

Нові хімічні сполуки, що є піридофалазин-діонами, які містять їх фармацевтичні композиції і їх використання при неврологічних порушеннях, зв'язаних із ексцитотоксичністю й дисфункцією глутаматергічної нейротрансмісії.

Глутамат є, мабуть, основним стимулюючим медіатором у центральній нервовій системі, але, крім того, можливо, утягується в багато патологічних і ексцитотоксичних процесів. І, як такий, представляє великий інтерес при одержанні антагоністів глутамату для терапевтичного застосування (див., Danysz et al., 1995 для огляду). Глутамат активує три основних типи іонотропного (іонотропічного) рецептора, а саме, α -аміно-3-гідрокси-5-метил-4-ізоксазолпропіонову кислоту (AMPA), кайнат і N-метил-D-аспартат (NMDA) і деякі типи метаботропічних рецепторів. Антагонізм NMDA рецепторів потенційно має широку область терапевтичного застосування. Функціональне інгібування NMDA рецепторів може бути досягнуте через вплив на різні ділянки розпізнавання, такі як ділянка первинного медіатору, нечутлива до стрижніну ділянка гліцину (гліцин_в), ділянка поліаміну і ділянка фенциклідину, локалізована усередині катіонного каналу.

Десенсибілізація рецептора може представляти фізіологічний процес, що служить механізмом ендogenous регулювання для запобігання довгострокової нейротоксичної активації глутамат-рецепторів, але допускає їхню тимчасову фізіологічну активацію. У випадку NMDA рецептора спільним агоністом гліцину є ендogenous ліганд, що інгібує таку десенсибілізацію шляхом активації ділянки гліцину_в. Цікаво, що ішемія підвищує не тільки концентрацію позаклітинного глутамату, але також концентрацію гліцину і, хоча цей останній ефект є менш явним, він у дійсності зберігається багато довше. Отже, деякі повні гліцин_в-антагоністи можуть відновлювати нормальну синаптичну передачу в таких умовах шляхом підвищення NMDA рецепторної десенсибілізації до її фізіологічного рівня. У дійсності, на підставі загального введення лабораторним тваринам, було висунуте припущення, що гліцин_в-антагоністи можуть давати більше терапевтичне вікно, чим агенти, що діють на інші ділянки розпізнавання NMDA рецепторного комплексу. На жаль, погані фармакокінетичні властивості більшості гліцин_в-антагоністів, до самого останнього часу, виключали чітку перевірку цього припущення після загального введення. Однак, повідомляється, що деякі гліцин_в-антагоністи мають дуже гарні терапевтичні індекси після загального введення в моделях гіпералгезії у якості транквілізаторів (анксіолітиків).

Заявниками отриманий ряд трициклічних "піридо-фалазин-діонів". Сполуки класу I структурно відносяться до патентованих гліцин_в-антагоністів Zeneca (ICI, EPA 0 516 297 A1, 02.12.92). Клас II сполук складають N-оксид-похідні цих сполук, і вони не описані і не висунуті у якості можливих сполук у патенті Zeneca. Сполуки класу II також є сильними антагоністами гліцину_в *in vitro* (у лабораторній судині) і виявляють значно велику *in vivo* (у живому організмі) загальну засвоюваність і/або проникнення через гематоенцефалічний бар'єр, чим сполуки класу I. Крім того, сольові похідні цих сполук одержують, приміром, додаванням холіну і 4-тетраметиламонію (4-NH₃), додатково поліпшуючи біоприйнятність.

Нові сполуки за даним винаходом мають прогнозоване використання при лікуванні наступних хвороб.

1. Гостра ексцитотоксичність, така як ішемія під час раптового приступу, травма, гіпоксія, гіпоглікемія і печінкова енцефалопатія (гепатарія).

2. Хронічні нейродегенеративні захворювання, такі як хвороба Альцгеймера, васкулярне слабоумство, хвороба Паркінсона, хвороба Huntington', розсіяний склероз, бічний аміотрофічний склероз, СНІД-нейродегенерація, олівопонтocereбелярна дистрофія, синдром Tourette', мотонейронна хвороба, мітохондріальна дисфункція, синдром Корсакова і хвороба Крейтцфельда-Якоба.

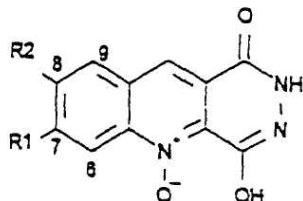
3. Інші хвороби, зв'язані з тривалими відновлюваними змінами у центральній нервовій системі, такі як хронічний біль, толерантність до лікарського засобу, лікарська залежність і звикання до надмірного уживання лікарських засобів (наприклад, до опіатів, кокаїну, бензодіазепінів і алкоголю) і пізня дискінезія.

4. Епілепсія (поширені і парціальні комплексні епілептичні нападки), шизофренія, страх, депресія, гострий біль, м'язова еластичність і шум у вухах.

Задача винаходу полягає у одержанні нових і більш ефективних сполук піридо-фалазин-діону, їхніх фармацевтичних композицій і розробці способу лікування ними неврологічних порушень, зв'язаних із ексцитотоксичністю і дисфункцією глутаматергічної нейротрансмісії. Подальша задача винаходу полягає у одержанні таких нових сполук, композицій і способу, що відповідають вищевказаним теоретичним вимогам. Додаткові задачі будуть виявлені нижче, а інші задачі винаходу очевидні для будь-якого фахівця у відповідній області.

Отже, винахід включає наступні аспекти, серед іншого, окремо або в комбінації:

Сполуку, яку вибирають із тих піридил-фалазин-діонів, що мають наступну формулу:



де R₁ і R₂ вибирають із групи, що включає водень, галоген і метокси, або де R₁ і R₂ разом утворюють метилендіокси, і її фармацевтично прийнятні солі; таку сполуку, сіль якої вибирають із її солі з холіном або 4-тетраметиламонієм; таку сполуку, яку вибирають із групи, що включає:

- 4-гідрокси-1-оксо-1,2-дигідропіридазино[4,5-b]хінолін-5-оксид,
- 8-хлор-4-гідрокси-1-оксо-1,2-дигідропіридазино[4,5-b]хінолін-5-оксид,
- 8-бром-4-гідрокси-1-оксо-1,2-дигідропіридазино[4,5-b]хінолін-5-оксид,
- 8-фтор-4-гідрокси-1-оксо-1,2-дигідропіридазино[4,5-b]хінолін-5-оксид,
- 7,8-дихлор-4-гідрокси-1-оксо-1,2-дигідропіридазино[4,5-b]хінолін-5-оксид,

7-бром-8-хлор-4-гідрокси-1-оксо-1,2-дигідропіридазино [4,5-b] -хінолін-5-оксид і
7-хлор-8-бром-4-гідрокси-1-оксо-1,2-дигідропіридазино [4,5-b] хінолін-5-оксид і фармацевтично прийнятну
сіль будь-якої з перерахованих вище сполук; і таку сполуку, яку вибирають із групи, що включає:

сіль 4-гідрокси-1-оксо-1,2-дигідропіридазино[4,5-b] хінолін-5-оксид-холіну,
сіль 8-хлор-4-гідрокси-1-оксо-1,2-дигідропіридазино [4,5-b] хінолін-5-оксид-холіну,
сіль 8-бром-4-гідрокси-1-оксо-1,2-дигідропіридазино [4,5-b] хінолін-5-оксид-холіну,
сіль 8-фтор-4-гідрокси-1-оксо-1,2-дигідропіридазино [4,5-b] хінолін-5-оксид-холіну,
сіль 7,8-дихлор-4-гідрокси-1-оксо-1,2-дигідропіридазино [4,5-b] хінолін-5-оксид-холіну,
сіль 7-бром-8-хлор-4-гідрокси-1-оксо-1,2-дигідропіридазино [4,5-b] хінолін-5-оксид-холіну і
сіль 7-хлор-8-бром-4-гідрокси-1-оксо-1,2-дигідропіридазино [4,5-b] хінолін-5-оксид-холіну.

Крім того, фармацевтична композиція, що містить у якості активного інгредієнта таку сполуку в ефективній
гліцин_в-антагоністичній кількості; така фармацевтична композиція, що містить у якості активного інгредієнта
таку сполуку, в ефективній гліцин_в-антагоністичній кількості, у формі солі холіну; така фармацевтична
композиція, що містить у якості активного інгредієнта сполуку, в ефективній гліцин_в-антагоністичній кількості,
яку вибирають із групи, що включає:

4-гідрокси-1-оксо-1,2-дигідропіридазино[4,5-b]хінолін-5-оксид,
8-хлор-4-гідрокси-1-оксо-1,2-дигідропіридазино[4,5-b]хінолін-5-оксид,
8-бром-4-гідрокси-1-оксо-1,2-дигідропіридазино[4,5-b]хінолін-5-оксид,
8-фтор-4-гідрокси-1-оксо-1,2-дигідропіридазино[4,5-b]хінолін-5-оксид,
7,8-дихлор-4-гідрокси-1-оксо-1,2-дигідропіридазино[4,5-b]хінолін-5-оксид,
7-бром-8-хлор-4-гідрокси-1-оксо-1,2-дигідропіридазино [4,5-b] -хінолін-5-оксид і
7-хлор-8-бром-4-гідрокси-1-оксо-1,2-дигідропіридазино[4,5-b] хінолін-5- оксид або фармацевтично

прийнятну сіль будь-якої з перерахованих вище сполук; і така фармацевтична композиція, що містить у якості
активного інгредієнта сполуку, в ефективному гліцин_в-антагоністичній кількості, яку вибирають із групи, що
включає:

сіль 4-гідрокси-1-оксо-1,2-дигідропіридазино[4,5-b]хінолін-5-оксид-холіну,
сіль 8-хлор-4-гідрокси-1-оксо-1,2-дигідропіридазино[4,5-b]хінолін-5-оксид-холіну,
сіль 8-бром-4-гідрокси-1-оксо-1,2-дигідропіридазино[4,5-b]хінолін-5-оксид-холіну,
сіль 8-фтор-4-гідрокси-1-оксо-1,2-дигідропіридазино [4,5-b] -хінолін-5-оксид-холіну,
сіль 7,8-дихлор-4-гідрокси-1-оксо-1,2-дигідропіридазино[4,5-b] хінолін-5-оксид-холіну,
сіль 7-бром-8-хлор-4-гідрокси-1-оксо-1,2-дигідропіридазино[4,5-b] -хінолін-5-оксид-холіну й
сіль 7-хлор-8-бром-4-гідрокси-1-оксо-1,2-дигідропіридазино [4,5-b] хінолін-5-оксид-холіну.

Далі, спосіб боротьби з неврологічними порушеннями, зв'язаними з ексцитотоксичністю й дисфункцією
глутаматергічної нейротрансмісії у живої тварини, що включає стадію введення потребуючій лікування живої
тварині такої сполуки або фармацевтичної композиції, в ефективній гліцин_в-антагоністичній кількості, такий
спосіб, де сполука існує у формі солі холіну; такий спосіб, де сполуку вибирають із групи, що включає:

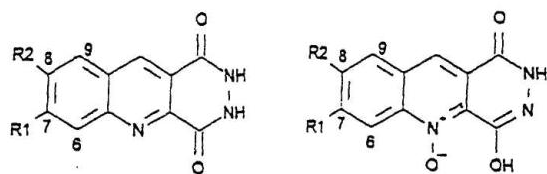
4-гідрокси-1-оксо-1,2-дигідропіридазино[4,5-b]-хінолін-5-оксид,
8-хлор-4-гідрокси-1-оксо-1,2-дигідропіридазино[4,5-b]хінолін-5-оксид,
8-бром-4-гідрокси-1-оксо-1,2-дигідропіридазино[4,5-b]хінолін-5-оксид,
8-фтор-4-гідрокси-1-оксо-1,2-дигідропіридазино[4,5-b]хінолін-5-оксид,
7,8-дихлор-4-гідрокси-1-оксо-1,2-дигідропіридазино[4,5-b]хінолін-5-оксид,
7-бром-8-хлор-4-гідрокси-1-оксо-1,2-дигідропіридазино-[4,5-b]хінолін-5-оксид і
7-хлор-8-бром-4-гідрокси-1-оксо-1,2-дигідропіридазино[4,5-b]хінолін-5-оксид або фармацевтично

прийнятну сіль будь-якої з перерахованих вище сполук; і такий спосіб боротьби з неврологічними
порушеннями, зв'язаними з ексцитотоксичністю і дисфункцією глутаматергічної нейротрансмісії у живої
тварини, який включає стадію введення потребуючій лікування живої тварині сполуки, в ефективній гліцин_в-
антагоністичній кількості, яку вибирають із групи, що включає:

сіль 4-гідрокси-1-оксо-1,2-дигідропіридазино [4,5-b]хінолін-5-оксид-холіну,
сіль 8-хлор-4-гідрокси-1-оксо-1,2-дигідропіридазино[4,5-b]хінолін-5-оксид-холіну,
сіль 8-бром-4-гідрокси-1-оксо-1,2-дигідропіридазино [4,5-b]хінолін-5-оксид-холіну,
сіль 8-фтор-4-гідрокси-1-оксо-1,2-дигідропіридазино [4,5-b] -хінолін-5-оксид-холіну,
сіль 7, 8-дихлор-4-гідрокси-1-оксо-1,2-дигідропіридазино[4,5-b] -хінолін-5-оксид-холіну,
сіль 7-бром-8-хлор-4-гідрокси-1-оксо-1,2-дигідропіридазино [4,5-b] -хінолін-5-оксид-холіну й
сіль 7-хлор-8-бром-4-гідрокси-1-оксо-1,2-дигідропіридазино [4,5-b] хінолін-5-оксид-холіну.

Мається на увазі, що наступне обговорення, приклади й фармакологія приведені з метою ілюстрації
даного винаходу, а не в порядку обмеження.

Основна структура трициклічних "піридо-фталазин-діонів" класу I і класу II;



R1 /R2 = H і/або галоген

R1 /R2 = H і/або O-CH₃

R1 /R2 = H і/або метилendioкси

Хімія

Основний спосіб одержання диметил-хінолін-2,3-дикарбоксилат-1-оксидів (3)

Охолоджений розчин (крижана лазня) 2-нітробензальдегіду 1 (25мМ) і натрію (27мМ) у безводному

метанолі (40мл) обробляють протягом 30 хвилин розчином диметил(діетоксифосфініл) сукцинату 2 (30мМ, отриманий як описано Linke et al., Lieb. Ann. Chem., 1980(4), 542) у безводному метанолі (10мл). Отриманий темний розчин перемішують при 0-5°C протягом 1,5 год., розчинник упарюють при зниженому тиску і залишок розподіляється між етилацетатом і водою. Етилацетат сушать над сульфатом натрію і потім упарюють при зниженому тиску. Залишок перекристалізують з ізопропанолу, одержуючи зазначений у заголовку диметил-хінолін-2,3-дикарбоксилат-1-оксид 3 у виді не зовсім білого (або ясно-жовтого) порошку.

Фізичні властивості і ¹H-ЯМР-спектральні дані для сполук 3 приведені в таблицях 1 і 2.

а. 5-Бром-4-хлор-2-нітробензальдегід (1f)

До суміші сірчаної кислоти (40мл) і нітрату натрію (2,66г, 31,3мМ) при 0-5°C добавляють 3-бром-4-хлорбензальдегід (6,25г, 28,5мМ). Отриману суміш перемішують при кімнатній температурі протягом 7 годин і розбавляють крижаною водою (300мл). Осаджені тверді продукти відфільтровують, промивають водою і сушать, одержуючи порошок. Перекристалізація цієї сполуки із суміші ізопропанолу і води (2:1) дає зазначений у заголовку 2-нітробензальдегід 1f (3,6г, 51,5%) у виді ясно-жовтого порошку, т.пл. 81-82°C.

Аналіз для C₇H₃BrClNO₃:

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

Знайдено (%): C 31,55 H 0,98 N 5,09

¹H-ЯМР (CDCl₃), δ: 8,22 (с, 1H), 8,23 (с, 1H), 10,39 (с, 1H).

б. 4-Бром-5-хлор-2-нітробензальдегід (1g)

Використовуючи спосіб (а), за тим виключенням, що виходять із 4-бром-3-хлорбензальдегіду (2,97г, 13,5мМ) одержують зазначену в заголовку сполуку 1d (1,9г, 53,0%) у виді ясно-жовтого порошку, т.пл. 95-98°C.

Аналіз для C₇H₃BrClNO₃:

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

Знайдено (%): C 31,60 H 1,01 N 5,11

¹H-ЯМР (CDCl₃), δ: 8,02 (с, 1H), 8,43 (с, 1H), 10,39 (с, 1H).

Основний спосіб одержання диметил-хінолін-2,3-дикарбоксилатів (7)

Розчин N-оксиду 3 (10мМ) і трихлориду фосфору (30мМ) у безводному хлороформі (100мл) нагрівають до температури кипіння зі зворотним холодильником протягом 7 год. Розчинник видаляють при зниженому тиску і залишок розподіляється між етилацетатом і водою. Органічний шар сушать над сульфатом натрію і потім упарюють при зниженому тиску. Залишок перекристалізують з ізопропанолу, одержуючи зазначений у заголовку диметил хінолін-2,3-дикарбоксилат 7 у виді не зовсім білого (або ясно-жовтого) порошку.

Фізичні властивості і ¹H-ЯМР-спектральні дані для сполук 7 приведені в таблицях 3 і 4.

Основний спосіб одержання 4-гідрокси-1-оксо-1,2-дигідропіридазино [4, 5-b] хінолін-5-оксидів (5)

До розчину, що перемішується, (або суспензії) диметил хінолін-2,3-дикарбоксилат-1-оксид 3 (5мМ) у киплячому етанолі (25мл) в атмосфері аргону добавляють гідразин-гідрат (15мМ) і суміш нагрівають до температури кипіння зі зворотним холодильником протягом 3 год., за цей час утворюється темний осад. Після охолодження до кімнатної температури реакційну суміш відфільтровують, і зібрані тверді продукти промивають етанолом і діетиловим ефіром і сушать, одержуючи сіль гідразину 4. Цю речовину перемішують при 70 - 110°C 3 год. в оцтовій кислоті (15мл) і, після охолодження до кімнатної температури, суміш розбавляють водою (45мл) і потім фільтрують, щоб зібрати тверді продукти. Зібрані тверді продукти промивають етанолом і сушать, одержуючи темно-жовту тверду речовину. Декілька перекристалізацій цього продукту з диметилформаміду дають зазначений у заголовку піридазино[4,5-b]хінолін-5-оксид 5 у виді жовтого порошку.

Фізичні властивості і ¹H-ЯМР-спектральні дані для сполук 5 приведені в таблицях 5 і 6.

Основний спосіб одержання 1,4-діоксо-1,2,3,4-тетрагідропіридазино[4,5-b]-хінолінів (9)

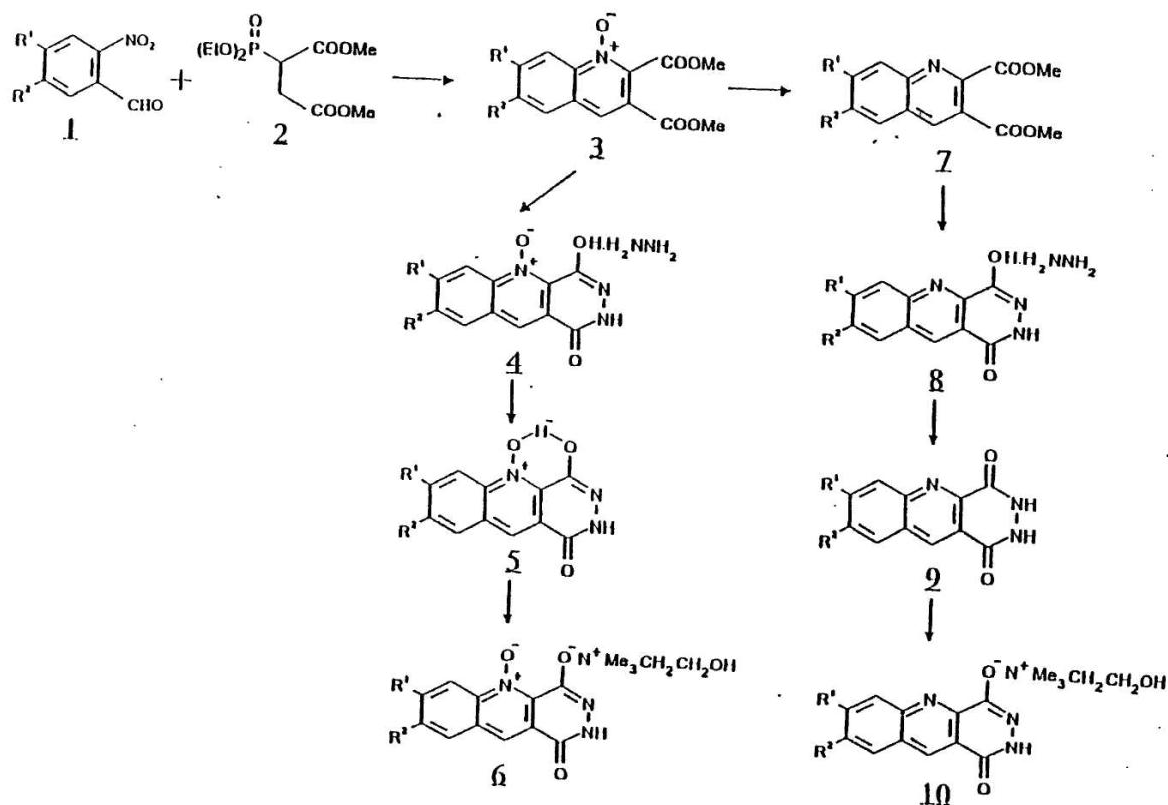
До розчину, що перемішується, (або суспензії) диметил хінолін-2,3-дикарбоксилату 7 (5мМ) у киплячому етанолі (25мл) добавляють гідразин-гідрат (30мМ) і суміш нагрівають до температури кипіння зі зворотним холодильником протягом 8 год., за цей час утворюється осад. Після охолодження до кімнатної температури реакційну суміш відфільтровують і зібрані тверді продукти промивають етанолом і діетиловим ефіром і сушать, одержуючи сіль гідразину 8. Цю речовину перемішують при 70-100°C 3 год. в оцтовій кислоті (15мл) і, після охолодження до кімнатної температури, суміш розбавляють водою (45мл) і потім фільтрують, щоб зібрати тверді продукти. Зібрані тверді продукти промивають етанолом і діетиловим ефіром і сушать, одержуючи зазначений у заголовку піридазино[4,5-b] хінолін 9 у виді жовтого порошку.

Фізичні властивості і ¹H-ЯМР-спектральні дані для сполук 9 приведені в таблицях 7 і 8.

Основний спосіб одержання солей 4-гідрокси-1-оксо-1,2-дигідропіридазино [4,5-b]хінолін-5-оксид-холіну (6) і солей 1,4-діоксо-1,2,3,4-тетрагідропіридазино [4,5-b]хінолін-холіну (10)

До суспензії, що перемішується, піридазино [4,5-b] -хіноліну 9 або N-оксиду 5 (10мМ) у метанолі (50мл) добавляють гідроксид холіну (10,5мМ, 45 ваг. % розчин у метанолі). Отриманий розчин концентрують, використовуючи роторний випарник, і твердий залишок перекристалізують з етанолу, одержуючи зазначену у заголовку сіль холіну 10 або 6 у виді пігроскопічного жовтого порошку (або червоного) порошку.

Фізичні властивості і ¹H-ЯМР-спектральні дані для сполук 6 і 10 приведені в таблицях 9,10 і 11, 12, відповідно.



Таблиця 1

Отримані диметил-хінолін-2,3- дикарбоксилат-1-оксиди 3

Спол.	R ¹	R ²	Формула (mw)	Елементарний аналіз,						т.пл. (С°)	Вихід (%)
				Розраховано (%)			Знайдено (%)				
				C	H	N	C	H	N		
3a	H	H	C ₁₃ H ₁₁ NO ₅ (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 ₅ (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 ₅ (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 ₅ (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 ₅ (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 ₅ (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 ₅ (374.6)	41.69	2.42	3.74	41.68	2.25	3.75	206-208	62.5

Таблиця 2

¹H-ЯМР (CDCl₃)-спектральні дані для сполук 3

Спол.	δ (м.д.), J (Гц)
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)

Таблиця 3

Отримані диметил-хінолін-2,3-дикарбоксилати 7

Спол.	R ¹	R ²	Формула (mw)	Елементарний аналіз						т.пл.(С°)	Вихід (%)
				Розраховано (%)			Знайдено (%)				
				C	H	N	C	H	N		
7a	H	H	C ₁₃ H ₁₁ NO ₄	63.67	4.52	5.71	63.48	4.52	5.63	104-106	88.0

			(245.2)								
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 BrClNO 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 BrClNO ₄ (348.6)	43.55	2.53	3.91	43.47	2.51	3.87	142-144	67.0

Таблиця 4

¹H-ЯМР (CDCl₃)- спектральні дані для сполук 7

Спол.	δ (м.д.), J (Гц)
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)

Таблиця 5

Отримані 5,4-гідрокси-1-оксо-1,2-дигідропіридазино [4,5-b]хінолін-5-оксиди 5

Mrz2/	Спол.	R ¹	R ²	Формула (mw)	Елементарний аналіз						Т.Пл.	Вихід(%)
					Розраховано (%)			Знайдено (%)				
					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 (398.1)	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

Таблиця 6

¹H -ЯМР (DMSO-d₆) - спектральні дані для сполук 5

Спол.	δ (м.д.), J (Гц)	
	ароматичні протони (і OCH ₃)	NH, OH (обмінювані)
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)

Таблиця 7

Отримані 1,4-діоксо-1,2,3,4-тетрагідропіридазино[4,5-b]хіноліни 9

Mrz2/	Спол.	R ¹	R ²	Формула (mw)	Елементарний аналіз						Т.Пл.	Вихід (%)
					Розраховано (%)			Знайдено (%)				
					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	53.35	2.44	16.97	52.89	2.28	16.68	>300	88.5

				(247.6)								
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

Таблиця 8

¹H-ЯМР (ДМСО-d₆) - спектральні дані для сполук 9

Спол.	δ (м.д.), J (Гц)	
	ароматні протони	NH (обмінювані)
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, 2 H)
9c	8.16 (m, 2H), 8.60 (br. s, 1H), 9.25 (s, 1H)	11.55 (br. s, 2 H)
9d	7.93 (ddd, J ₁ = 9.5, J _{2(H,F)} = 9.0, J ₃ = 2.5, 1H), 8.18 (dd, J _{1(H,F)} = 9.5, J ₂ = 2.5, 1H), 8.36 (dd J ₁ = 9.5, J _{2(H,F)} = 5.5, 1H), 9.24 (s, 1H)	11.90 (br. s, 2 H)
9e	8.47 (s, 1H), 8.67 (s, 1H), 9.22 (s, 1H)	11.60 (br. s, 2 H)
9f	8.52 (s, 1H), 8.91 (s, 1H), 9.28 (s, 1H)	11.65 (br. s, 2 H)
9g	8.68 (s, 1H), 8.71 (s, 1H), 9.26 (s, 1H)	11.70 (br. s, 2 H)

Таблиця 9

Отримані солі 4-гідрокси-1-оксо-1,2-дигідропіридазино[4,5-b]хінолін-5-оксид-холіну 6

Mrz2/	Спол.	R ¹	R ²	Формула (mw)	Елементарний аналіз						Т.Пл.(С°)	Вихід (%)
					Розраховано для 6xH ₂ O*			Знайдено(%)				
								С	Н	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	179-180	52.5
576	6b	H	Cl	C ₁₆ H ₁₉ ClN ₄ O ₄ (336.8)	49.93	5.50	14.55	49.31	5.47	14.24	185-188	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	191-193	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	201-203	27.0
574	6e	Cl	Cl									
	6f	Cl	Br									
	6a	Br	Cl									

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

Таблиця 10

¹H-ЯМР (CD₃OD) - спектральні дані для солей холіну 6

Спол.	δ (м.д.), J (Гц)	
	протони холіну	ароматичні протони
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		

Таблиця 11

Отримані солі 1,4-діоксо-1,2,3,4-тетрагідропіридазино[4.5-b]хінолін-холіну 10

Mrz2/	Спол.	R ¹	R ²	Формула (mw)	Елементарний аналіз						Т.Пл.	Вихід (%)
					Розраховано для 10xH ₂ O*			Знайдено (%)				
					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	12.66	4.57	12.37	201-203	95.0

* x = 0.25 (d), 1.0 (d, e), 2.5 (c)

Таблиця 12

¹H-ЯМР (CD₃DO) - спектральні дані для солей холіну 10

С пол.	δ (м. д.), J (Гц)	
	протони холіну	ароматичні протони
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)
10c	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)

Фармакологія

In vitro

Вивчення рецепторного зв'язування

Одержання мембран і визначення білка

Препарування тканини здійснюють відповідно до Foster і Wong (1987). У самців Sprague-Dawley пацюків (200-250г) швидко видаляють головний мозок. Кору головного мозку розшаровують і гомогенізують у 20 об'ємах охолодженої льодом 0,32М сахарози, використовуючи скло-тефлоновий гомогенізатор. Гомогенат центрифугують при 1000 об/хв. протягом 10 хв. Осад у пробірці після центрифугування відкидають і супернатант центрифугують при 20000 об/хв. протягом 20 хв. Осад, що утворився, у пробірці після центрифугування повторно суспендують у 20 об'ємах дистильованої води і центрифугують протягом 20 хв. при 8000 об/хв. Потім супернатант і світлий шар кров'яного згустку тричі центрифугують (48 000 об/хв. протягом 20 хв.) у присутності 5мМ Тріс-HCl, pH 7,4. Усі стадії центрифугування виконують при 4°C. Після повторного суспендування в 5 об'ємах 5мМ Тріс-HCl, pH 7,4 суспензію мембран швидко заморожують при -80°C до дня досліджень. У день досліджень мембрани розморожують і промивають чотири рази шляхом суспендування у 5мМ Тріс-HCl, pH 7,4 і центрифугують при 48.000 об/хв. протягом 20 хв. Кінцевий осад у пробірці після центрифугування суспендують у буфері для дослідження.

Кількість білка в кінцевому препараті визначають за способом Lowry (1951) із деякими модифікаціями (Hartfree, 1972). 50мкл зразків білка (у трьох примірниках) розбавляють до 1мл дистильованою водою й обробляють 0,9мл розчину, що містить 2г калій-натрієвого тартрату і 100г Na₂CO₃ у 500мл 1н NaOH і 500мл води. Холосту пробу і стандарт (з альбуміном бичачої сироватки) підготовляють таким же способом. Пробірки поміщують у водяну лазню при 50°C на 10 хв. і прохолоджують до кімнатної температури. Добавляють 100мкл розчину, який містить 2г калій-натрієвого тартрату і 1г CuSO₄ x 5 H₂O у 90мл води і 10мл 1н NaOH. Зразки залишають при кімнатній температурі, щонайменше, на 10 хв., потім швидко добавляють при перемішуванні 3мл реagentи Folin-Ciocalteu (1мл реagentу розбавляють 15мл води). Пробірки знову нагрівають при 50°C протягом 10 хв. і прохолоджують до кімнатної температури. Потім визначають абсорбцію в 1см кюветах при 650nm. Кінцева концентрація білка, використовувана для вивчень, знаходиться в межах 100-250мкг/мл.

Інкубування в обох дослідженнях на зв'язування закінчують, використовуючи фільтруючу систему Millipore. Зразки, всі в потрібному екземплярі, промивають тричі при постійному вакуумі 2,5мл охолодженого льодом буфера для досліджень на фільтрах із скловолокна, які поставляються Schleicher & Schuell. Після поділу й промивання фільтри поміщують у сцинтилюючу рідину, (5мл; Ultima Gold) і утримують на фільтрах

радіоактивність визначають, використовуючи звичайний рідкий сцинтиляційний зчитувач (Hewlett Packard, Liquid scintillation Analyser). "Загальне зв'язування" представляє абсолютну кількість радіоліганду, зв'язаного у відсутності яких-небудь добавок, тоді як "неспецифічне зв'язування" визначають у присутності високої концентрації конкурента.

Дослідження на $[^3\text{H}]5, 7\text{-ДСКА}$ -зв'язування

Експерименти проводять способами, які представляють модифікацію попередніх (Canton et al., 1992; Yoneda et al., 1993). Мембрани суспендують і інкубують у 10мМ Тріс-НСІ, рН 7,4. Час інкубації – 45 хв. при 4°C. Неспецифічне зв'язування $[^3\text{H}]5,7\text{-ДСКА}$ визначають, додаючи немічений гліцин при 0,1мМ. Стоп-розчин містить 10мМ Тріс-НСІ і 10мМ сульфату магнію, рН 7,4. Фільтрування виконують по можливості швидко. Експерименти по заміщенню виконують із фіксованою концентрацією $[^3\text{H}]5,7\text{-ДСКА}$, яка дорівнює 10нМ. Досліджені сполуки розбавляють водою або ДМСО і додають, щонайменше, у 5 різних концентраціях.

Дослідження на зв'язування $[^3\text{H}]$ гліцину

Дослідження, на зв'язування $[^3\text{H}]$ гліцину виконують за способом, описаним Kessler і співробітниками (1989). Кортикальні мембрани пацюків одержують як описано вище і кінцеві осади у пробірці після центрифугування суспендують у 50мМ Трісацетат, рН 7,4. Щонайменше, 5 різних концентрацій досліджених сполук інкубують із 20нМ $[^3\text{H}]$ гліцину протягом 30 хв. при 4°C в присутності 100мкМ стрихніну. Всі сполуки розчиняють у воді або ДМСО, відповідно. Неспецифічне зв'язування визначають шляхом уведення 100мкМ гліцину у суміш, що інкубується. Інкубування обривають, розбавляючи зразки 2мл стоп-розчину (50мМ Тріс-НСІ, включаючи 10мМ сульфату магнію, рН 7,4, охолоджений до <2°C) із наступним додатковим промиванням 2,5мл буферу. Фільтрування виконують по можливості швидко.

Результати

Всім із числа досліджуваних сполук мають значення IC_{50} у (^3H)-ДСКА-дослідженні $\leq 1\text{мкМ}$ (див. таблицю 13). Активність шести відібраних сполук у (^3H)-гліцин-зв'язуванні, - на перший погляд, вище, але це не відбивається у великих різницях розмірів K_d (не приведені). З пар сполук, які представляють особливий інтерес, сполуки класу II мають велику спорідненість у (^3H)-ДСКА-дослідженні, чим сполуки класу I. Ця різниця не так очевидно в (^3H)-гліцин-дослідженні.

Таблиця 13 а

Mrz 2/	Сполуки	$[^3\text{H}]$ -ДСКА IC_{50} мкМ	$[^3\text{H}]$ -гліцин IC_{50} мкМ
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-ДиCl-I	0,530	
518	7,8-ДиCl-II	0,650	

Таблиця 13 б

Mrz 2/	Сполуки	$[^3\text{H}]$ -ДСКА IC_{50} мкМ
572	8-F-I (Хол.)	1,14
571	8-F-II (Хол.)	0,32
569	8-Cl-I (Хол.)	0,97
576	8-Cl-II (Хол.)	0,45

Петч-кламп

Способи

Superior colliculi одержують з ембріонів пацюків (E20-E21) і потім переносять у буферний розчин солей Hank (Gibco), який не містить кальцію і магнію. Клітини піддають механічній дисоціації в 0,05% DNAase / 0,3% ovomucoid (овомукоїд) (Sigma). З наступною 15-хвилинною преінкубацією із 0,66% трипсин / 0,1% DNAase (Sigma). Потім дисоційовані клітини центрифугують при 18G протягом 10 хвилин, ресуспендують у мінімальній кількості основного середовища (Gibco) і висівають при щільності 200.000 клітин см^{-2} на попередньо покриті полі-L-лізином (Sigma) пластикові чашки петрі (Falcon). Клітини вирощують на основному середовищі з мінімальною кількістю NaHCO_3 /HEPES-буферу, доповненому 5% сироваткою плоду корови і 5% конячої сироватки (Gibco) і інкубують при 37°C з 5% CO_2 при вологості 95%. Середовище цілком заміняють із наступним інгібуванням додаткового гліального мітозу цитозин- β -D-арабінофуранозидом (20мкМ Sigma) після приблизно 7 днів in vitro. Після чого середовище частково змінюють двічі в тиждень. Культура superior colliculus була обрана для цих експериментів, оскільки вона забезпечує дуже стабільні умови реєстрації, які є абсолютною передумовою для експериментів по залежності від напруги і кінетичних експериментів. Крім того, відносно невеликі нейрони (нервові Клітини) (сума 15-20мкМ \varnothing) ідеально підходять для мінімізації проблем дифузії в буфері для експериментів кламп-концентрації.

Петч-кламп реєстратори були виготовлені з цих нейронів із полірованими скляними електродами (4-6Мом) за методом цілої клітини при кімнатній температурі (20-22°C) із додаванням EPC-7-підсилювача (List). Досліджувані сполуки наносять за допомогою комутаційних каналів зробленої на замовлення системи для швидкого переливання з загальним витіканням (періоди обміну 10-20 мілісекунд). Склад внутрішньоклітинного розчину такий (мМ): CsCl (120), TEACl (20), EGTA (10), MgCl_2 (1), CaCl_2 (0,2), глюкоза (10), ATP (2), cAMP (0,25); рН доводять до 7,3 за допомогою CsOH або HCl. Внутрішньоклітинні розчини мають такий основний

склад (мМ):

NaCl (140), KCl (3), CaCl₂ (0,2), глюкоза (10), HEPES (10), сахароза (4,5), тетродотоксин (ТТХ 3*10⁻⁴). У більшості експериментів гліцин (1мкМ) є присутнім у всіх розчинах. Експерименти по дослідженню гліцин-залежності трициклічних "піридо-фталазин-діонів" здійснюють при постійній присутності зростаючих концентрацій гліцину (1-10мкМ).

Результати

П'ять пар трициклічних "піридо-фталазин-діонів" мають значення IC₅₀ у порівнянні з внутрішніми струмами для NMDA (200мкМ), в області низьких мкМ і сполуки класу II звично в 2-3 рази більш активні, ніж сполуки класу I (таблиця 14 а). Найбільшу активність із них мають Mrz 2/502 і Mrz 2/514. Цей ефект опосередкований на ділянку гліцину, як очевидний, шляхом рівнобіжного зрушення кривих концентрація - відповідна реакція в присутності зростаючих концентрацій гліцину. Таким чином, величини K_b для Mrz 2/502, як визначено по співвідношенню Cheng-Prusoff, є тими самими в гліцині 1, 3 і 10мкМ (80, 124 і 118нМ, відповідно); Крім того, дії Mrz 2/501 і Mrz 2/502 не залежать від напруги. Всі досліджені сполуки приблизно в 3-10 разів більш активні стосовно струмів сталого режиму, чим до максимальних струмів. Похідні холіну мають аналогічні ефективності щодо вільних кислот in vitro (таблиця 14 б).

На противагу, із цих сильних антагоністів гліцину, тільки три є дуже слабкими антагоністами струмів, спрямованих усередину до AMPA (100мкМ). Mrz 2/502, Mrz 2/514 і Mrz 2/516 мають значення IC₅₀ відносно максимальних AMPA-індукованих струмів 25, 73 і 18мкМ, відповідно, але в значній мірі не активні у відношенні платових струмів, усі значення IC₅₀ > 100мкМ (таблиця 14а). Цей профіль активності, хоча дуже слабкий, є характерним для конкурентних AMPA-рецепторних антагоністів, які переважно блокують максимально недесенсибілізований стан, стан низької спорідненості рецептора (див. Parsons et al., 1994).

Таблиця 14 а

Mrz 2/	Сполуки	Максимальний NMDA IC ₅₀ мкМ	Платовий NMDA IC ₅₀ мкМ	Максимальний AMPA і IC ₅₀ мкМ	Платовий AMPA IC ₅₀ мкМ
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	72,2	307,0
519	8-F-I	18,0	5,8		
516	8-F-II	6,3	1,6	17,6	>100
515	7,8-ДиCl-I	3,7	0,9		
518	7,8-ДиCl-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-Br,8-Cl-II	10,0	1,5		
554	8-0-CH ₃ -I	170	36,2		

Таблиця 14 б

Mrz 2/	Сполуки	Максимальний NMDA IC ₅₀ мкМ	Платовий NMDA IC ₅₀ мкМ
569	8-Cl-I (Хол.)	2,0	0,5
576	8-Cl-II (Хол.)	1,1	0,5
586	8-Br-I (Хол.)	2,2	0,6
570	8-Br-II (Хол.)	0,6	0,1
572	8-F-I (Хол.)	12,4	3,5
571	8-F-II (Хол.)	4,9	1,0
575	7-0-CH ₃ -I (Хол.)	94,0	14,5
578	7-0-CH ₃ -II (Хол.)	101	7,7

Екситотоксичність in vitro

Способи

Виділення кортикальних нейронів здійснюють аналогічно способу, описаному для реєстраторів у вигляді дужки з наклеєного пластиру, за тим виключенням, що використовують зародки пацюків на 17-19 дні розвитку плоду. Нейрони висівають на пластину з 24 комітками (Greiner), при щільності 300000 клітин/ комірок, покритий полі-D-лізином 0,025мг/мл. Клітини вирощують у Dulbecco's модифікованому основному середовищі (DMEM, GIBCO), доповненому 10% термічно інактивованою навколоплідною серозною рідиною теляти (Gibco). Культури витримують при 37°C і 5% CO₂. Середовище обновляють перший раз через один тиждень і потім кожні 3 дні, замінюючи половину середовища, свіжим середовищем. Для експериментів використовують культури, витримані 17 днів.

Взаємодію з EAA здійснюють у MEM-N2-середовищі (Bottenstein 1979), яке не містить сироватку, але містить 0,5мМ NMDA/1 мкМ гліцину і лікарський засіб, який досліджується. Перед додаванням NMDA, клітини попередньо інкубують із лікарськими засобами і 1мкМ гліцину протягом 15 хвилин. Через 24 години цитотоксичний ефект оцінюють морфологічно під фазово-контрастним мікроскопом і оцінюють кількісно біохімічно, міряючи витікання LDH.

Активність LDH визначають у супернатанті через 24 години за способом Wroblewski і La Due (1995). 0,1мл

супернатанту додають до 0,9мл натрійфосфатного буферу (pH=7,5), що містить піруват натрію (22,7мМ) і NADH (0,8мг/ 10мл) при кімнатній температурі. Перетворення пірувату в лактат реєструють при 340нм протягом 10 хвилин на спектрофотометрі Контрону.

Результати

Повні криві концентрація - відповідна реакція все ж таки не доступні. Однак, Mrz 2/501 і Mrz 2/502 при низьких концентраціях є ефективними нейрозахисними засобами *in vitro*, очевидно, що Mrz 2/502 є більш активним у цьому відношенні (див. таблицю 15).

Таблиця 15

Mrz 2/	Сполуки	Цитотоксичність <i>in vitro</i> IC ₅₀ мкМ
501	8-Cl-I	<5
502	8-Cl-II	«5
503	8-Br-I	>20

In vivo

Протиконвульсивна активність

Задача

Вивчення NMDA-рецепторних антагоністичних властивостей досліджених агентів шляхом оцінки протиконвульсивних дій. Додатково вивчають роль органічних кислотних транспортних засобів у видаленні з головного мозку досліджених агентів, шляхом застосування інгібітору, пробеніциду (Probenicid), тривалості протиконвульсивної дії.

Способи

Для NMDA-дослідження на летальність (Leander et al., 1988) використовують самців мишей альбіносів Swiss (19-21г), що містяться по 10-15 на клітку. Для конвульсій, що індукуються пентилентетразол (PTZ), використовують самців мишей альбіносів Swiss (25-34г), що містяться по 40 на клітку (58×38×20см), тоді як у дослідженнях на максимальний електрошок (MES) і дослідженнях на рухову недостатність використовують NMR самок мишей (18-28г), що містяться по 5 на клітку. Усіх тварин забезпечують водою і їжею *ad libitum* (на розсуд виконавця) при 12-годинному циклі день-ніч (день із 6 годин ранку) і при контрольованій температурі (20 ± 0,5°C). Всі експерименти виконують між 10 годинами ранку і 5 годинами дня. Досліджені сполуки упорскують внутрішньочеревинно (*i.p.*) за 15 хвилин до стимулювання конвульсій, якщо не обговорено окремо (див. нижче). Mrz 2/502 розчиняють у розчині солі, доповненому NaOH. Більшість інших агентів розчиняють у наступному розчині: 0,606г Тріс; 5,0г глюкози; 0,5г Твін 80 і 95мл води. Солі холіну і тетраметиламонію розчиняють у дистильованій воді.

У дослідженні на конвульсії, що індукуються NMDA, на мишах, спочатку одержують співвідношення доза - відповідна реакція, щоб визначити дозу ED₉₇ яку потім використовують для випробування антагоністичних властивостей. Після упорскування ED₉₇- дози NMDA, тварин помішують у маленьку клітку (20×28×14см) і спостерігають протягом 20 хвилин. Фармакологічною кінцевою точкою є загибель, якій передують клонічні конвульсії і тонічні припадки.

Пентилентетразол упорскують при дозі 90мг/кг (*i.p.*). Потім підраховують наявність загальних тонічних конвульсій протягом 30 хв., оскільки цей параметр більш чутливий до антагоністів NMDA-рецепторів, чим клонічні конвульсії. За фармакологічну кінцеву точку беруть наявність тону в задніх кінцівках при витягуванні.

MES (100Гц, 0,5 сек тривалість шоку, 50мА шоків інтенсивність, 0,9мс тривалість імпульсу, U_{qo} Basile) прикладають за допомогою корнеальних електродів. Підраховують наявність тонічних конвульсій (тонічне витягування задніх лап із мінімальним кутом до тіла 90°). У додатковому експерименті мишам упорскують пробеніцид (200мг/кг) за 30 хв. до введення досліджених агентів, щоб визначити роль органічного кислотного транспортного засобу в очищенні (тривалість дії). Мета полягає у одержанні значень ED₅₀ для всіх параметрів, оцінюваних використанням тесту Litchfield Wilcoxon (1949) для кількісної характеристики відповідної реакції на дозу.

Результати

З досліджених сполук, тільки чотири сполуки, усі класу II, ефективні при *i.p.* введенні в M.E.S.- дослідженні (Mrz 2/499, Mrz 2/502, Mrz 2/516 і Mrz 2/514, див. таблицю 16 а). Діючі спільно сполуки класу I - не активні. Очевидно, усі чотири сполуки мають дуже короткий напівперіод життя *in vivo*. Мабуть, PTZ- дослідження є більш чутливою моделлю дії гліцин-антагоністів, що вводяться *i.p.*, і, у дійсності, ті ж самі сполуки класу II активні при 2-4-кратному зниженні доз, тоді як сполуки класу I залишаються неактивними (таблиця 16 а).

Солі холіну саме цих похідних N-оксиду (структури II) мають яскраво виражену протиконвульсивну активність у всіх трьох моделях, тоді як їхні не-N-оксидні похідні або не активні, або мало активні (таблиця 16 б). Крім того, здається, що солі холіну мають більшу тривалість дії. Упорскування пробеніциду значно подовжує тривалість протиконвульсивного впливу усіх досліджуваних агентів. Наприклад, напівперіоди життя сполук 2/514 і 2/570 становлять біля 40 і 80 хвилин, відповідно, у відсутності пробеніциду. У присутності пробеніциду напівперіоди життя подовжуються до порядку 180 і 210 хвилин, відповідно. Отже, очевидно, що органічні кислотні транспортні засоби в хороїдальних нервових сплетеннях поза головним мозком грають важливу роль у короточасності дії досліджених сполук. Пробеніцид при використуванні дозі (200мг/кг) самий по собі не має незалежну дію на конвульсії, що індукуються MES.

Таблиця 16 а

Mrz 2/	Сполуки	MES <i>i.p.</i> (ID ₅₀ мг/кг)	NMDA <i>i.p.</i> (ID ₅₀ мг/кг)	PTZ <i>i.p.</i> (ID ₅₀ мг/кг)
--------	---------	--	---	--

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	>100,0	>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-ДиCl-I	>100,0	98,0	>100,0
518	7,8-ДиCl-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-О-CH ₃ -I	>100,0		

Таблиця 16 б

Mrz 2/	Сполуки	MES i.p. (ID ₅₀ мг/кг)
577	II(Хол.)	23,7
569	8-Cl-I(Хол.)	>50
576	8-Cl-II(Хол.)	7,7
586	8-Br-I(Хол.)	>50
570	8-Br-II(Хол.)	12,8
572	8-F-I(Хол.)	>100
571	8-F-II(Хол.)	15,5
574	7,8-ДиCl-I(Хол.)	>100
578	8-О-CH ₃ -II(Хол.)	>100
575	7-О-CH ₃ -I(Хол.)	>100

Мікроелектрофоретичне застосування ЕАА агоністів на спинозмозкові нейрони in vivo

Досліджують здатність цих гліцин_B-антагоністів діяти як NMDA-рецепторні антагоністи in vivo, використовуючи i.v (внутрішньовенне) введення, у порівнянні з відповідними реакціями окремих нейронів у спинному мозку пацюків на мікроелектрофоретичне нанесення AMPA і NMDA. Сполуки класу II Mrz 2/502 і Mrz 2/516 є сильними NMDA-рецепторними антагоністами in vivo при значеннях ID₅₀ 1,2 і 1,8мг/кг i.v, відповідно, тоді як вихідні сполуки класу I цілком не активні навіть при збільшенні цих значень до 16мг/кг i.v. Три-чотири-кратне перевищення доз також дає антагоністичні відповідні реакції на AMPA, хоча це свідчить про відсутність селективності в порівнянні з дослідженнями in vitro (таблиця 17 а).

Таблиця 17 а

Mrz 2/	Сполуки	Мікроелектрофоретичний NMDA (ID ₅₀ мг/кг i.v.)	Мікроелектрофоретичний AMPA (ID ₅₀ мг/кг 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

У цій моделі солі холіну мають приблизно рівну активність із вільними кислотами після i.v введення, але злегка більш селективні у відношенні NMDA у порівнянні з AMPA (таблиця 17 б). Знову, не-N-оксидні похідні (сполуки класу I) не активні.

Таблиця 17 б

Mrz 2/	Сполуки	Мікроелектрофоретичний NMDA (ID ₅₀ мг/кг i.v.)	Мікроелектрофоретичний AMPA (ID ₅₀ мг/кг i.v.)
577	II (Хол.)	34,0	>32,0
569	8-Cl-I (Хол.)	>16,0	>16,0
576	8-Cl-II (Хол.)	2,8	>16,0
586	8-Br-I (Хол.)	>16,0	>16,0
570	8-Br-II (Хол.)	4,5	>16,0
572	8-F-I (Хол.)	>16,0	>16,0
571	8-F-II (Хол.)	4,7	9,2

Обговорення

Чотири сполуки класу II, Mrz 2/499, Mrz 2/501 Mrz 2/514 і Mrz 2/516 є гліцин_B-антагоністами in vitro і мають значно більшу in vivo системну і/або CNS-прийнятність, чим зв'язані вихідні сполуки класу I (Mrz 2/585, Mrz 2/501, Mrz 2/503 і Mrz 2/519). Доступ до CNS є головною проблемою майже для всіх гліцин_B-антагоністів, отриманих до цього часу, але цей новий клас сполук переборює цю основну перешкоду і, отже, вони є терапевтично актуальними гліцин_B-антагоністами.

Адитивні солі

Використовуючи вищевикладені способи, одержують адитивні солі сполук 5, 6, 7, 8, 9 і 10 із четвертинними амінами (приміром, 4-тетраметиламонієм, 4-тетраетиламонієм), четвертинними аміноспиртами (приміром, холіном) або четвертинними амінокислотами (приміром, МДМ-триметилсерином). Солі холіну і 4-тетраметиламонію (4-NH₃) істотно поліпшують біоприйнятність і є кращими.

Фармацевтичні композиції

Сполуки за даним винаходом можуть бути перероблені у фармацевтичні композиції, що включають фармацевтично прийнятний носій або розріджувач додатково до активної сполуки за даним винаходом. Такі композиції можуть бути введені живій тварині, особливо живій людині, шляхом перорального або парентерального способу введення. Приміром, тверді препарати або фармацевтичні композиції для перорального введення можуть бути узяті у формі капсул, таблеток, пілюль, порошоків або гранул. У таких твердих фармацевтичних складах активна сполука або її проліки змішують, щонайменше, з одним фармацевтично прийнятним розріджувачем або носієм, таким, як очеретяний цукор, лактоза, крохмаль, тальк або синтетичні або натуральні смоли, речовиною, яка зв'язує, такою, як желатин, речовиною, що змазує, такою, як стеарат натрію і/або речовиною, що роз'єднує, такою, як бікарбонат натрію. Для забезпечення ефекту уповільненого вивільнення у фармацевтичну композицію може бути включена така сполука, як гідроколоїд або інший полімер. Додаткові речовини, такі, як речовини, що змазують, або буфери, можуть також бути додані загальноприйнятим способом. При бажанні, таблетки, пілюлі або гранули можуть бути покриті ентеросолюбильною оболонкою. Рідини для перорального застосування можуть бути у формі ліпосом, емульсій, розчинів або суспензій, що містять, звичайно, використовувані інертні розріджувачі, такі, як вода. До того ж, такі рідкі фармацевтичні композиції можуть також містити агенти, що змочують, що емульгують, що диспергують або, узагалі, поверхнево-активні агенти, так само як підсолоджувачі, віддушки або речовини, що надають пахощів.

Відповідними препаратами для парентерального застосування можуть бути, серед іншого, стерильні водяні й неводяні розчини, суспензії, ліпосоми або емульсії. У якості фармацевтично прийнятного розріджувача або носія можуть бути використані додаткові речовини, серед яких багато які уже відомі для цієї форми введення фармацевтичної композиції.

Залежна від передбаченого способу введення й тривалості лікування, точна доза активних сполук у препаратах за даним винаходом може бути змінена, головним чином, на розсуд лікаря або ветеринара. Активні агенти даного винаходу, безумовно, можуть бути об'єднані для введення з іншими фармакологічно активними агентами.

У композиціях за даним винаходом співвідношення активного агента або агентів у композиції можуть широко варіюватися, необхідним є тільки, щоб активний інгредієнт за даним винаходом, або його проліки, складали або забезпечували ефективну кількість, тобто таку кількість, при якій в обраній лікарській формі буде присутня відповідна ефективна доза. Очевидно, що декілька лікарських форм, так само як декілька індивідуальних активних сполук можна вводити одночасно або приблизно в той самий час, або навіть у тій же самій фармацевтичній композиції або в тому ж фармацевтичному складі.

Спосіб лікування

Як зазначено раніше, сполуки за даним винаходом придатні, особливо, у формі фармацевтичних композицій, для перорального, або парентерального введення, точні індивідуальні дози, так само як добові дози, у кожному конкретному випадку визначаються, звичайно, відповідно до добре встановлених медичних і/або ветеринарних принципів і відповідно до розпоряджень лікаря, що лікує, або ветеринара.

На додаток до перорального або парентерального введення, можна використовувати ректальне (прямокишкове) і/або внутрішньовенне введення, коли використовують парентеральне введення, то дози звичайно значно знижуються, хоча пероральне введення є кращим. Придатною є кількість приблизно від одного до трьох грамів на день у формі повторної або розділеної дози. Більш широкий інтервал, порядку 0,5 - 10 грамів на день, також може бути застосований у залежності від стану конкретного хворого. Хоча знайдено, що 500мг активної основи особливо придатні для застосування в таблетках, індивідуальні дозування можуть варіюватися приблизно від 200 до 1000мг, а 500мг, що рекомендуються для застосування в таблетках, можна, звичайно, вводити перорально, приміром, від одного до трьох разів у день. Саме собою зрозуміло, що в разовій дозі можна вводити більше, ніж одну таблетку, якщо потрібно досягти вищевказаних добових кількостей, що рекомендуються, для перорального введення від одного до трьох грамів у день.

Як уже сказано, сполука за винаходом або його пролікарська форма можуть бути введені живій тварині, включаючи живу людину, будь-яким із численних шляхів, приміром, перорально у виді капсул або таблеток, парентерально у формі стерильних розчинів або суспензій, або підшкірною або внутрішньом'язовою імплантацією шматочка тканини, а в деяких випадках внутрішньовенно у формі стерильних розчинів. Іншими очевидними способами введення є шкірний, підшкірний, транс-букальний, внутрішньом'язовий і внутрішньочеревинний, і конкретний спосіб введення, як, звичайно, вибирає лікар або ветеринар.

Таким чином, установлене, що даний винахід пропонує нові сполуки піридо-фтілазин-діону і фармацевтичні композиції, що містять їх, а також спосіб боротьби з неврологічними порушеннями, зв'язаними з ексцитотоксичністю і внаслідок цього з дисфункцією глутаматергічної нейротрансмісії, усе разом це дає довгоочікуване рішення проблеми, що раніше існувала, яка неадекватно розв'язувалась за попереднім рівнем техніки.

Варто розуміти, що даний винахід не обмежується сполуками, композиціями, способами або методиками, які строго відповідають зазначеним, оскільки численні модифікації і їхні зміни відразу ж стають очевидними для фахівця в тій області техніки, до якої цей винахід належить, тому даний винахід варто розглядати обмеженим тільки загальними рамками об'єму, що можуть бути встановлені на підставі прикладених пунктів.

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.

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

Leander JD, Lawson RR, Ornstein PL, Zimmernan 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, Grüner 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. Neurochem. 60, pp. 634-645.