl	Br	C ₁₁ H ₅ BrClN ₃ O ₃ (342.5)	38.57	1.47	12.27	37.93	1.33	11.94	>300	15.0
568	5g	Br	Cl	C ₁₁ H ₅ BrClN ₃ O ₃ (342.5)	38.57	1.47	12.27	38.17	1.31	12.00	>300	17.0

Tabulka 6: ^1H -NMR (CDCl_3) spektrální data pro sloučeniny 5

Sloučenina	δ (ppm), J (Hz)		
	protony aromatického kruhu (a OCH_3)	NH, OH (zaměnitelné)	
5a	7.88-8.28 (m, 2H), 8.46-8.79 (m, 2H), 9.07 (s, 1H)	10.65 (br. s, 1H), 12.00 (br. s, 1H)	
5b	8.07 (dd, $J_1 = 9.0$, $J_2 = 2.5$, 1H), 8.59 (d, $J = 9.0$, 1H), 8.69 (d, $J = 2.5$, 1H), 9.11 (s, 1H)	12.05 (br. s, 1H), 14.60 (br. s, 1H)	
5c	8.27 (dd, $J_1 = 9.0$, $J_2 = 2.0$, 1H), 8.60 (d, $J = 9.0$, 1H), 8.82 (d, $J = 2.0$, 1H), 9.00 (s, 1H)	11.00 (br. s, 1H), 12.00 (br. s, 1H)	
5d	8.07 (ddd, $J_1 = 9.5$, $J_2 = 8.5$, $J_3 = 2.5$, 1H), 8.36 (dd, $J_1 = 9.5$, $J_2 = 2.5$, 1H), 8.75 (dd, $J_1 = 9.5$, $J_2 = 5.0$, 1H), 9.02 (s, 1H)	10.92 (br. s, 1H), 12.00 (br. s, 1H)	
5e	8.83 (s, 1H), 8.90 (s, 1H), 9.06 (s, 1H)	11.25 (br. s, 1H), 12.05 (br. s, 1H)	
5f	8.80 (s, 1H), 9.00 (s, 1H), 9.01 (s, 1H)	12.06 (br. s, 1H), 14.28 (br. s, 1H)	
5g	8.90 (s, 1H), 9.01 (s, 1H), 9.04 (s, 1H)	12.13 (br. s, 1H), 14.32 (br. s, 1H)	

18

Tabulka 7: Přípravené 1,4-dioxo-1,2,3,4-tetrahydropyridazino [4,5-b] -
chinoliny 9

Mrz 2/	Slouč.	R ¹	R ²	Vzorec (m.h.)	Elementární analýza									t. t. (°C)	výtěžek (%)
					Vypočítáno (%)			Zjištěno (%)							
					C	H	N	C	H	N	C	H	N		
585	9a	H	H	C ₁₁ H ₇ N ₃ O ₂ (213.2)	61.97	3.31	19.71	61.43	3.45	19.16		>300	86.0		
501	9b	H	Cl	C ₁₁ H ₆ ClN ₃ O ₂ (247.6)	53.35	2.44	16.97	32.89	2.28	16.68		>300	88.5		
503	9c	H	Br	C ₁₁ H ₆ BrN ₃ O ₂ (292.1)	45.23	2.07	14.39	44.74	2.11	14.09		>300	82.0		
519	9d	H	F	C ₁₁ H ₆ FN ₃ O ₂ (231.2)	57.14	2.60	18.18	56.73	2.47	17.99		>300	84.0		
515	9e	Cl	Cl	C ₁₁ H ₅ Cl ₂ N ₃ O ₂ (282.1)	46.84	1.79	14.90	46.44	1.70	14.87		>300	82.5		
539	9f	Cl	Br	C ₁₁ H ₅ BrClN ₃ O ₂ (326.5)	40.46	1.54	12.87	40.16	1.42	12.88		>300	69.5		
538	9g	Br	Cl	C ₁₁ H ₅ BrClN ₃ O ₂ (326.5)	40.46	1.54	12.87	40.23	1.40	12.98		>300	88.0		

Tabulka 8: $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) spektrální data pro sloučeniny 9

Slouč.	δ (ppm), J (Hz)	
	protony aromatického kruhu	NH (zaměnitelné)
9a	7.76-8.16 (m, 2H), 8.22-8.47 (m, 2H), 9.30 (s, 1H)	11.60 (br. s, 2H)
9b	8.02 (dd, $J_1 = 9.0$, $J_2 = 2.5$, 1H), 8.28 (d, $J = 9.0$, 1H), 8.52 (d, $J = 2.5$, 1H), 9.26 (s, 1H)	11.60 (br. s, 2H)
9c	8.16 (m, 2H), 8.60 (br. s, 1H), 9.25 (s, 1H)	11.55 (br. s, 2H)
9d	7.93 (dddd, $J_1 = 9.5$, $J_{2(\text{H,F})} = 9.0$, $J_3 = 2.5$, 1H), 8.18 (dd, $J_{(\text{H,F})} = 9.5$, $J_2 = 2.5$, 1H), 8.36 (dd, $J_1 = 9.5$, $J_{2(\text{H,F})} = 5.5$, 1H), 9.24 (s, 1H)	11.90 (br. s, 2H)
9e	8.47 (s, 1H), 8.67 (s, 1H), 9.22 (s, 1H)	11.60 (br. s, 2H)
9f	8.52 (s, 1H), 8.91 (s, 1H), 9.28 (s, 1H)	11.65 (br. s, 2H)
9g	8.68 (s, 1H), 8.71 (s, 1H), 9.26 (s, 1H)	11.70 (br. s, 2H)

Tabulka 9: Připravené 4-hydroxy-1-oxo-1,2-dihydropyridazino[4,5-b]-
chinolin-5-oxidy-cholinové soli 6

Mrz.2/	Slouč. R ¹	R ²	Vzorec (m.h.)	Elementární analýza						t. t. (°C)	výtěžek (%)	
				Vypočítáno pro 6xH ₂ O (%)			Zjištěno (%)					
				C	H	N	C	H	N			
577	6a	H	H	C ₁₆ H ₂₀ N ₄ O ₄ (332.4)	54.84	6.32	15.99	54.76	6.32	15.86	<u>179-180</u>	52.5
576	6b	H	Cl	C ₁₆ H ₁₉ ClN ₄ O ₄ (366.8)	49.93	5.50	14.55	49.31	5.47	14.24	<u>185-188</u>	87.5
570	6c	H	Br	C ₁₆ H ₁₉ BrN ₄ O ₄ (411.4)	44.75	4.92	13.04	44.85	4.93	12.86	<u>191-193</u>	71.5
571	6d	H	F	C ₁₆ H ₁₉ FN ₄ O ₄ (366.4)	51.19	5.63	14.92	51.74	5.73	14.95	<u>201-203</u>	27.0
574	6e	Cl	Cl									
	6f	Cl	Br									
	6g	Br	Cl									

* x = 1.0 (a, b, c)
0.5 (d)

Tabulka 10: ^1H -NMR (CDCl_3) spektrální data pro cholinové soli 6

Slouč.	δ (ppm), J (Hz)	
	protony cholinu	protony aromatického kruhu
6a	3.20 (s, 9H), 3.47 (m, 2H), 3.98 (m, 2H)	7.69-8.00 (m, 2H), 8.18 (d, J = 8.0, 1H), 8.59 (s, 1H), 8.76 (d, J = 8.5, 1H)
6b	3.22 (s, 9H), 3.50 (m, 2H), 4.01 (m, 2H)	7.88 (dd, J ₁ = 9.0, J ₂ = 2.5, 1H), 8.27 (d, J = 2.5, 1H), 8.52 (s, 1H), 8.76 (d, J = 9.0, 1H)
6c	3.20 (s, 9H), 3.48 (m, 2H), 3.99 (m, 2H)	7.99 (dd, J ₁ = 9.5, J ₂ = 2.0, 1H), 8.41 (d, J = 2.0, 1H), 8.53 (s, 1H), 8.64 (d, J = 9.5, 1H)
6d	3.22 (s, 9H), 3.51 (m, 2H), 4.02 (m, 2H)	7.64-7.98 (m, 2H), 8.62 (s, 1H), 8.87 (dd, J ₁ = 10.0, J ₂ = 5.0, 1H)
6e		
6f		
6g		

Tabulka 11: Připravené 1,4-dioxo-1,2,3,4-tetrahydropyridazino[4,5-b]-
chinolin-cholinové soli 10

Mrz 2/	Slouč.	R ¹	R ²	Vzorec (m.h.)	Elementární analýza						t. t. (°C)	Výtěžek (%)
					Vypočítáno pro 10xH ₂ O (%)							
					Zjištěno (%)							
C	H	N	C	H	N	C	H	N				
604	10a	H	H	C ₁₆ H ₂₀ N ₄ O ₃ (316.36)	54.26	7.59	14.06	54.23	7.39	14.25	102-110	82.0
596	10b	H	Cl	C ₁₆ H ₁₉ ClN ₄ O ₃ (350.8)	54.08	5.53	15.76	54.10	5.55	15.61	189-191	84.0
586	10c	H	Br	C ₁₆ H ₁₉ BrN ₄ O ₃ (395.3)	43.64	5.49	12.72	44.07	5.14	12.73	234-236	61.0
572	10d	H	F	C ₁₆ H ₁₉ FN ₄ O ₃ (334.4)	52.16	15.20	5.74	52.08	6.23	15.19	229-230	95.0
574	10e	Cl	Cl	C ₁₆ H ₁₈ Cl ₂ N ₄ O ₃ (385.3)	47.65	4.99	13.89	47.24	5.03	13.60	205-208	83.0
598	10f	Cl	Br	C ₁₆ H ₁₈ BrClN ₄ O ₃ (429.7)	42.92	4.5	12.51	42.78	4.60	12.44	207-209	92.0
597	10g	Br	Cl	C ₁₆ H ₁₈ BrClN ₄ O ₃ (429.7)	42.92	4.5	12.51	42.66	4.57	12.37	201-203	95.0

* x = 0.25 (d)

1.0 (d, e)

2.5 (c)

Tabulka 12: $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) spektrální data pro cholinové soli 10.

Slouč.	δ (ppm), J (Hz)	
	cholinové protony	protony aromatického kruhu
10a	3.21 (s, 9H), 3.51 (m, 2H), 4.01 (m, 2H)	7.64-8.57 (m, 4H), 9.17 (s, 1H)
10b	3.25 (s, 9H), 3.52 (m, 2H), 4.02 (m, 2H)	7.89 (dd, $J_1 = 9.0$, $J_2 = 2.5$, 1H), 8.23 (d, $J = 2.5$, 1H), 8.34 (d, $J = 9.0$, 1H), 9.13 (s, 1H)
10c	3.22 (s, 9H), 3.47 (m, 2H), 3.97 (m, 2H)	7.99 (dd, $J_1 = 9.0$, $J_2 = 2.0$, 1H), 8.26 (d, $J = 9.0$, 1H), 8.41 (d, $J = 2.0$, 1H), 9.09 (s, 1H)
10d	3.20(s, 9H), 3.49 (m, 2H), 3.98 (m, 2H)	7.64-7.81 (m, 2H), 8.39 (dd, $J_1 = 9.5$, $J_2 = 5.0$, 1H), 9.12 (s, 1H)
10e	3.22 (s, 9H), 3.51 (m, 2H), 4.02 (m, 2H)	8.46 (s, 1H), 8.55 (s, 1H), 9.14 (s, 1H)
10f	3.22 (s, 9H), 3.50 (m, 2H), 4.00 (m, 2H)	8.53 (s, 1H), 8.64 (s, 1H), 9.13 (s, 1H)
10g	3.22 (s, 9H), 3.50 (m, 2H), 4.02 (m, 2H)	8.43 (s, 1H), 8.73 (s, 1H), 9.13 (s, 1H)

Farmakologická část

In vitro

Studie vazby na receptor

Membránové přípravky a určení proteinu

Příprava tkáně se provede podle Foster a Wong (1987). Samci Sprague-Dawley krysy (200 - 250 mg) se usmrtí a jejich mozky se rychle odeberou. Kůra mozková se oddělí a homogenizuje se ve 20 objemech ledově chladné 0,32 M sacharosy pomocí skleněného-teflonového homogenizátoru. Homogenát se centrifuguje při 1000 x g po dobu 10 minut. Peleta se odstraní a supernatant se centrifuguje při 20000 x g po dobu 20 minut. Vzniklá peleta se resuspenduje ve 20 objemech destilované vody a centrifuguje se po dobu 20 minut při 8000 x g. Potom se supernatant a "buffy coat" centrifugují třikrát (48000 x g po dobu 20 minut) za přítomnosti 5 mM Tris-HCl, pH 7,4. Všechny kroky centrifugace se provedou při 4 °C. Po resuspendování v 5 objemech 5 mM Tris-HCl, pH 7,4 se membránová suspenze rychle zmrazí při -80 °C a uskladní se do testování. Při testování se membrány rozmrazí a promyjí se 4-krát resuspendováním v 5 mM Tris-HCl, pH 7,4 a centrifugací při 48000 x g po dobu 20 minut. Konečná peleta se suspenduje v testovacím pufru.

Množství proteinu v konečném membránovém přípravku se určí technikou, kterou popsal Lowry (1951) s určitými modifikacemi (Hartfree, 1972). 50 µl proteinových vzorků (trojitě) se ředí na objem 1 ml destilovanou vodou a zpracuje se s 0,9 ml roztoku obsahujícího 2 g vinanu draselno-sodného a 100 g Na₂CO₃ v 500 ml 1N NaOH a 500 ml vody. Slepé vzorky a standardy (s hovězím sérovým albuminem) se zpracují stejným způsobem. Tuby se umístí

do vodní lázně při 50 °C na 10 minut a ochladí se na pokojovou teplotu. Přidá se 100 µl roztoku obsahujícího 2 g vinanu draselno-sodného a 1 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ v 90 ml vody a 10 ml NaOH. Vzorky se nechají při pokojové teplotě po dobu nejméně 10 minut a potom se za míchání rychle přidají 3 ml Folin-Ciocalteuova činidla (1 ml činidla ředěný 15 ml vody). Tuby se znovu zahřejí na 50 °C na dobu 10 minut a ochladí se na pokojovou teplotu. Absorbance se potom odečítají v 1 cm kyvetách při 650 nm. Konečná koncentrace proteinu použitého pro naše studie je mezi 100 a 250 µg/ml.

Inkubace v obou vazebných testech se ukončí za použití Millipore filtračního systému. Vzorky, všechny ve trojím provedení, se třikrát propláchnou s 2,5 ml ledově chladného testovacího pufru přes filtry ze skelných vláken získané od Schleicher and Schuell při konstantním vakuu. Po separaci a vypláchnutí se filtry umístí do scintilační kapaliny (5 ml; Ultima Gold) a radioaktivita zachycená na filtrech se určí pomocí běžného kapalinového scintilačního počítače (Hewlett Packard, Liquid Scintillation Analyser). "Celková vazba" je absolutní množství radioligandu navázaného za nepřítomnosti jakýchkoliv dalších substancí, zatímco "nespecifická" vazba je určena za přítomnosti vysokých koncentrací kompetitivního činidla.

(^3H) 5,7-DCKA vazebný test

Pokusy byly provedeny technikou popsanou dříve (Canton et al., 1992; Zoneda et al., 1993). Membrány byly suspendovány a inkubovány v 10 mM Tris-HCl, pH 7,4. Inkubační doba byla 45 minut při 4 °C. Nespecifická vazba (^3H) 5,7-DCKA byla definována adicí neznáčeného glycinu při 0,1 mM. Ukončovací roztok obsahoval 10 mM Tris-HCl a 10 mM síranu hořečnatého, pH 7,4. Filtrace byla provedena tak rychle, jak to bylo možné. Nahrazovací pokusy byly

provedeny s fixní koncentrací (^3H)5,7-DCKA 10 nM. Testované sloučeniny byly ředěny vodou nebo DMSO a byly přidány nejméně v 5 různých koncentracích.

(^3H)glycinový vazebný test

(^3H)glycinové vazebné testy se provedou technikou, kterou popsal Kessler a spolupracovníci (1989). Krysí kortikální membrány se připraví technikou popsanou výše a výsledná peleta se suspenduje v 50 mM Tris-acetatu, pH 7,4. Alespoň 5 různých koncentrací testovaných sloučenin se inkubuje s 20 nM (^3H)glycinu po dobu 30 minut při 4 °C za přítomnosti 100 μM strychninu. Všechny sloučeniny se rozpustí ve vodě nebo v DMSO, v příslušném pořadí. Nespecifická vazba se určí obsazením 100 μM glycinu v inkubační směsi. Inkubace se ukončí ředěním vzorků 2 ml stop - roztoku (50 mM Tris-HCl obsahující 10 mM síranu hořečnatého, pH 7,4, ochlazeného na teplotu < 2 °C) a potom dalším vypláchnutím 2,5 ml pufru. Filtrace se provede tak rychle, jak je možné.

Výsledky

8 z testovaných sloučenin mělo IC_{50} v (^3H)-DCKA testu $\leq 1 \mu\text{M}$ (viz tabulka 13). Účinnost šesti vybraných sloučenin v (^3H)-glycinovém testu se na první pohled zdá vyšší, ale tato skutečnost se neodráží v K_d (není uvedeno). Ze zejména zajímavých sloučenin mají sloučeniny třídy II vyšší afinitu než sloučeniny třídy I v (^3H)-DCKA testu. Tento rozdíl není tak zřetelný v (^3H)-glycinovém testu.

14.04.99

Tabulka 13a

Mrz/2	Sloučenina	(³ H)-DCKA	(³ H)-glycin
		IC ₅₀ μM	IC ₅₀ μM
499	II	16.0	
501	8-Cl-I	0.120	0,080
502	8-Cl-II	0,020	0,013
503	8-Br-I	0,250	0,013
514	8-Br-II	0,010	0,004
519	8-F-I	1,100	0,015
516	8-F-II	0,300	0,017
515	7,8-diCl-I	0,530	
518	7,8-diCl-II	0,650	

Tabulka 13b

Mrz/2	Sloučenina	(³ H)-DCKA
		IC ₅₀ μM
572	8-F-I (chol)	1,14
571	8-F-II (chol)	0,32
569	8-Cl-I (chol)	0,97
576	8-Cl-II (chol)	0,45

Plošné svorky

Colliculi superiores byly získány z krysích embryí (E20 až E21) a potom byly přeneseny do Hankova pufovaného salinického roztoku bez vápníku a hořčíku (Gibco) na ledu. Buňky byly mechanicky disociovány v 0,05% DNase/0,3% ovomukoidu (Sigma) a

potom následovala 15 minutová pre-inkubace s 0,66% trypsinem/0,1% DNAsou (Sigma). Disociované buňky byly potom centrifugovány při 18 G po dobu 10 minut, byly resuspendovány v minimálním esenciálním mediu /Gibco) a byly umístěny v hustotě 200000 buněk na cm^2 na plastové Petriho misky (Falcon) předem potažené poly-L-lysinem (Sigma). Buňky byly kultivovány v NaHCO_3 /HEPES pufrovaném minimálním esenciálním mediu doplněném 5% fetálním telecím sérem a 5% koňským sérem (Gibco) a byly inkubovány při 37 °C s 5% CO_2 při 95% vlhkosti. Medium bylo zcela vyměněno po inhibici dalších mitos gliálních buněk cytosin- β -D-arabinofuranosidem (20 μM , Sigma) po asi 7 dnech in vitro. Potom bylo medium měněno částečně dvakrát týdně. Kultury colliculus superior byly vybrány pro tyto pokusy, protože umožňují velmi stabilní zaznamenávací podmínky, které jsou absolutním požadavkem pro pokusy závislosti na napětí a pro kinetické pokusy. Kromě toho, relativně malé neurony (tělo 15 - 20 μm v průměru) se ideálně hodí pro minimalizaci problémů souvisejících s difusí pufru pro koncentrační svorkové pokusy.

Snímání plošných svorek bylo provedeno z těchto neuronů pomocí elektrod z leštěného skla (4 - 6 $\text{m}\Omega$) v modulu celých buněk při pokojové teplotě (20 - 22 °C) pomocí EPC-7 zesilovače (List). Testované sloučeniny byly aplikovány otvíratelnými kanály běžným způsobem vyrobeného systému pro rychlou superfúzy s běžným výtokem (10 - 20 ms výměnná doba). Obsahy intracelulárního roztoku byly následující (mM): CsCl (120), TEACl (20), EGTA (10), MgCl_2 (1), CaCl_2 (0,2), glukosa (10), ATP (2), cAMP (0,25); pH bylo upraveno na 7,3 CsOH nebo HCl. Extracelulární roztoky měly následující základní složky (mM): NaCl (140), KCl (3), CaCl_2 (0,2), glukosa (10), HEPES (10), sacharosa (4.5), tetrodotoxin (TTX $3 \cdot 10^{-4}$). Pro většinu pokusů byl glycin (1 μM) přítomen ve všech roztocích. Pokusy pro testování závislosti tricyklických "pyrido-ftalazin dionů" na glycinu byly provedeny v trvalé

přítomnosti zvyšující se koncentrace glycinu (1 - 10 μM).

Výsledky

Pět párů tricyklických "pyrido-ftalazin dionů" mělo IC_{50} proti vnitřnímu proudu vzhledem k NMDA (200 μM) v nízkém rozmezí μM a sloučeniny třídy II byly obecně 2 - 3 krát účinnější než sloučeniny třídy I (tabulka 14a). Nejúčinnější z těchto sloučenin byly Mrz 2/502 a Mrz 2/514. Tento účinek byl zprostředkován na glycin_B místu, jak je dokázáno paralelním posunem křivek závislosti na koncentraci za přítomnosti zvyšujících se koncentrací glycinu. Proto byly Kb Mrz 2/502, jak jsou hodnoceny podle Cheng-Prusoffova vztahu, podobné při koncentraci glycinu 1, 3 a 10 μM (80, 124 a 118 nM, v příslušném pořadí). Dále, účinky Mrz 2/501 a 2/502 nebyly závislé na napětí. Všechny testované sloučeniny byly tři- až desetkrát účinnější proti stabilním proudům než proti vrcholovým proudům. Cholinové deriváty měly podobné účinnosti jako volné kyseliny in vitro (tabulky 14b).

Naopak, tři z těchto účinných antagonistů glycin_B místa byly pouze slabými antagonisty vnitřních proudů vzhledem k AMPA (100 μM). Mrz 2/502, 2/514 a 2/516 měly IC_{50} proti vrcholovým proudům indukovaným AMPA 25, 73 a 18 μM , v příslušném pořadí, ale byly v podstatě inaktivní proti proudům ve fázi plató při $\text{IC}_{50} > 100 \mu\text{M}$ (tabulka 14a). Tento profil účinku, ačkoliv je velmi slabý, je typický pro kompetitivní antagonisty AMPA receptoru, které preferenčně blokují vrcholový neznecitlivěný stav, stav receptoru, při kterém má nízkou afinitu (viz Parson et al., 1994).

14.04.99

Tabulka 14a

Mrz 2/	Sloučenina	Vrchol	Platô	Vrchol	Platô
		NMDA	NMDA	AMPA	AMPA
		IC ₅₀ μ M	IC ₅₀ μ M	IC ₅₀ μ M	IC ₅₀ μ M
585	I	65,9	19,1		
499	II	51,2	13,8		
501	8-Cl-I	2,3	0,7		
502	8-Cl-II	0,8	0,3	25,0	150,0
503	8-Br-I	1,7	0,6		
514	8-Br-II	0,5	0,2	72,7	307,0
519	8-F-I	18,0	5,8		
516	8-F-II	6,3	1,6	17,6	>100
515	7,8-diCl-I	3,7	0,9		
518	7,8-diCl-II	3,8	0,8		
539	7-Cl,8-Br-I	5,3	0,7		
551	7-Cl,8-Br-II	2,4	0,6		
538	7-Br,8-Cl-I	93,9	2,5		
568	7-Cl,8-Br-II	10,0	1,5		
554	8-O-CH ₃ -I	170,0	36,2		

Tabulka 14b

Mrz	Sloučenina	Vrchol	Platô
2/		NMDA	NMDA
		IC ₅₀ μ M	IC ₅₀ μ M
569	8-Cl-I (chol)	2,0	0,5
576	8-Cl-II (chol)	1,1	0,5
586	8-Br-I (chol)	2,2	0,6
570	8-Br-II (chol)	0,6	0,1
572	8-F-I (chol)	12,4	3,5
571	8-F-II (chol)	4,9	1,0
578	8-O-CH ₃ -II (chol)	101	7,7
575	7-O-CH ₃ -I (chol)	94,0	14,5

Excitotoxicita in vitro

Techniky

Izolace kortikálních neuronů byla podobná jako izolace popsaná pro snímání plošných svorek s tou výjimkou, že byly použity fetální krysy v den 17 - 19 gestace. Neurony byly umístěny ve 24-jamkové plotně (Greiner) v hustotě 300000 buněk na jamku potaženou poly-D-lysinem 0,025 mg/ml. Buňky byly kultivovány v Dulbeccově modifikovaném esenciálním mediu (DMEM, Gibco) doplněném 10% teplem inaktivovaným feálním telecím sérem (Gibco). Kultury byly uchovávány při 37 °C a 5% CO₂. Medium bylo prvně vyměněno po jednom týdnu a potom byla po každých třech dnech vyměněna polovina media za čerstvé. Pro pokusy byly použity kultury stáří 17 dnů.

Expozice EAA byla provedena v mediu MEM-N2 bez séra

(Bottenstein 1979) obsahujícím 0,5 mM NMDA/1 μ M glycinu a testovanou sloučeninu. Buňky byly předem inkubovány se sloučeninou a 1 μ M glycinu po dobu 15 minut před přidáním NMDA. Po 24 hodinách byl morfologicky vyšetřován cytotoxický efekt mikroskopem s fázovým kontrastem a tento efekt byl biochemicky kvantifikován měřením uvolnění LDH.

Aktivita LDH byla určena v supernatantu po 24 hodinách technikou, kterou popsal Wroblewski a La Due (1955). Stručně, 0,1 ml supernatantu se přidal do 0,9 ml pufru fosforečnanu sodného (pH = 7.5) obsahujícího pyruvat sodný (22,7 mM) a NADH (0,8 mg/10 ml) při pokojové teplotě. Konverse pyruvatu na laktat se zaznamenávala při 340 nm v průběhu 10 minut na Kontron Spectrophotometer.

Výsledky

Úplné křivky závislosti na koncentraci nejsou dosud dostupné. Nicméně, nízké μ M koncentrace Mrz 2/501 a Mrz 2/502 byly účinné v neuroprotekcii in vitro, s tím, že Mrz 2/502 se zdála být v tomto ohledu účinnější (viz tabulka 15).

Tabulka 15

Mrz 2/	Sloučenina	Cytotoxicita in vitro IC ₅₀ μ M
501	8-Cl-I	< 5
502	8-Cl-II	<< 5
503	8-Br-I	> 20

In vivo

Antikonvulsivní aktivita

Cíl

Zhodnocení antagonistických charakteristik testovaných sloučenin na NMDA receptoru hodnocením antikonvulsivních účinků. Další role přenašečů organických kyselin v eliminaci testovaných sloučenin z mozku byla hodnocena za pomoci vlivu inhibitoru, Probenicidu, na trvání antikonvulsivní aktivity.

Techniky

Samci albínů Swiss myši (19 - 21 g) umístění v počtu 10 - 15 na box byly použity pro test NMDA letality (Leander et al., 1988). Pro pentylentetrazolem (PTZ) indukované křeče byli použiti samci albínů Swiss myši (25 - 34 g) umístění v počtu 40 na box (58 x 38 x 20 cm), zatímco v testech maximálních elektrošoků (MES) a testech motorických poruch byly použity samice NMR myši (18 - 28 g) umístěné v počtu 5 na box. Všechna zvířata byla napájena a krmena podle potřeby za 12-hodinového cyklu světlo-tma (světlo od 6 hodin) a při kontrolované teplotě ($20 \pm 0,5$ °C). Všechny pokusy byly provedeny mezi 10 a 17 hodinou. Testovaná činidla byla injikována i.p. 15 minut před indukcí křečí, pokud není uvedeno jinak (viz dále). Mrz 2/502 byla rozpuštěna v salinickém roztoku s přidaným NaOH. Většina dalších činidel byla rozpuštěna v následujícím roztoku: 0,606 g Tris; 5,0 g glukosy; 0,5 g Tween 80; a 95 ml vody. Cholinové a tetramethylamoniové soli byly rozpuštěny v destilované vodě.

V testech křečí indukovaných NMDA na myších byly nejprve určeny vztahy dávka-odpověď pro NMDA pro určení dávky ED₅₀, která

byla potom použita pro testování antagonistických vlastností. Po injekci ED_{50} dávky NMDA byla zvířata umístěna v malém boxu (20 x 28 x 14 cm) a byla pozorována po dobu 20 minut. Smrt, které předcházely klonické křeče a tonické záchvaty byla farmakologickým koncovým jevem.

Pentylentetrazol byl injikován v dávce 90 mg/kg (i.p.). Přítomnost celkových tonických záchvatů byla potom skorována po dobu 30 minut, protože tento parametr je citlivnější pro antagonismus na NMDA receptoru než klonické křeče. Farmakologický konečný sledovaný parametr byla přítomnost tonu v zadních tlapkách s natažením.

MES (100 Hz, trvání šoku 0,5 sekund, intenzita šoku 50 mA, trvání impulsu 0,9 ms, Ugo Basile) byl aplikován pomocí korneálních elektrod. Byla zaznamenávána přítomnost tonických křečí (tonická extenze zadních tlapek s minimálním úhlem k tělu 90 °). V dalším pokusu byl myším injikován Prebenicid (200 mg/kg) 30 minut před podáním testovaných činidel pro hodnocení úlohy transportu organických kyselin pro eliminaci (trvání účinku). Cílem bylo získat ED_{50} pro všechny vyšetřované parametry pomocí Litchfield Wilcoxonova (1949) testu pro závislost na dávce.

Výsledky

Z testovaných sloučenin byly účinné pouze čtyři sloučeniny, všechny z třídy II, při podání i.p. v MES testu (Mrz 2/499, Mrz 2/502, Mrz 5/516 a Mrz 2/514, viz tabulka 16a). Sloučeniny třídy I byly neúčinné. Všechny čtyři sloučeniny měly zřetelně velmi krátké poločasy in vivo. PTZ test se zdá být citlivějším modelem pro antagonistickou aktivitu na glycin_B místu při podání i.p. a kromě toho, stejné sloučeniny třídy II byly aktivní při 2 - 4 násobně nižších dávkách, zatímco sloučeniny třídy I zůstávaly

inaktivní (tabulka 16a).

Cholinové soli těchto stejných N-oxidových derivátů (struktury II) měly zřetelnou antikonvulsivní aktivitu ve všech třech modelech, zatímco jejich non-N-oxidové deriváty byly buď inaktivní, nebo měly pouze slabou aktivitu (tabulka 16b). Kromě toho se zdá, že cholinové soli mají delší trvání účinku. Injekce probenicidu významně prodlužovala trvání účinku všech testovaných činidel. Například poločasy 2/514 a 2/570 byly okolo 40 a 80 minut, v příslušném pořadí, za absence probenicidu. Za přítomnosti probenicidu byly poločasy prodlouženy na přibližně 180 a 210 minut, v příslušném pořadí. Proto se zdá, že transport organických kyselin ven z mozku v choroidálním plexu má významnou úlohu v krátkém trvání účinku testovaných sloučenin. Probenicid v použité dávce (200 mg/kg) nemá sám o sobě žádný nezávislý účinek na křeče indukované MES.

14.04.99

Tabulka 16a

Mrz 2/	Sloučenina	MES i.p. (ID ₅₀ mg/kg)	NMDA i.p. (ID ₅₀ mg/kg)	PTZ i.p. (ID ₅₀ mg/kg)
585	I	>100,0	58,9	59,0
499	II	87,0		18,6
501	8-Cl-I	>100,0	>100,0	>40,0
502	8-Cl-II	47,6	26,0	8,3
503	8-Br-I	>100,0	>100	>100,0
514	8-Br-II	20,2	99,0	12,8
519	8-F-I	>60,0	>100,0	>100,0
516	8-F-II	16,6	40,0	7,9
515	7,8-diCl-I	>100,0	98,0	>100,0
518	7,8-diCl-II	>60,0	>100,0	
539	7-Cl,8-Br-I	>60,0	>100,0	>100,0
538	7-Br,8-Cl-I	>60,0	106,0	>100,0
554	8-O-CH ₃ -I	>100,0		

Tabulka 16b

Mrz 2/	Sloučenina	MES i.p. (ID ₅₀ mg/kg)
577	II (chol)	23,7
569	8-Cl-I (chol)	>50
576	8-Cl-II (chol)	7,7
586	8-Br-I (chol)	>50
570	8-Br-II (chol)	12,8
572	8-F-I (chol)	>100
571	8-F-II (chol)	15,5
574	7,8-diCl-I (chol)	>100,0
578	8-O-CH ₃ -II (chol)	>100,0
575	7-O-CH ₃ -I (chol)	>100,0

14.04.99

Mikroelektroforetická aplikace EAA agonistů do spinálních neuronů in vivo

Schopnost těchto antagonistů glycin_a místa účinkovat jako antagonisté NMDA receptoru in vivo byla hodnocena pomocí účinku i.v. podání proti odpovědi jednotlivých neuronů míchy krysy na mikroelektroforetickou aplikaci AMPA a NMDA. Sloučeniny třídy II Mrz 2/502 a Mrz 2/516 byly účinnými antagonisty NMDA receptoru in vivo s ID_{50} 1,2 a 1,8 mg/kg i.v., v příslušném pořadí, zatímco původní sloučeniny třídy I byly zcela inaktivní až do 16 mg/kg i.v.. Troj- až čtyřnásobně vyšší dávky také antagonistovaly odpovědi na AMPA, ačkoliv toto zřetelné chybění selektivity je v protikladu k testům in vitro (tabulka 17a).

Tabulka 17a

Mrz 2/	Sloučenina	mikroelektroforetické podání NMDA (ID_{50} mg/kg i.v.)	mikroelektroforetické podání AMPA (ID_{50} mg/kg i.v.)
501	8-Cl-I	>16,0	>16,0
502	8-Cl-II	1,2	4,9
519	8-F-I	>16,0	>16,0
516	8-F-II	1,8	3,6

Cholinové soli byly přibližně stejně účinné jako volné kyseliny v tomto modelu po i.v. podání, ale byly o něco více selektivní pro NMDA vzhledem k AMPA (tabulka 17b). Opět, non-N-oxidové deriváty (sloučeniny třídy I) byly inaktivní.

Tabulka 17b

Mrz 2/	Sloučenina	mikroelektroforetické podání NMDA (ID ₅₀ mg/kg i.v.)	mikroelektroforetické podání AMPA (ID ₅₀ mg/kg i.v.)
577	II (chol)	34,0	>32,0
569	8-Cl-I (chol)	>16,0	>16,0
576	8-Cl-II (chol)	2,8	>16,0
586	8-Br-I (chol)	>16,0	>16,0
570	8-Br-II (chol)	4,5	>16,0
572	8-F-I (chol)	>16,0	>16,0
571	8-F-II (chol)	4,7	9,2

Diskuse

Čtyři sloučeniny třídy II Mrz 2/499, 2/501, 2/514 a 2/516 jsou antagonisty glycin_B místa in vitro a mají mnohem lepší in vivo systémovou a/nebo CNS biodostupnost než jejich výchozí sloučeniny třídy I (Mrz 2/585, 2/501, 2/503 a 2/519). Průnik do CNS je hlavním problémem pro téměř všechny dosud vyvinuté antagonisty glycin_B místa, ale tato nová třída sloučenin překonává tento hlavní problém a tvoří proto terapeuticky relevantní antagonisty glycin_B místa.

Adiční soli

Pomocí technik popsaných výše pro sloučeniny 5, 6, 7, 8, 9 a 10 se připraví adiční soli s kvarterními aminy (například 4-tetramethylamonná sůl, 4-tetraethylamonná sůl), kvarterními aminoalkoholy (například cholinem), nebo kvarterními aminokyselinami (například N,N,N-trimethylserinem). Cholinové a

4-tetramethylamonné (4-NH_3) soli významně zlepšují biodostupnost a jsou výhodné.

Farmaceutické prostředky

Sloučeniny podle předkládaného vynálezu mohou být zpracovány do farmaceutických prostředků obsahujících farmaceuticky přijatelný nosič nebo ředidlo a aktivní sloučeninu podle předkládaného vynálezu. Takové prostředky mohou být podány živočichům, zejména lidem, orálním nebo parenterálním způsobem. Například, přípravky v pevné formě nebo farmaceutické prostředky pro orální podání mohou mít formu kapslí, tablet, pilulek, prášků nebo granulátu. V takových pevných farmaceutických prostředcích je aktivní sloučenina nebo její proléčivo smíšena s alespoň jedním farmaceuticky přijatelným nosičem nebo ředidlem jako je třtinový cukr, laktosa, škrob, talek nebo syntetické nebo přirozené gummy, pojivem jako je želatina, kluzným činidlem jako je stearan sodný a/nebo činidlem podporujícím rozpádivost jako je hydrogenuhličitan sodný. Pro umožnění zpomaleného uvolňování může být do farmaceutického prostředku zapracována substance jako je hydrokoloid nebo jiný polymer. Mohou být přidána také další činidla, jako jsou lubrikační činidla nebo pufry, jak je v oboru běžné. Tablety, pilulky nebo granuláty mohou být opatřeny enterálním potahem, pokud je to žádoucí. Kapalně přípravky pro orální podání mohou být ve formě liposomů, emulsí, roztoků, nebo suspenzí obsahujících běžně používaná inertní ředidla jako je voda. Dále mohou takové kapalně farmaceutické prostředky obsahovat smáčivá, emulgační, dispergační nebo povrchově aktivní činidla, stejně jako sladidla, chuťová korigens nebo čichová korigens.

Vhodné prostředky pro orální podání mohou být - mimo jiné - sterilní vodné nebo nevodné roztoky, suspenze, liposomy nebo

emulse. Další substance, které jsou používány pro tuto formu farmaceutických prostředků, mohou být použity jako farmaceuticky přijatelná ředidla nebo nosiče.

Podle zamýšleného způsobu podání a trvání terapie se může přesná dávka v prostředcích podle předkládaného vynálezu lišit a je určena ošetřujícím lékařem nebo veterinářem. Aktivní činidlo podle předkládaného vynálezu může být kombinováno s jiným farmakologicky aktivním činidlem.

V prostředcích podle předkládaného vynálezu se může poměr aktivního činidla nebo činidel v prostředku velmi lišit, nutné je pouze to, aby aktivní složka podle předkládaného vynálezu nebo její proléčivo tvořila nebo poskytovala účinné množství, t.j. aby byla při použití uvedené dávkové formy podána vhodná účinná dávka. Samozřejmě, několik dávkových forem, stejně jako několik jednotlivých aktivních sloučenin může být podáno ve stejnou nebo v přibližně stejnou dobu nebo i ve stejném farmaceutickém prostředku nebo formulaci.

Způsob léčby

Jak bylo uvedeno výše, sloučeniny podle předkládaného vynálezu jsou vhodné - zejména ve formě farmaceutických prostředků nebo přípravků - pro orální nebo parenterální podání určitých jednotlivých dávek stejně jako denních dávek v jednotlivých případech, které jsou pochopitelně určeny podle dobře známých lékařských a/nebo veterinárních zásad ošetřujícím lékařem nebo veterinářem.

Kromě orálního a parenterálního podání může být použito rektální a/nebo intravenosní podání a dávky jsou významně redukovány, pokud je použito parenterální podání, ačkoliv orální

podání je výhodnější. Vhodné je množství přibližně 1 až 3 g/den, ve formě opakovaných nebo dělených dávek. Širší rozmezí od přibližně 0,5 g do 10 g může být také použito, v závislosti na okolnostech jednotlivých případů. Ačkoliv dávka 500 mg aktivní složky je zejména výhodná pro použití v tabletové formě, jednotlivé dávky mohou být v rozmezí od přibližně 200 do 1000 mg a dávka 500 mg navržená pro použití v tabletách může být samozřejmě podána orálně, například jednou až třikrát za den. Je samozřejmě, že dávka vyšší než jedna tableta může být podána v jedné dávce, jak je nutné pro splnění navrženého denního orálního podání množství 1 až 3 g na den.

Jak již bylo uvedeno, sloučenina podle předkládaného vynálezu nebo její proléčivo může být podána živočichům včetně lidí jakýmkoliv způsobem, například orálně jako kapsle nebo tableta, parenterálně ve formě sterilních roztoků nebo suspenzí nebo pomocí implantace pelet, a v některých případech intravenózně ve formě sterilních roztoků. Jinými běžnými způsoby podání jsou kožní, podkožní, bukalní, intramuskulární a intraperitoneální způsob podání, a určitý způsob podání bude vybrán ošetřujícím lékařem nebo veterinářem.

Je proto zřejmé, že předkládaný vynález poskytuje nové pyrido-ftalazindionové sloučeniny a farmaceutické prostředky obsahující takové sloučeniny, stejně jako způsoby pro léčbu neurologických onemocnění spojených s excitační toxicitou a chybou funkcí glutamatergního neuronálního přenosu, což dohromady poskytuje dlouho očekávané řešení existujících problémů, které nebyly odpovídajícím způsobem vyřešeny.

Mělo by být jasné, že předkládaný vynález není omezen na určité sloučeniny, prostředky, způsoby nebo postupy, které jsou zde popsány, protože odborníkům v oboru budou jasné mnohé

14.04.99

modifikace a změny těchto provedení a proto je předkládaný vynález omezen pouze ve smyslu plného rozsahu připojených patentových nároků.

Odkazv:

Bottenstein JE, Sato GH (1979): *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, pp. 514-517.

Canton T, Doble A, Miquet JM, Jimonet P, Blanchard JC (1992): *J. Pharm. Pharmacol.* 44, pp. 812-816.

Dansyz W, Parsons CG, Bresink I, Quack G (1995): *Drug News & Perspectives* 8, pp. 261-277.

Foster AC, Wong EHF (1987): *Brit. J. Pharmacol.* 91, pp. 403-409.

Hartfree EF (1972): *Analytical Biochemistry* 48, pp. 422-427.

Kessler M, Terramani T, Lynch G, Baudry M (1989): *J. Neurochem.* 52, pp. 1319-1328.

Leander JD, Lawson RR, Ornstein PL, Zimmerman DM (1988): *Brain Res.* 448, p. 115.

Litchfield JT, Wilcoxon F (1949): *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 96, p. 99.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randell RJ (1951): *J. Biol. Chem.* 193, pp. 265-275.

Parsons CG, Gruner R, Rozental J (1994): *Neuropharmacology* 33, pp. 589-604.

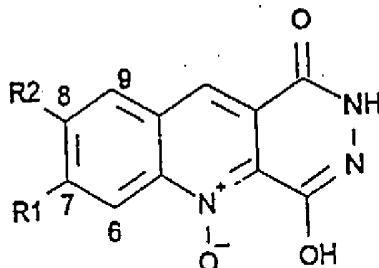
Wroblewski F, LaDue JS (1955): *Soc. Exp. Biol. Med.* 90, p. 210.

Yoneda Y, Suzuki T, Ogita K, Han DK (1993): *J.*

14.04.99

P a t e n t o v é n á r o k y

1. Sloučenina vybraná z pyridyl-ftalazindionů majících následující vzorec:



kde R1 a R2 jsou vybrány ze skupiny zahrnující vodík, halogen a methoxy nebo kde R1 a R2 dohromady tvoří methylendioxy skupinu, nebo její farmaceuticky přijatelná sůl.

2. Sloučenina podle nároku 1, kde sůl je vybrána z její cholinové a 4-tetramethylamonné soli.

3. Sloučenina podle nároku 1, která je vybrána ze skupiny zahrnující:

4-hydroxy-1-oxo-1,2-dihydro-pyridazino[4,5-b]-chinolin-5-oxid,
8-chlor-4-hydroxy-1-oxo-1,2-dihydropyridazino[4,5-b]-chinolin-5-oxid,
8-brom-4-hydroxy-1-oxo-1,2-dihydropyridazino[4,5-b]-chinolin-5-oxid,
8-fluor-4-hydroxy-1-oxo-1,2-dihydropyridazino[4,5-b]-chinolin-5-oxid,
7,8-dichlor-4-hydroxy-1-oxo-1,2-dihydropyridazino[4,5-b]-chinolin-5-oxid,
7-brom-8-chlor-4-hydroxy-1-oxo-1,2-dihydropyridazino[4,5-b]-chinolin-5-oxid, a
7-chlor-8-brom-4-hydroxy-1-oxo-1,2-dihydropyridazino[4,5-b]-chinolin-5-oxid, a farmaceuticky přijatelné soli jakékoliv z výše uvedených sloučenin.

4. Sloučenina podle nároku 2, která je vybrána ze skupiny zahrnující

4-hydroxy-1-oxo-1,2-dihydro-pyridazino[4,5-b]-chinolin-5-oxid, cholinová sůl,

8-chlor-4-hydroxy-1-oxo-1,2-dihydropyridazino[4,5-b]-chinolin-5-oxid-cholinová sůl,

8-brom-4-hydroxy-1-oxo-1,2-dihydropyridazino[4,5-b]-chinolin-5-oxid-cholinová sůl,

8-fluor-4-hydroxy-1-oxo-1,2-dihydropyridazino[4,5-b]-chinolin-5-oxid-cholinová sůl,

7,8-dichlor-4-hydroxy-1-oxo-1,2-dihydropyridazino[4,5-b]-chinolin-5-oxid-cholinová sůl,

7-brom-8-chlor-4-hydroxy-1-oxo-1,2-dihydropyridazino[4,5-b]-chinolin-5-oxid-cholinová sůl, a

7-chlor-8-brom-4-hydroxy-1-oxo-1,2-dihydropyridazino[4,5-b]-chinolin-5-oxid-cholinová sůl.

5. Farmaceutický prostředek v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje jako aktivní složku množství sloučeniny podle nároku 1 účinné pro antagonizování glycin_B místa, spolu s farmaceuticky přijatelným nosičem nebo ředidlem.

6. Farmaceutický prostředek v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje jako aktivní složku množství sloučeniny podle nároku 1 ve formě cholinové soli účinné pro antagonizování glycin_B místa, spolu s farmaceuticky přijatelným nosičem nebo ředidlem.

7. Farmaceutický prostředek v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje jako aktivní složku množství sloučeniny účinné pro antagonizování glycin_B místa, kde uvedená sloučenina je vybrána ze skupiny zahrnující:

4-hydroxy-1-oxo-1,2-dihydro-pyridazino[4,5-b]-chinolin-5-oxid,

14.04.99

8-chlor-4-hydroxy-1-oxo-1,2-dihydropyridazino[4,5-b]-chinolin-5-oxid,
 8-brom-4-hydroxy-1-oxo-1,2-dihydropyridazino[4,5-b]-chinolin-5-oxid,
 8-fluor-4-hydroxy-1-oxo-1,2-dihydropyridazino[4,5-b]-chinolin-5-oxid,
 7,8-dichlor-4-hydroxy-1-oxo-1,2-dihydropyridazino[4,5-b]-chinolin-5-oxid,
 7-brom-8-chlor-4-hydroxy-1-oxo-1,2-dihydropyridazino[4,5-b]-chinolin-5-oxid, a
 7-chlor-8-brom-4-hydroxy-1-oxo-1,2-dihydropyridazino[4,5-b]-chinolin-5-oxid; a farmaceuticky přijatelné soli jakékoliv z výše uvedených sloučenin.

8. Farmaceutický prostředek v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje jako aktivní složku množství sloučeniny účinné pro antagonizování glycin_B místa, kde uvedená sloučenina je vybrána ze skupiny zahrnující:

4-hydroxy-1-oxo-1,2-dihydro-pyridazino[4,5-b]-chinolin-5-oxid, cholinová sůl,
 8-chlor-4-hydroxy-1-oxo-1,2-dihydropyridazino[4,5-b]-chinolin-5-oxid-cholinová sůl,
 8-brom-4-hydroxy-1-oxo-1,2-dihydropyridazino[4,5-b]-chinolin-5-oxid-cholinová sůl,
 8-fluor-4-hydroxy-1-oxo-1,2-dihydropyridazino[4,5-b]-chinolin-5-oxid-cholinová sůl,
 7,8-dichlor-4-hydroxy-1-oxo-1,2-dihydropyridazino[4,5-b]-chinolin-5-oxid-cholinová sůl,
 7-brom-8-chlor-4-hydroxy-1-oxo-1,2-dihydropyridazino[4,5-b]-chinolin-5-oxid-cholinová sůl, a
 7-chlor-8-brom-4-hydroxy-1-oxo-1,2-dihydropyridazino[4,5-b]-chinolin-5-oxid-cholinová sůl.

9. Způsob pro léčbu neurologických onemocnění spojených s excitační toxicitou a chybnou funkcí glutamatergního neuronálního přenosu u živých zvířat v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje krok podání sloučeniny podle nároku 1 v množství účinném pro antagonizování glycín_B místa uvedenému živému zvířeti, které potřebuje takovou léčbu.

10. Způsob pro léčbu neurologických onemocnění spojených s excitační toxicitou a chybnou funkcí glutamatergního neuronálního přenosu u živých zvířat v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje krok podání sloučeniny podle nároku 1 ve formě cholinové soli v množství účinném pro antagonizování glycín_B místa uvedenému živému zvířeti, které potřebuje takovou léčbu.

11. Způsob pro léčbu neurologických onemocnění spojených s excitační toxicitou a chybnou funkcí glutamatergního neuronálního přenosu u živých zvířat v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje krok podání sloučeniny v množství účinném pro antagonizování glycín_B místa uvedenému živému zvířeti, které potřebuje takovou léčbu, kde uvedená sloučenina je vybrána ze skupiny zahrnující:

4-hydroxy-1-oxo-1,2-dihydro-pyridazino[4,5-b]-chinolin-5-oxid,
8-chlor-4-hydroxy-1-oxo-1,2-dihydropyridazino[4,5-b]-chinolin-5-oxid,

8-brom-4-hydroxy-1-oxo-1,2-dihydropyridazino[4,5-b]-chinolin-5-oxid,

8-fluor-4-hydroxy-1-oxo-1,2-dihydropyridazino[4,5-b]-chinolin-5-oxid,

7,8-dichlor-4-hydroxy-1-oxo-1,2-dihydropyridazino[4,5-b]-chinolin-5-oxid,

7-brom-8-chlor-4-hydroxy-1-oxo-1,2-dihydropyridazino[4,5-b]-chinolin-5-oxid, a

7-chlor-8-brom-4-hydroxy-1-oxo-1,2-dihydropyridazino[4,5-b]-

-chinolin-5-oxid, a farmaceuticky přijatelné soli jakékoliv z výše uvedených sloučenin.

12. Způsob pro léčbu neurologických onemocnění spojených s excitační toxicitou a chybou funkcí glutamatergního neuronálního přenosu u živých zvířat v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje krok podání sloučeniny v množství účinném pro antagonizování glycin_a místa uvedenému živému zvířeti, které potřebuje takovou léčbu, kde uvedená sloučenina je vybrána ze skupiny zahrnující:

4-hydroxy-1-oxo-1,2-dihydro-pyridazino[4,5-b]-chinolin-5-oxid, cholinová sůl,
8-chlor-4-hydroxy-1-oxo-1,2-dihydropyridazino[4,5-b]-chinolin-5-oxid-cholinová sůl,
8-brom-4-hydroxy-1-oxo-1,2-dihydropyridazino[4,5-b]-chinolin-5-oxid-cholinová sůl,
8-fluor-4-hydroxy-1-oxo-1,2-dihydropyridazino[4,5-b]-chinolin-5-oxid-cholinová sůl,
7,8-dichlor-4-hydroxy-1-oxo-1,2-dihydropyridazino[4,5-b]-chinolin-5-oxid-cholinová sůl,
7-brom-8-chlor-4-hydroxy-1-oxo-1,2-dihydropyridazino[4,5-b]-chinolin-5-oxid-cholinová sůl, a
7-chlor-8-brom-4-hydroxy-1-oxo-1,2-dihydropyridazino[4,5-b]-chinolin-5-oxid-cholinová sůl.

13. Způsob pro přípravu 4-hydroxy-1-oxo-1,2-dihydropyridazino[4,5-b]-chinolin-5-oxidu (5) v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje stupeň přeměny dimethylchinolin-2,3-dikarboxylat-1-oxidu (3) na hydrazinovou sůl (4) reakcí s hydratem hydrazinu a hydrolyzováním vzniklé hydrazinové soli (4) za zisku požadovaného 4-hydroxy-1-oxo-1,2-dihydropyridazino[4,5-b]-chinolin-5-oxidu (5).

14.04.99

14. Způsob podle nároku 13 v y z n a č u j í c í s e t í m,
že takto získaný 4-hydroxy-1-oxo-1,2-dihydropyridazino-[4,5-b]-
-chinolin-5-oxid (5) je přeměněn na jeho cholinovou sůl (6)
reakcí s hydroxidem cholinu.