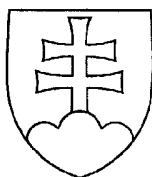


SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19)

SK



ÚRAD
PRIEMYSELNÉHO
VLASTNÍCTVA
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

281 017

- (21) Číslo prihlášky: **617-93**
(22) Dátum podania: **20.12.1991**
(31) Číslo prioritnej prihlášky: **P 40 41482.5**
(32) Dátum priority: **22.12.1990**
(33) Krajina priority: **DE**
(40) Dátum zverejnenia: **12.01.1994**
(45) Dátum zverejnenia udelenia
vo Vestníku: **09.10.2000**
(86) Číslo PCT: **PCT/EP91/02470, 20.12.1991**

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl⁷:

C 07D 217/18

A 61K 31/47

(73) Majiteľ patentu: Boehringer Ingelheim KG, Ingelheim am Rhein, DE;

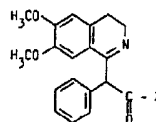
(72) Pôvodca vynálezu: Lösel Walter, Gau-Algesheim, DE;
Roos Otto, Schabenheim, DE;
Arndts Dietrich, Appenheim, DE;
Kuhn Franz Josef, Gau-Algesheim, DE;
Streller Ilse, Stromberg, DE;

(74) Zástupca: Majlingová Marta, Ing., Bratislava, SK;

(54) Názov vynálezu: **3,4-Dihydroizochinolinové deriváty, spôsob ich výroby, farmaceutický prostriedok s ich obsahom a ich použitie**

(57) Anotácia:

Sú opísané dihydropyridínové deriváty všeobecného vzorca (I), ktoré sa používajú na zlepšenie prekrvenia tkaniva a jeho zásobenie kyslíkom, na liečenie chronických zápalových ochorení, na zabránenie zrážania krvi a na ochranu centrálného nervového systému vo forme farmaceutického prostriedku. Ďalej je opísaný spôsob výroby uvedených derivátov a ich použitie na výrobu farmaceutických prostriedkov.



(I)

Oblasť techniky

Vynález sa týka 3,4-dihydrochinolínových derivátov s kondenzovanými kruhmi, ktoré sú vhodné na ochranu mozgových buniek, na liečenie chronických zápalových ochorení a na zabránenie zrážania krvi.

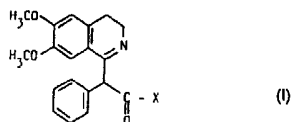
Doterajší stav techniky

Z EP-A 37 934 sú známe rôzne dihydroizochinolínové deriváty. Uvedené zlúčeniny majú kardiotonický účinok a majú tiež zložku zvyšujúcu kontraktilitu svalov a pôsobia na krvný tlak. Tieto látky sa môžu použiť na zlepšenie prekrvenia tkanív a ich zásobenie kyslíkom. Tieto možnosti použitia sú založené na účinku týchto látok na cievy. V EP-A 251 194 sa opisuje, že heterocyklické anelované dihydropyridínové deriváty majú kardioprotektívny účinok, pričom ide o celkom nový typ látok antagonistujúcich účinky vápnika.

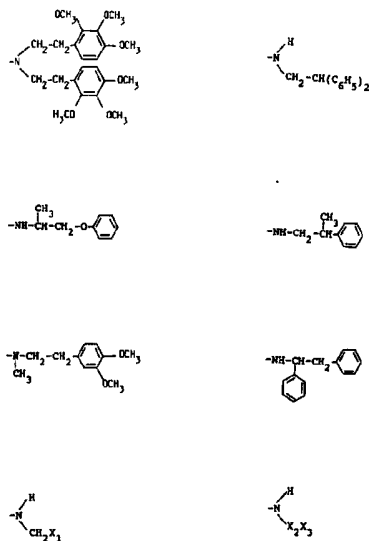
Podstata vynálezu

Tento vynález sa vzťahuje na nové 3,4-dihydroizochinolínové deriváty s kondenzovanými kruhmi, ktoré sa môžu použiť na ochranu mozgového tkaniva, najmä na liečenie chorých po mozgovej mŕtvici alebo pri pacientoch, ktorí sú v nebezpečí, že by k nej mohlo dôjsť. Tieto zlúčeniny možno použiť na liečenie chronických zápalových ochorení, ako je bronchiálna astma a na inhibíciu zrážania krvi, najmä inhibíciu zhlukovania krvných doštičiek.

Podstatu vynálezu tvorí skupina 3,4-dihydroizochinolínových derivátov všeobecného vzorca (I)



vrátane ich tautomérnych, diastereomérnych, enantiomérnych a racemických foriem, kde X znamená niektorú zo skupín



kde

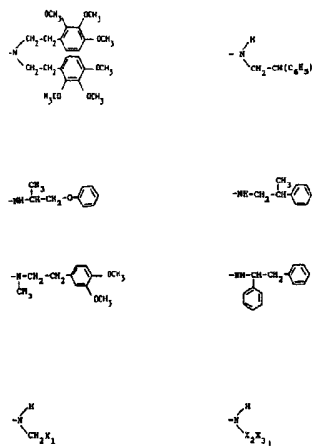
X¹ znamená fenyl, mono- alebo disubstituovaný trifluórmetylou skupinou alebo etoxyskupinou, fenyl, alebo 2-metoxifenyl, substituovaný metoxyskupinou a atómom fluóru;

X² znamená skupinu -CH₂-CH₂- alebo -CH₂-CH(CH₃)-; a

X³ znamená 2,3,4-trimetoxifenyl, 2,3-dimetoxifenyl, 2,6-dimetoxifenyl alebo 3,6-dimetoxifenyl, tienyl, fenyl mono- alebo disubstituovaný trifluórmetylou skupinou alebo etoxyskupinou alebo fenyl substituovaný metoxyskupinou a atómom fluóru,

a adičné soli týchto zlúčenín s kyselinami.

Výhodné sú najmä zlúčeniny všeobecného vzorca (I), v ktorých X znamená niektorú zo skupín:



kde

X¹ znamená 2-metoxifenyl, prípadne substituovaný ešte atómom fluóru;

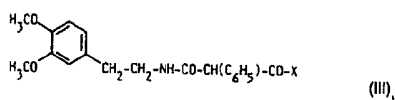
X² znamená skupinu -CH₂-CH₂-; a

X³ znamená 2,3,4-trimetoxifenyl, 2,3-dimetoxifenyl, 2,6-dimetoxifenyl, 3,6-dimetoxifenyl, 2- alebo 3-tienyl, fenyl, prípadne substituovaný trifluórmetylou skupinou alebo etoxyskupinou alebo fenyl, substituovaný metoxyskupinou a atómom fluóru.

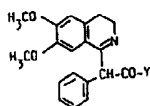
Zlúčeniny všeobecného vzorca (I) podľa tohto vynálezu sú bazy a možno ich previesť známym spôsobom s použitím anorganických alebo organických kyselín alebo solí alebo komplexotvorných činidiel na požadované fyziologicky prijateľné adičné produkty, ako sú napríklad soli.

Kyselinami vhodnými na použitie na tvorbu týchto solí sú napríklad kyselina chlorovodíková, bromovodíková, jodovodíková, fluorovodíková, ďalej kyseliny sírová, fosforečná, dusičná, octová, propionová, maslová, kapronová, valérová, šťavelová, malonová, jantárová, maleínová, fumarová, mliečna, vínna, citrónová, jablčná, benzoová, p-hydroxybenzoová, fíalová, škoricová, salicylová, askorbová, metánsulfónová a podobne.

Zlúčenina podľa vynálezu môže byť pripravená nasledujúcimi spôsobmi, ktoré predstavujú ďalšiu podstatu vynálezu. Spôsob výroby 3,4-dihydroizochinolínových derivátov všeobecného vzorca (I) spočíva v tom, že sa a) cyklizuje diamid kyseliny fenylnalónovej všeobecného vzorca (III)



kde X má význam uvedený vo všeobecnom vzorci (I), za prítomnosti kondenzačného činidla alebo b) reakciou aminu všeobecného vzorca (VI) s karboxylovou kyselinou všeobecného vzorca (IV)



(IV)

+ XH

(VI)

alebo halogenidu tejto kyseliny,

kde Y znamená skupinu OH alebo atóm halogénu,

kde X má význam uvedený vo všeobecnom vzorci (I), za prítomnosti kondenzačného činidla, následne sa takto získaná zlúčenina prípadne prevedie na svoju soľ prijateľnú z farmaceutického hľadiska.

Ako kondenzačný prostriedok pri vykonávaní postupu a) sú vhodné viaceré Lewisove kyseliny, ako oxychlorid fosforečný, fluorid boritý, chlorid cínčitý alebo chlorid titaničitý, ale tiež silné anorganické kyseliny, napríklad kyselina sírová, fluorosulfónová, fluorovodíková alebo polyfosforečná, tieto kyseliny sa výhodne používajú v prebytku. Výhodným kondenzačným prostriedkom je oxychlorid fosforečný.

Cyklizačnú reakciu je možné vykonávať v prítomnosti alebo v neprítomnosti rozpúšťadiel. Vhodné sú všetky inertné rozpúšťadlá, pokiaľ majú dostatočnú rozpustnosť pre reakčné zložky a dostatočne vysokú teplotu varu. Príkladom vhodných rozpúšťadiel môžu byť benzén, alkylbenzénové deriváty, chlórbenzén, dekalín, chloroform, metylénchlorid, acetonitril a podobne. Variantom tohto postupu môže byť uskutočnenie, v ktorom je kondenzačný prostriedok, napríklad oxychlorid fosforečný, súčasne tiež reakčným rozpúšťadlom.

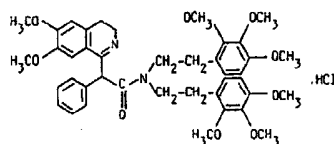
Pokiaľ ide o reakčnú teplotu, neexistujú žiadne zvláštne obmedzenia. Reakcie je možné uskutočňovať vo veľmi širokom teplotnom rozmedzí, výhodne za zahrievania až na teplotu varu reakčného rozpúšťadla.

Amidačná reakcia b) môže byť teoreticky uskutočňovaná za tých istých podmienok ako reakcia a). Ako kondenzačný prostriedok je možné príkladne navyše uviesť karbodiimidy, napríklad cyklohexylkarbodiimid alebo karbonyldiimidazol.

Ako už bolo uvedené, zlúčeniny podľa vzorca (I) podľa vynálezu sú účinné ako ochrana mozgového tkaniva. Zlúčeniny sú účinné pri liečení degeneratívnych a nekrotických ochorení mozgového tkaniva. Uvedené látky možno použiť tiež na prevenciu týchto ochorení u pacientov, pri ktorých je vysoká pravdepodobnosť výskytu týchto chorôb. Ako bude ďalej doložené na základe pokusov, nespôčíva účinok uvedených látok len v zlepšenom prekrvení tkaniva. Uvedené látky sú vhodné tiež na liečenie epilepsie a Alzheimerovej choroby a najmä na liečenie pacientov, u ktorých došlo k mozgovej mŕtvici alebo je nebezpečie, že k nej dôjde. Navyše sú zlúčeniny podľa vynálezu vhodné na liečenie chronických zápalových procesov a na inhibíciu zrážania krvi.

3,4-Dihydroizochinolinové deriváty všeobecného vzorca (I), ako aj soli týchto zlúčenín s kyselinami, prijateľnými z fyziologického hľadiska na výrobu liečiva na ochranu mozgového tkaniva, na liečenie zápalových chronických ochorení a zabránenie zrážaniu krvi.

V nasledujúcich testoch bude doložená prekvapujúca účinnosť týchto zlúčenín. Testy boli robené najmä so zlúčeninou A nasledujúceho vzorca



ako typickým predstaviteľom zlúčenín všeobecného vzorca (I).

Tolerancia ischémie u gerbila bola overená spôsobom podľa publikácií Suzuki R. a ďalší, Acta Neuropath (Berl.) 1983, 60:207-216 a 217-222, Yoskidomi M. a ďalší, J. Neurochem. 1989, 53:1589-1594.

Ischémia bola vytvorená uzavretím arteria carotis na 10 minút v éterovej narkóze. Zlúčenina A bola podávaná podkožne v dávke 1 a 10 mg/kg celkom štyrikrát v nasledujúcich 24 hodinách, prvýkrát bola podaná 2 hodiny po opätovnom otvorení tepny.

72 hodín po uzavretí tepny boli zvieratá usmrtené a ich mozgové tkanivo bolo podrobené histologickému vyšetreniu. Na sledovanie ischemického poškodenia a prípadne zníženie tohto poškodenia bolo zvolené tkanivo v oblasti CA¹ hipokampu v presne určenom výreze histologického preparátu. Sledovalo sa poškodenie buniek tejto časti mozgu. Vyšetrenie bolo overené vždy na skupine piatich zvierat.

V skupine, v ktorej nebola pokusným zvieratám podaná žiadna skúmaná látka, došlo u všetkých zvierat k výraznému poškodeniu buniek v sledovanej oblasti CA¹. Na rozdiel od tohto pozorovania bolo možné pozorovať pri podaní zlúčeniny A výrazný ochranný účinok proti poškodeniu z nedostatočného zásobenia kyslíkom, pričom tento účinok bol závislý od veľkosti dávky. Po podaní dávky 1mg/kg zlúčeniny A bolo možné pozorovať poškodenie sledovanej oblasti CA¹ len pri dvoch z piatich zvierat. Po podaní dávky 10 mg/kg zlúčeniny A nespôziorovalo sa poškodenie mozgového tkaniva žiadneho z piatich zvierat.

Z týchto výsledkov je možné uzavrieť, že zlúčeniny všeobecného vzorca (I) je možné použiť na liečenie neurologických poškodení, napríklad takých, ktoré môžu vzniknúť na základe mozgovej mŕtvice.

Výsledky týchto pokusov tiež dokladajú, že zlúčeniny sa dostávajú do mozgového tkaniva cez krvné zásobovanie, čo je podstatnou výhodou zlúčenín podľa vynálezu.

Nasledujúce testy na izolovaných bunkových kultúrach rovnako dokladajú účinky skúmaných zlúčenín. Ďalej je možné z výsledkov týchto pokusov, rovnako ako z výsledkov uvedených pokusov na gerbiloch uzavrieť, že zlúčeniny všeobecného vzorca (I) je možné použiť na liečenie uvedených chorobných stavov.

Na izolovaných bunkových kultúrach, napríklad na kultúrach neutrofilných granulocytov, na bunkách HL 60, kultúrach trombocytov a podobne, bolo možné doložiť, že zlúčenina A môže v závislosti od dávky pôsobiť inhibíciu "preťaženia vápnikom" a uhytnie buniek, vyvolané najrôznejšími látkami, napríklad PAF, leukotrienmi, endotelinom, FMLP alebo izoprenalinom. IC₅₀ je 1 mikromól.

Merané boli koncentrácie IC₅₀, to znamená koncentrácie skúmanej látky, ktoré môžu spôsobiť 50 % inhibíciu transportu vápnika, vyvolanú pôsobením 1nM FMLP na bunkách HL60 po zaťažení FLUO₃. Výsledky týchto pokusov sú uvedené v nasledujúcej tabuľke:

zlúčenina č. IC₅₀ (priemerne 10⁶ buniek v suspenzii)

zlúčenina A	5,4.10 ⁻⁶ M
-------------	------------------------

Uvedené metódy na vykonávanie opísaných skúšok sú zverejnené v publikáciách W. K. Pollock, T. J. Rink, R. F. Irvine, *Biochem. J.* 235:869-877 (1986) a J. E. Merritt, R. Jacob, T. J. Hallam, *J. of Biol. Chem.* 264:1522-1527, (1989).

Na jednotlivých bunkách HL60 bol sledovaný pomocou špecifických svoriek elektrofyziológickým spôsobom priechod membránou, a to "neselektívnymi kationovými kanálmi" po stimulácii ATP. Tento prítok bolo možné zastaviť použitím zlúčeniny A, hodnota IC_{50} bola 7 nM.

Tieto výsledky dokladajú priame pôsobenie uvedených zlúčenín na izolované bunky. U živých organizmov dochádza pri nasledujúcich pokusoch k prieniku granulocytov, najmä leukocytov po poškodení mozgového tkaniva, napríklad po mozgovej mŕtviaci do poškodenej oblasti, kde sú potom aktivované pochody, na ktorých sa zúčastňuje vápnik, rozkladajú sa a tým dochádza k uvoľneniu mediátorov, ktoré ďalej poškodzujú tieto tkanivá, ako sú PAF, leukotrieny, prostaglandíny, FMLP a podobne. Chemotakticky priťahované leukocyty týmto spôsobom zväčšujú poškodenú oblasť na základe opísaných pokusov je možné predpokladať, že tento bludný kruh, pôsobiaci stále väčšie poškodenie, je možné prerušiť podaním opísaných účinných látok. Po ich podaní zostáva neurologické poškodenie ohraničené na pôvodný rozsah.

Je možné doložiť, že klasické látky antagonizujúce pôsobenie vápnika, ako sú Verapamil, Nifedipin alebo Diltiazem nespôsobujú inhibíciu aktivácie leukocytov.

Ďalšie pokusy, ktoré boli so zlúčeninou A vykonávané ďalej podporujú uvedené výsledky.

Na izolovaných nervových bunkách mozgovej kôry a hipokampu fetálnych potkanov bolo sledované priame pôsobenie zlúčeniny A spôsobom podľa publikácií H. W. Müller a W. Seifert, *Proc. NATL. Acad. Sci., USA*, 81:1248-1252, 1984, J. Neurosci. Res. 8:195-204, 1982 a Müller a Seifert, *Methods for Serum Free Culture of Neuronal and Lymphoid Cells*, str.67 až 77, A. R. Liss Inc., 150 Fifth Ave., New York, N.Y. 10011, 1984. Na jednotlivých bunkách po zaťažení FURA-2 boli registrované krivky koncentrácie v závislosti od času pre koncentráciu vápenatých iónov v cytoplazme spôsobom podľa publikácie J. A. Connor, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 83:6179 až 6183, 1986. Tak po mechanickom poškodení, ako aj po podaní excitačných aminokyselín, napríklad E.A.A., glutamátu, kainátu, quisqualátu a NMDA bolo možné pozorovať silný vzostup koncentrácie vápnika v cytoplazme, tomuto vzostupu sa dalo vo všetkých prípadoch zabrániť podaním zlúčeniny A, veľkosť inhibície bola závislá od veľkosti dávky, IC_{50} je približne 3 mikromóly.

Mechanizmus účinku tejto inhibície bol sledovaný tak na bunkových kultúrach nervových buniek, ako na neutrofilných granulocytoch, v bunkách HL-60 a trombocytoch človeka. Je možné doložiť, že podaním zlúčeniny A možno zabrzdiť priechod vápnika membránou do buniek, ktorý bol stimulovaný agonistami receptorov, napríklad pôsobením EAA, FMLP, leukotrienu, PAF, endotheinu a podobne. Tento vplyv, ktorý sa podľa publikácie T. J. Hallam a T.J. Rink, *Tips* 10:8-10, 1989, uvádza ako prienik vápenatých iónov, sprostredkovaný receptorom (RMCE) nie je možné zabrzdiť podaním klasických antagonistov vápnika. Klasické látky antagonizujúce vápnik nemôžu zabrániť aktivácii leukocytov a trombocytov vzhľadom na to, že v týchto bunkách sa nenachádzajú žiadne kanály na prienik vápenatých iónov, závislé od napätia. Blokádu transmembránového prieniku vápnika bolo možné doložiť elektrofyziológicky pri použití špeciálnych svoriek, a to na bunkách HL-60 i na nervových bunkách.

Zabránenie zrážania krvi alebo zhlukovania krvných doštičiek je možné dokázať na základe štandardných pokusov. Na ľudských krvných doštičkách po zaťažení QUIN 2 a stimulácii pôsobením ADP, vazopressinu, $PGF_{2\alpha}$, trombinu alebo serotoninu je možné doložiť, že prienik vápnika do buniek, ktorý vedie ku zhlukovaniu krvných doštičiek, je možné inhibovať zlúčeninou A v množstve 3 mikromóly.

V uvedenom európskom patentovom spise č. EP-A-251 194 sa uvádza, že pri pokusoch in vitro na hladkom svalci a to na prúžkoch aorty podľa publikácie C. van Breemen, P. Aarensen, R.Lautzenheiser, J. Meisneri, *Chest* 78:157S-165S (1980) a R. Casteels a G. Droogman, *J. Physiol.* 317: 263-297(1981) je možné doložiť, že zlúčeniny všeobecného vzorca (I) sú antagonistami vápnika s celkom novým mechanizmom účinku. Na objasnenie tohto zistenia sa uvádza, že uvedené látky majú účinok na srdcový a cievny systém. Nie je uvedené nič bližšie, že by tieto látky mohli mať protizápalový účinok alebo účinok na nervové bunky.

Do podstaty tohto vynálezu patria aj farmaceutické prostriedky, ktoré obsahujú ako svoju účinnú zložku dihydropyridinový derivát podľa tohto vynálezu a ktoré sa prejavujú neuroprotektívnym účinkom na centrálny nervový systém, na liečenie chronických zápalových ochorení a na zabránenie zrážania krvi.

Zlúčeniny vo forme farmaceutických prostriedkov je možné podávať perorálne, parenterálne alebo miestne. Vhodnými liekovými formami sú napríklad tablety, kapsuly, čapíky, roztoky, sirupy, emulzie, aerosóly alebo dispergovateľné prášky. Tablety je možné získať napríklad tak, že sa účinná látka alebo zmes účinných látok zmieša so známymi pomocnými látkami, napríklad inertnými riedidlami, ako je uhličitan vápenatý, fosforečnan vápenatý alebo mliečny cukor, plnivami, ako je kukuričný škrob alebo kyselina alginová, spojivami, ako sú škrob alebo želatína, klznými látkami, ako sú stearan horečnatý alebo mastenec a/alebo prostriedky na dosiahnutie depotného účinku, ako sú karboxypolymetylén, karboxymetylcelulóza, acetát-ftalát celulózy alebo polyvinylacetát. Tablety môžu byť tvorené tiež väčším počtom vrstiev.

Zodpovedajúcim spôsobom je možné pripraviť aj dražé, ktoré je možné získať povliekaním jadier, pripravených rovnakým spôsobom ako tablety. Ako povlak sa použije napríklad kolidón alebo šelak, arabská guma, mastenec, oxid titaničitý alebo cukor. Na dosiahnutie depotného účinku alebo na zabránenie inkompatibility môže byť jadro tvorené väčším počtom vrstiev. Aj povlak môže byť na dosiahnutie depotného účinku tvorený väčším počtom vrstiev, pričom je možné použiť rovnaké pomocné látky, ktoré boli uvedené pri výrobe tabliet.

Sirupy s obsahom účinných látok podľa vynálezu alebo ich zmesí obvykle obsahujú ešte sladidlo, ako sacharín, cyklamát, glycerol alebo cukor, látky upravujúce chuť napríklad aromatické látky, ako vanilín alebo pomarančový extrakt. Ďalej môžu sirupy obsahovať látky, napomáhajúce vzniku suspenzie alebo zahusťujúce látky, ako sú sodná soľ karboxymetylcelulózy, zmáčadlá, napríklad kondenzačné produkty alifatických alkoholov s etylénoxidom alebo konzervačné látky ako p-hydroxybenzoát.

Injekčné roztoky sa pripravujú obvyklým spôsobom, napríklad pridaním konzervačného činidla ako p-hydroxybenzoátu alebo stabilizátora ako alkalických solí kyseliny etyléndiamínotetraoctovej a potom sa plní do nádobiek alebo do ampúl.

Kapsuly s obsahom jednej alebo väčšieho počtu účinných látok je možné získať tak, že sa účinná látka zmieša s

inertným nosičom, napríklad mliečnym cukrom alebo sorbitom, potom sa plní do želatínových kapslí.

Čapíky je možné získať miesením účinnej látky s príslušným nosičom, ako je neutrálny tuk alebo polyetylén-glykol alebo ich deriváty.

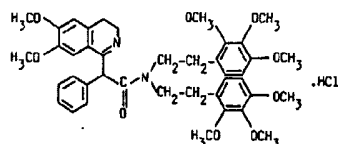
Zlúčeniny podľa vynálezu je možné podávať enterálne, parenterálne alebo miestne, výhodne v dávke 0,05 až 500 mg v jednotlivej dávke pre dospelého. Pri perorálnom podaní je výhodná dávka 0,1 až 500 mg, pri vnútrožilovom podaní 0,05 až 150 mg pre jednotlivú dávku.

Ďalej budú uvedené príklady zloženia niektorých liekových foriem.

Príklady uskutočnenia vynálezu

Príklad 1

Hydrochlorid 3,4-dihydro-1-benzyl-6,7-dimetoxy- α [(di-2-(2,3,4-trimetoxyfenyl)etyl] aminokarbonyl izochinolinu vzorca:



a) N,N-di-[2-(2,3,4-trimetoxyfenyl)etyl]amid kyseliny 2-(3,4-dimetoxyfenyl) etylaminokarbonylfenylacetovej

K roztoku 18,0 g, 52,4 mmol 2-(3,4-dimetoxyfenyl)etylaminu monoetylésteru kyseliny fenylmalónovej v 150 ml bezvodého dimetylformamidu sa pri teplote miestnosti po častiach pridá 9,0 g, 55,5 mmol N,N'-karbonyldiimidazolu. Po 30 minútach sa pridá ešte 18,0 g, 44,3 mmol di-2-(2,3,4-trimetoxyfenyl)etylaminu a zmes sa ešte 30 minút mieša. Potom sa rozpúšťadlo oddestiluje vo vákuu, zvyšok sa rozpustí v 1,5 litroch metyléndichloridu a potom sa roztok pretrepe vždy 2 x 250 ml vody a 2 x 200 ml 1N kyseliny chlorovodíkovej. Organická fáza sa vysuší síranom sodným a odparí a odparok sa čistí na stĺpci silikagélu pri použití zmesi metylénchloridu a metanolu v pomere 100 : 2 ako elučného činidla a potom sa produkt nechá kryštalizovať zo zmesi etylacetátu a éteru. Výťažok je 35,5 g produktu.



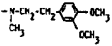

b) 35,0 g, 47,5 mmol amidu zo stupňa a) a 15 ml, 164 mmol oxychloridu fosforečného sa zahrieva 30 minút na teplotu varu v 150 ml bezvodého acetonitrilu. Po ukončení reakcie, ktorá sa sleduje pomocou chromatografie na tenkej vrstve sa rozpúšťadlo spolu s nepotrebovaným oxychloridom fosforečným oddestiluje vo vákuu. Odparok sa zmieša so zmesou vody a ľadovej drviny, zmes sa alkalizuje roztokom uhličitanu sodného a extrahuje približne 1 litrom metyléndichloridu. Organická fáza sa premyje vodou, vysuší síranom sodným a odparí. Odparok sa dvakrát čistí na stĺpci silikagélu, ako prvé elučné činidlo sa použije zmes metylénchloridu a metanolu v pomere 100 : 2 až 100 : 4, ako druhé elučné činidlo sa použije zmes metyléndichloridu a etylacetátu 1 : 1.

6,5 g čisteného produktu sa rozpustí v 50 ml etanolu a pridá sa alkoholový roztok kyseliny chlorovodíkovej, čím vznikne hydrochlorid. Po odparení a vysušení vo vysokom vákuu pri teplote 50 °C sa získa 11,5 g požadovaného produktu vo forme amorfnej pevnej látky s teplotou topenia 56 až 64 °C.

Analogickým spôsobom ako v uvedenom príklade je možné získať ostatné zlúčeniny podľa vzorca (I), ako aj tie z nasledujúcej tabuľky 1.

Tabuľka 1
Štruktúrny typ

Zlúčenina	X	Štruktúra	tepl. top.(°C)
A		I	56-64
B		I	176-194
C		I	166-169
D		II	102-104
E		I	187
F		I	94-96
G		II	139-142
H		II	133-135
J		II	143-145
K		II	94-98
L		II	116-120
M		II	112-114

Zlúčenina	X	Štruktúra	lep. top. (°C)
N		I	95-99
O		I	114-116
P		I	66-73
Q		II	205-209

Príklad 2

Výsledky testu aktivity cerebroprotektívneho účinku

Inhibícia kainátom stimulovaného Ca^{2+} preťaženia kultúr primárnych nervových buniek zaťažených Fura-2.

Kultúry adhezívnych nervových buniek boli pripravené z hipokampu fetálnych potkanov a boli kultivované v astrocyty obsahujúcom médiu (ACM), ako je opísané MÜLLER-om a SEIFERT-om (J. Neurosci. Res. 8: 195-204, 1982) a STICHEL-om a MÜLLER-om (Dev. Brain Res. 68: 149-162, 1992). Cytosólová Ca^{2+} koncentrácia v jednom adherentnom neuróne bola registrovaná podľa metódy opísanej KUDO-om a OGURA-om (Br. J. Pharmacol. 89: 191-198, 1986).

S týmto cieľom bol použitý mikroskop AXIOVERT 35 (Zeiss) hodiaci sa ku videokamere (HAMAMATSU) a kombinovaný so zosilňovačom a systémom DVS 3000 (HAMAMATSU) na digitalizáciu intenzít fluorescence viazaného Ca^{2+} a voľného FURA-2 pri dĺžke excitovaných vln od 340 do 380 nm (dĺžka vln emisie bola 510 nm). Procesor HP-vecra, regulujúci zmenu dĺžok excitovaných vln pomocou kolesového filtra a kontrolujúci otváranie záklapky, vypočítava ihneď stupeň fluorescence na každý pixel celého zorného poľa (500000 na každý obrázok).

Päť až deväťdňové kultúry nervových buniek boli zaťažené s FURA-2 (pozri KUDO a OGURA), premyté modifikovaným RINGER-ovým médiom (obsahujúcim 138 mM NaCl, 6mM KCl, 1 mM $MgSO_4$, 1,1 mM $CaCl_2$, 0,1 mM EGTA, 1 mM NaH_2PO_4 , 5 mM $NaHCO_3$, 5,5 mM glukózy a 20 mM HEPES, a boli stimulované 80 sekúnd s 30 μM kainátu. Každých 20 sekúnd registrovaný cytosólový Ca^{2+} bol indikovaný stupňom fluorescence (emisía - 510 nm, excitácia - 340/380 nm) opísané GRYNKIEWICZ-om et al. (J. Biol. Chem. 260: 3440-3450, 1985). Táto stimulácia mohla byť opakovaná viac ako šesťkrát bez zmeny účinku. Preto bolo možné vyskúšať kontrolné experimenty (t. j. stimulácia kainátu) a výskum testovaných zlúčenín (t. j. stimulácia kainátu za prítomnosti inhibičného činidla) na tých istých bunkách. Inhibičné účinky boli vyhodnotené, ako je uvedené. Ukazovatele (proporčné koncentráciám cytosólovému Ca^{2+}) kontinuálne sledované každých 20 sekúnd počas celého experimentu boli zaznamenávané v závislosti od času. V priebehu fáz stimulácie boli plochy pod krivkou ukazovateľ/čas (AUC-hodnoty) kvantifikované. Percentuálna účinnosť inhibície (% I) ktorejkoľvek testovacej zlúčeniny bola kvantifikovaná pomocou všeobecného vzorca:

$$\%I = 100 - \frac{AUC_{Stim+TC}}{AUC_{Stim}} \times 100$$

$AUC_{Stim+TC}$ = AUC v dôsledku stimulácie s 30 μM kainátu za prítomnosti testovanej zlúčeniny (TC)

AUC_{Stim} = AUC v dôsledku kontrolnej stimulácie s 30 μM kainátu za absencie TC

%I = percentuálna inhibícia zapríčinená 10 μM TC

AUC: plocha pod krivkou

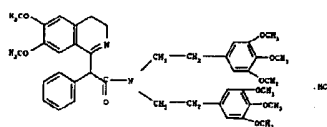
IC_{50} hodnoty boli graficky vymedzené zobrazením hodnôt %I testovaných zlúčenín oproti príslušným koncentráciám.

Zlúčenina IC_{50}

A	$6,58 \cdot 10^{-7}$
C	$3,4 \cdot 10^{-7}$
Q	$7,44 \cdot 10^{-7}$
P	$7,79 \cdot 10^{-7}$
O	$4,94 \cdot 10^{-7}$
N	$6,13 \cdot 10^{-7}$
L	$4,84 \cdot 10^{-7}$
K	$6,63 \cdot 10^{-7}$
J	$8,99 \cdot 10^{-7}$
H	$7,69 \cdot 10^{-7}$

porovnávacía zlúčenina $1,02 \cdot 10^{-5}$

porovnávacía zlúčenina:



Excitačný kainát aminokyseliny bol vpravený do nervových buniek kultúry kvôli simulácii excitačných toxických procesov, ktoré hrajú kľúčovú úlohu v patofyziológii mozgových infarktov (mŕtvica).

Príklady na liekové formy

Príklad 1

Tablety:

účinná látka (zlúčenina podľa vynálezu)	40,0 mg
mliečny cukor	100,0 mg
kukurický škrob	50,0 mg
koloidný oxid kremičitý	2,0 mg
stearan horečnatý	3,0 mg
celkom	200,0 mg

Výroba:

Účinná látka sa zmieša s časťou pomocných látok a granulje roztokom rozpustného škrobu vo vode. Po vysušení granulátu sa pridá zvyšok pomocných látok a zmes sa lisuje na tablety.

Príklad 2

Dražé:

účinná látka	20,0 mg
mliečny cukor	100,0 mg
kukurický škrob	65,0 mg
koloidný oxid kremičitý	2,0 mg
rozpustný škrob	5,0 mg
stearan horečnatý	3,0 mg
spolu	195,0 mg

Výroba:

Účinná látka a pomocné látky sa spôsobom opísaným v príklade 1 lisujú na jadrá dražé, ktoré sa povliekajú cukrom, mastencom a arabskou gumou bežným spôsobom.

Príklad 3

Čapíky

účinná látka	50,0 mg
mliečny cukor	250,0 mg
základná hmota na výrobu čapíkov do	1,7 g

Výroba:

Účinná látka a mliečny cukor sa zmiesia a zmes sa uvedie do suspenzie v roztavenej základnej hmote na výrobu čapíkov až do vzniku homogénnej suspenzie, ktorá sa potom vleje do predchladených foriem na čapíky s hmotnosťou 1,7 g.

Príklad 4

Ampuly

účinná látka	20,0 mg
chlorid sodný	5,0 mg
Bi-destilovaná voda	do 2,0 ml

Výroba:

Účinná látka a chlorid sodný sa rozpustí v bidestilovanej vode a roztok sa za sterilných podmienok plní do ampúl.

Príklad 5

Ampuly:

účinná látka	10,0 mg
chlorid sodný	7,0 mg
bi-destilovaná voda do	1,0 ml

Výroba:

Ampuly tohto zloženia je možné získať obdobným spôsobom ako ampuly z príkladu 4.

Príklad 6

Kvapky

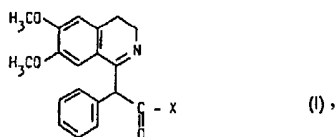
účinná látka	0,70 g
metylester kyseliny p-hydroxybenzoovej	0,07 g
propylester kyseliny p-hydroxybenzoovej	0,03 g
de-mineralizovaná voda	do 100,00 ml

Výroba:

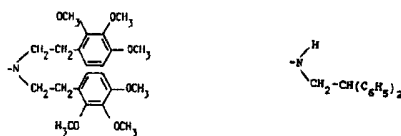
Účinná látka a konzervačné prostriedky sa rozpustia v demineralizovanej vode, roztok sa prefiltruje a plní do fľaštičiek s objemom 100 ml.

PATENTOVÉ NÁROKY

1. 3,4-Dihydroizochinolinové deriváty všeobecného vzorca (I)



kde X znamená niektorú zo skupín



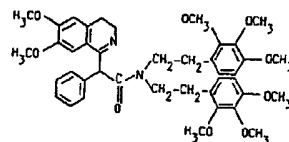
kde

X¹ znamená fenyl, mono- alebo disubstituovaný trifluórmetylou skupinou alebo etoxyskupinou, fenyl, substituovaný metoxyskupinou a atómom fluóru alebo 2-metoxifenyl,

X² znamená skupinu -CH₂-CH₂- alebo -CH₂-CH(CH₃)- a X³ znamená 2,3,4-trimetoxyfenyl, 2,3-dimetoxyfenyl, 2,6-dimetoxyfenyl, 3,6-dimetoxyfenyl, tienyl, fenyl, mono- alebo disubstituovaný trifluórmetylou skupinou alebo etoxyskupinou alebo fenyl, substituovaný metoxyskupinou a atómom fluóru,

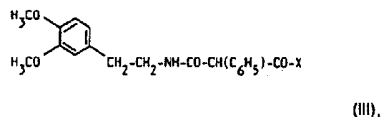
ako aj soli týchto zlúčenín s kyselinami prijateľnými z fyziologického hľadiska s bázami alebo komplexotvornými prvkami alebo skupinami.

2. 3,4-Dihydroizochinolinový derivát všeobecného vzorca (I), podľa nároku 1, ktorým je zlúčenina vzorca



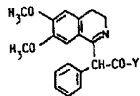
3. Spôsob výroby 3,4-dihydroizochinolinových derivátov všeobecného vzorca (I) podľa nároku 1 a 2, v y z n a ě u j ú c i s a t ý m , že sa

a) cyklizuje diamid kyseliny fenylmalónovej všeobecného vzorca (III)



kde X má význam uvedený vo všeobecnom vzorci (I), za prítomnosti kondenzačného činidla alebo

b) reaguje karboxylová kyselina všeobecného vzorca (IV)



(IV)

alebo halogenid tejto kyseliny,
kde Y znamená skupinu OH alebo atóm halogénu,
s amínom všeobecného vzorca (VI)

XH (VI),

kde X má význam uvedený vo všeobecnom vzorci (I), za prítomnosti kondenzačného činidla, následne sa takto získaná zlúčenina prípadne prevedie na svoju soľ prijateľnú z farmaceutického hľadiska.

4. Farmaceutický prostriedok s neuroprotektívnym účinkom na centrálny nervový systém, na liečenie chronických zápalových ochorení a na zabránenie zrážania krvi, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že ako svoju účinnú zložku obsahuje 3,4-dihydroizochinolínové deriváty všeobecného vzorca (I) podľa nárokov 1 až 2 alebo ich farmaceuticky prijateľnú soľ spolu s jedným alebo viacerými farmaceuticky prijateľnými nosičmi, rozpúšťadlami, alebo excipientmi.

5. 3,4-Dihydroizochinolínové deriváty všeobecného vzorca (I) podľa nárokov 1 až 2, ako aj soli týchto zlúčenín s kyselinami, prijateľnými z fyziologického hľadiska na použitie ako liečivá s neuroprotektívnym účinkom, na použitie na liečenie zápalových chronických ochorení a na použitie na zabránenie zrážaniu krvi.

6. Použitie 3,4-dihydroizochinolínových derivátov všeobecného vzorca (I) podľa nárokov 1 až 2, ako aj soli týchto zlúčenín s kyselinami, prijateľnými z fyziologického hľadiska na výrobu liečiva s neuroprotektívnym účinkom, liečiva na liečenie zápalových chronických ochorení a liečiva na zabránenie zrážaniu krvi.

Koniec dokumentu