(19) SUOMI - FINLAND
(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS
PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN
FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 961858 A7**

(12) **JULKISEKSI TULLUT PATENTTIHAKEMUS**
PATENTANSÖKAN SOM BLIVIT OFFENTLIG
PATENT APPLICATION MADE AVAILABLE TO THE PUBLIC

(21) Patenttihakemus - Patentansökan - Patent application 961858

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation - International patent classification
C07D241/44

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date **07.11.1994**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **02.05.1996**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **04.07.1996**

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date **13.06.2019**

(86) Kansainvälinen hakemus - Internationell ansökan - International application **07.11.1994 PCT/US1994/012775**

(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet - Priority

05.11.1993 US 148259
05.11.1993 US 148268
11.03.1994 US 208878
11.08.1994 US 289603

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 • **Acea Pharmaceuticals Inc.,** 213 Technology Drive, Irvine CA 92718, USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)
2 • **The Regents of The University of California,** 300 Lakeside Drive, 22nd Floor, Oakland, CA 94612-3550, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)
3 • **State of Oregon,** University of Oregon, Riverfront Research Park, Eugene, OR 97403-1238, USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 • **Cai, Sui Xiong,** USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)
2 • **Weber, Eckard,** Laguna Beach, CA 92651, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)
3 • **Keana, John F.W.,** Eugene, OR 97405, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)
4 • **Kher, Sunil,** USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Seppo Laine Oy, PL 339, 00181 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning - Title of the invention

Alkyyli-, atsido-, alkoksi- ja fluorisubstituoidut ja fuusioidut kinok salindionit ja niiden käyttö glyysinireseptorin antagonisteina

Alkyl-, azido-, alkoxi- och fluorsubstituerade och fusionerede kinoxal indioner och användningen av dessa såsom glycinreceptorantagonister

ALKYYLI-, ATSIDO-, ALKOKSI-, FLUORISUBSTITUOIDUT JA FUUSIOITUNEET KINOKSALIINIDIONIT JA NIIDEN KÄYTTÖ GLYSIINIRESEPTORIN ANTAGONISTEINA

Tämä keksintö tehtiin hallituksen tuella National Institutes of Health apurahoilla numerot NIDA DA 06727, NIDA DA 06356 ja NIDA DA 06726. Yhdysvaltain hallituksella on tiettyjä oikeuksia keksintöön.

Viitteet liittyviin hakemuksiin

Tämä hakemus on jatko-osa yhdysvaltalaiseen patenttihakemukseen nro. 08/208,878, jätetty 11. maaliskuuta 1994, ei päätöstä, joka on jatko-osa yhdysvaltalaiselle patenttihakemukselle nro. 08/148,268, jätetty 5. marraskuuta, 1993, rauennut, ja jatko-osa yhdysvaltalaiselle hakemukselle nro. 08/148,259, jätetty 5. marraskuuta, 1993, ei päätöstä. Kunkin näiden hakemuksien sisältö liitetään kokonaisuutena tähän yhteyteen viitejulkaisuiksi.

Keksinnön tausta

Keksinnön ala

Tämän keksinnön ala on lääkekemia ja se liittyy yhdisteisiin, joilla on suuri affiniteetti glysiinin sitoutumispaikkoihin, joilla ei ole PCP-sivuvaikutuksia ja jotka läpäisevät veriaivoesteen suurina pitoisuuksina. Etenkin tämä keksintö liittyy uusiin alkyyli-, atsido-, alkoksi-, fluorisubstituoituihin ja fuusioituneihin 1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioneihin ja niiden käyttöön iskeemiaan liittyvän neuronaalisen rappeuman, neuronaaliseen rappeumaan liittyvien patofysiologisten tilojen, kouristusten, ahdistuksen ja kroonisen kivun hoitoon tai estämiseen sekä anestesian aikaansaamiseen.

Alaan liittyvän tekniikan kuvaus

Glutamaatin uskotaan olevan pääasiallinen eksitoiva neurotransmitteri aivoissa. Keskushermostossa (CNS) on gluta-

maattireseptoreja kolmea päätyyppiä. Näitä kutsutaan yleensä kainaatti-, AMPA- ja N-metyyli-D-aspartaatti- (NMDA) reseptoreiksi (Watkins ja Olverman, *Trends in Neurosci.* 7:265-272 (1987)). NMDA-reseptoreja löydetään käytännössä kaikissa aivon hermosolujen membraaneissa. NMDA-reseptorit ovat ligandiportillisia kationikanavia, jotka glutamaatin tai aspartaatin (ei-selektiivisiä, endogeenisiä agonisteja) tai NMDA:n (selektiivinen agonisti) aktivoimina päästävät Na^+-, K^+- ja Ca^{++}-ioneja läpi (Wong ja Kemp, *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 31:401-425 (1991)).

Glutamaatti ei yksistään voi aktivoida NMDA-reseptoria. Aktivoituakseen glutamaatin vaikutuksesta NMDA-reseptorikanavan on ensin sitouduttava glysiiniin erityisellä glysiiniä voimakkaasti puoleensa vetävällä sitoutumispaikalla, joka on erillään reseptoriproteiinin glutamaatti/NMDA-sitoutumispaikasta (Johnson ja Ascher, Nature 325:329-331 (1987)). Glysiini on siksi pakollinen koagonisti NMDA-reseptori/kanava-kompleksissa (Kemp, J.A., *et al.*, *Proc. Natl.Acad.Sci. USA 85*:6547-6550 (1988)).

Glutamaatti/NMDA:n ja glysiinin sitoutumispaikkojen lisäksi NMDA-reseptorissa on lukuisia muita toiminnallisesti tärkeitä sitoutumispaikkoja. Näitä ovat muun muassa Mg^{++}- ja Zn^{++}-ionien, polyamiinien, arakidonihapon ja fensyklidiinin (PCP) sitoutumispaikat (Reynolds ja Miller, *Adv. in Pharmacol. 21*: 101-126 (1990); Miller, B., *et al.*, *Nature 355*:722-725 (1992)). PCP:ä sitova paikka - jota nykyisin yleisesti nimitetään PCP-reseptoriksi - sijaitsee NMDA-reseptori/kanava-kompleksin ionofoorihuokosen sisällä (Wong, E.H.F., *et al. Proc. Natl.Acad.Sci. USA 83*:7104-7108 (1986); Huettner ja Bean, *Proc.Natl.Acad.Sci. USA 85*:1307-1311 (1988); MacDonald, J.F., *et al.*, *Neurophysiol.* 58:251-266 (1987)). Jotta PCP pääsisi PCP-reseptorin vaikutukseen on kanava ensin avattava glutamaatille ja glysiinille. Ilman glutamaattia ja glysiiniä PCP ei voi sitoutua PCP-reseptoriin, vaikka joissakin tutkimuksissa on saatu viitteitä siihen, että PCP:ä voi sitoutua vähäisessä määrin,

jopa ilman glutamaattia ja glysiiniä (Sircar ja Zukin, *Brain Res. 556*:280-284 (1991)). Kun PCP sitoutuu PCP-reseptoriin, se tukkii avoimen kanavan läpi kulkevan ionivuon. Siksi PCP on avoimen kanavan sulkija ja ei-kilpaileva glutamaattiantagonisti NMDA-reseptori/kanava-kompleksissa.

Yksi kaikkein tehokkaimmista ja selektiivisimmistä lääkkeistä, jotka sitoutuvat PCP-reseptoriin, on kouristuksen vastainen (antikonvulsiivinen) lääke MK801. Tämän lääkkeen K_d on noin 3 nM PCP-reseptorilla (Wong, E.H.F., *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83*:7104-7108 (1986)).

Sekä PCP:llä että MK801:llä ja muilla PCP-reseptoriligandeilla, esim. dextrometorfaanilla, ketamiinilla ja N,N'-disubstituoiduilla guanidiineilla on neuroprotektiivista vaikutustehoa sekä *in vitro*- että *in vivo*-olosuhteissa (Gill, R., *et al, J. Neurosci.* 7:3343-3349 (1987); Keana, J.F.W., *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86* :5631-5635 (1989); Steinberg, G.K., *et al., Neuroscience Lett. 89*:193-197 (1988); Church, J., *et al.*, teoksessa: *Sigma and Phencyclidine-Like Compounds as Molecular Probes in Biology*, Domino and Kamenka, toim., Ann Arbor: NPP Books, ss. 747-756 (1988)). Näiden lääkkeiden hyvin tunnusomainen neuroprotektiivinen aktiivisuus johtuu paljolti niiden kyvystä estää liiallinen Ca^{++}-ionin sisäänmeno hermosoluihin niiden NMDA-reseptorikanavien kautta, jotka tulevat yliaktivoituneiksi johtuen liiallisesta glutamaatin vapautumista aivoiskeemian olosuhteissa (esim. aivohalvaus, iskeeminen sydänpysähdys, jne.) (Collins, R.C., *Metabol. Br. Dis. 1*: 231-240 (1986); Collins, R.C., *et al., Annals. Int. Med. 110*:992-1000 (1989)).

Näiden PCP-reseptorilääkkeiden terapeuttista tehoa iskeemian hoitoaineina on kuitenkin suuresti rajoittanut se, että näillä lääkkeillä on voimakkaita PCP:n kaltaisia käyttäytymissivuvaikutuksia (psykomimeettisiä käyttäytymisvaikutuksia), jotka näyttävät johtuvat näiden lääkkeiden vuorovaikutuksesta PCP-reseptorin kanssa (Trickebank, M.D., *et al., Eur. J. Pharmacol. 167*:127-135 (1989); Koek, W., *et*

al., J. Pharmacol. Exp. Ther. 245: 969 (1989); Willets ja Balster, *Neuropharmacology 27:*1249 (1988)). Nämä PCP:n kaltaiset käyttäytymissivuvaikutukset näyttävät aiheuttaneen MK801:n poisvetämisen sen kliinisestä kehittämisestä iskeemian hoitoaineena. Lisäksi näillä PCP-reseptoriligandeilla näyttää olevan melkoinen väärinkäyttöalttius, minkä osoittaa itsensä PCP:n väärinkäyttöalttius.

PCP-reseptoriligandien PCP:n kaltaiset käyttäytymisvaikutukset voidaan osoittaa eläinmalleilla: PCP ja sen sukuiset PCP-reseptoriligandit voivat aiheuttaa käytöksen kiihottumista (hyperlokomootiota) jyrsijöissä (Trickebank, M.D. *et al., Eur. J. Pharmacol. 167*:127-135 (1989)) ja luonteenomaiseen katalepsiaan kyyhkysissä (Koek, W., *et al., J. Pharmacol. Exp. Ther. 245*:969 (1989); Willets ja Balster, *Neuropharmacology 27*:1249 (1988)); lääkkeiden erotteluesimerkkikokeissa näiden lääkkeiden PCP-reseptoriaffiniteetilla ja niiden kyvyllä saada aikaan PCP-yhteensopivaa käyttäytymisvastetta on voimakas keskinäinen riippuvuus (Zukin, S.R., *et al., Brain Res. 294*: 174 (1984); Brady, K.T., *et al., Science 215:*178 (1982); Tricklebank, M.D., *et al., Eur. J. Pharmacol. 141*:497 (1987)).

Lääkkeillä, jotka toimivat kilpailevina antagonisteina NMDA-reseptorin glutamaattia sitovassa paikassa, kuten CGS 19755 ja LY274614, on myös neuroprotektiivista aktiivisuutta, koska nämä lääkkeet - kuten PCP-reseptoriliganditkin - voivat estää liiallisen Ca^{++}-vuon NMDA-reseptori/kanavien läpi iskeemiassa (Boast, C.A., *et al., Brain Res. 442:*345-348 (1988); Schoepp, D.D., *et al., J. Neural. Trans. 85*:131-143 (1991)). Kilpailevilla NMDA-reseptoriantagonisteilla on kuitenkin myös PCP:n kaltaisia sivuvaikutuksia eläinmalleissa (käyttäytymisen kiihottumista, aktiivisuutta PCP:n lääke-erottelukokeissa) vaikkakaan ei yhtä voimakkaasti kuin MK801:lla ja PCP:llä (Trickebank, M.D., *et al., Eur. J. Pharmacol. 167*:127-135 (1989)).

Vaihtoehtoinen tapa estää NMDA-reseptorikanavan aktivoitumi-

nen on käyttää antagonisteja NMDA-reseptorin glysiinisitoutumispaikassa. Koska glysiinin on sitouduttava glysiinipaikkaan, jotta glutamaatti voisi vaikuttaa kanava-aukkoon (Johnson ja Ascher, *Nature 325*: 329-331 (1987); Kemp, J.A., *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85*: 6547-6550 (1988)), glysiiniantagonisti voi estää kokonaan ionivuon NMDA-reseptorikanavan läpi - jopa silloin, kun suuri määrä glutamaattia on läsnä.

Äskettäin tehdyt *in vivo* -mikrodialyysikokeet osoittavat, että rotan fokaali-iskeemiamallissa glutamaattia vapautuu voimakkaasti kasvavassa määrin iskeemisellä aivoalueella ilman, että glysiinin vapautuminen merkittävästi kasvaa (Globus, M.Y.T., *et al. J. Neurochem. 57*:470-478 (1991)). Glysiiniantagonistien pitäisi siten teoreettisesti olla hyvin tehokkaita neuroprotektiivisia aineita, koska ne voivat ei-kilpailevasti estää NMDA-kanavien avautumisen glutamaatin vaikutuksesta, ja niiden ei siten tarvitse, toisin kuin kilpailevien NMDA-antagonistien, selviytyä suurista endogeenisista glutamaattipitoisuuksista, joita vapautuu iskeemisillä aivonalueilla.

Lisäksi, koska glysiiniantagonistit eivät toimi glutamaatti/NMDA- eikä PCP-sitoutumispaikoissa NMDA-kanavan avautumisen estämiseksi, nämä lääkkeet eivät ehkä aiheuta sellaista PCP:n kaltaista käyttäytymissivuvaikutusta, joka havaitaan sekä PCP-reseptoriligandeilla ja kilpailevilla NMDA-reseptoriantagonisteilla (Tricklebank, M.D., *et al., Eur. J. Pharmacol. 167*: 127-135 (1989); Koek, W., *et al., J. Pharmacol. Exp. Ther. 245*:969 (1989); Willets ja Balster, *Neuropharmacology 27*:1249 (1988); Tricklebank, M.D., *et al., Eur. J. Pharmacol. 167*:127-135 (1989); Zukin, S.R., *et al., Brain Res. 294*: 174 (1984); Brady, K.T., *et al., Science 215*:178 (1982); Tricklebank, M.D., *et al., Eur. J. Pharmacol. 141*:497 (1987)). Se, että glysiiniantagonistit voivat todella olla vailla PCP:n kaltaisia käyttäytymissivuvaikutuksia, on tullut esille viimeaikoina tehdyissä tutkimuksissa, joissa glysiiniantagonisteja injektoitiin suoraan jyrsijöiden

aivoihin ilman, että tuloksena oli PCP:n kaltaista käyttäytymistä (Tricklebank, M.D., *et al.*, *Eur. J. Pharmacol.* *167*:127-135 (1989)).

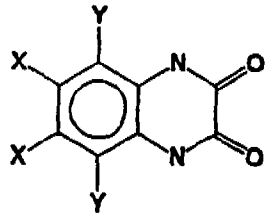
Kaksi pääasiallista ongelmaa on kuitenkin estänyt glysiiniantagonistien kehittämisen kliinisesti hyödyllisiksi neuroprotektiivisiksi aineiksi:

A. Eniten saatavilla olevat glysiiniantagonistit, joilla on suhteellisen suuri reseptorin sitoutumisaffiniteetti koeputkessa, kuten 7-Cl-kynureenihappo (Kemp, J.A., *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *85*:6547-6550 (1988)), 5,7-dikloorikynureenihappo (McNamara, D., *et al.*, *Neuroscience Lett.* *120*: 17-20 (1990)) ja indoli-2-karboksyylihappo (Gray, N.M., *et al.* *J. Med. Chem.* *34*:1283-1292 (1991)), eivät pysty läpäisemään veriaivoestettä eivätkä ne sen vuoksi ole käyttökelpoisia lääkeaineita;

B. Ainoa saatavissa oleva glysiiniantagonisti, joka läpäisee riittävästi veriaivoesteen - HA-966-lääke (Fletcher ja Lodge, *Eur. J. Pharmacol.* *151*:161-162 (1988)) - on osittain agonisti, jolla on vain mikromolaarinen affiniteetti glysiinin sitoutumispaikkaan. Neuroprotektiivista kykyä ei siten ole osoitettu elimistössä HA-966:lle eikä muillekaan saatavissa oleville glysiiniantagonisteille, koska niiltä puuttuu biologinen saatavuus elimistössä.

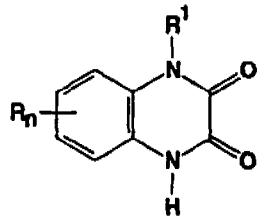
Äskettäin kuitenkin Kulagowski *et al. J. Med. Chem.* *37*: 1402-1405 (1994) ilmoittivat onnistuneensa tunnistamaan suun kautta aktiivisia glysiinireseptorin antagonisteja ja esittivät, että 3-substituoidut 4-hydroksikinoliini-2(1*H*)-onit ovat selektiivisiä antagonisteja, joilla on tehokas *in vivo*-aktiivisuus.

Kirjallisuudessa on raportoitu lukuisia kertoja substituoiduista 1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioneista, jotka ovat käyttökelpoisia ei-NMDA:n, NMDA:n ja glysiinireseptorien välittämän patofysiologisen tilan hoidossa. Esimerkiksi yhdysvaltalaisessa patentissa nro. 4,975,430 esitetään 1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni-yhdisteitä, joilla on kaava:



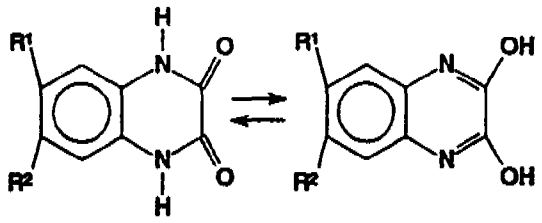
kukin X on toisistaan riippumatta nitro- tai syanoryhmä ja jossa kukin Y on toisistaan riippumatta H, kevyt alkyyli-, kevyt alkoksi- tai CF_3-ryhmä. Näiden yhdisteiden ilmoitetaan usein olevan käyttökelpoisia NMDA-reseptorin stimulaatioon liittyvän neuronaalitilan hoidossa.

Yhdysvaltalaisessa patentissa nro. 3,962,440 esitetään 1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioniyhdisteitä, joilla on kaava:



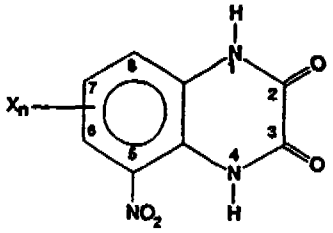
jossa R^1 voi olla vety tai metyyli-ryhmä, R_n voi olla kevyt alkyyli-, kevyt alkoksi-, kevyt alkyylitio-, syklopropyyli-, nitro-, syano-, halogeeni-, C_1-C_2(trifluorimetyyli)aminon fluorialkyyli- tai substituoitu aminoryhmä ja n voi olla 0, 1 tai 2. Nämä yhdisteet ovat kirjallisuuden mukaan käyttökelpoisia hypnoottisina aineina.

Yhdysvaltalaisessa patentissa nro. 4,812,458 esitetään 1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni-yhdisteitä, joilla on kaava:



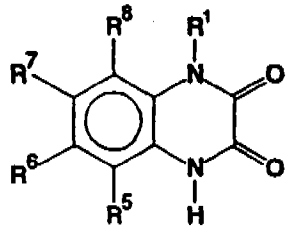
jossa R^1 on halogeeni-, syano-, trifluorimetyyli-, etynyyli- tai N_3-ryhmä, ja R^2 on SO_2C_{1-3}-alkyyli-, trifluorimetyyli-, nitro-, etynyyli- tai syanoryhmä. Näiden yhdisteiden ilmoitetaan olevan käyttökelpoisia eksitoivien neurotransmitte-reiden, etenkin kviskalaattireseptorien, yliaktiivisuuden aiheuttamien oireiden hoitoon, sekä neurolepteinä.

Yhdysvaltalaisessa patentissa nro. 4,659,713 esitetään 1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni-yhdisteitä, joilla on kaava:



jossa X on vety, kloori-, bromi-, fluori-, jodi-, trikloorimetyyli-, dikloorifluorimetyyli-, difluorimetyyli ja n on 1 tai 2. Nämä yhdisteet ovat kirjallisuuden mukaan käyttökelpoisia kokkidioosin hoitoon elävissä olennoissa.

Yhdysvaltalaisessa patentissa nro. 4,948,794 esitetään 1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni-yhdisteitä, joilla on kaava:



jossa R^1 on C_{1-12}-alkyyli-, joka voi valinnaisesti olla substituoitu hydroksi-, formyyli-, karboksiryhmillä, karboksyylihappoestereillä, amideilla tai amiineilla, C_{3-8}-

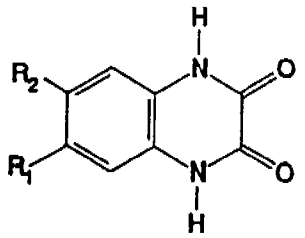
sykloalkyyli-, aryyli- tai aralkyyliryhmillä; ja missä R^6 on vety, halogeeni-, Cn-, CF_3-, NO_2- tai OR'-, jossa R' on C_{1-4}-alkyyli-, ja R^5, R^7 ja R^8 ovat vetyjä, sillä edellytyksellä, että R^6 ei ole CF_3, OCH_3, NO_2, Cl tai Br, kun R^1 on CH_3; tai

R^6 ja R^7 ovat toisistaan riippumatta NO_2, halogeeni, CN, CF_3 tai OR', jossa R' on C_{1-4}-alkyyli ja R^5 ja R^8 ovat kumpikin vetyjä;
tai

R^5 ja R^6 muodostavat yhdessä edelleen fuusioituneen aromaattisen renkaan, joka voi olla substituoitu halogeenilla, NO_2:lla, CN:lla, CF_3:lla tai OR':lla, jossa R' on C_{1-4}-alkyyli; tai

R^7 ja R^8 muodostavat yhdessä edelleen fuusioituneen aromaattisen renkaan, joka voi olla substituoitu halogeenilla, NO_2:lla, CN:lla, CF_3:lla tai OR':lla, jossa R' on C_{1-4}-alkyyli; ja R^5 ja R^6 ovat toisistaan riippumatta vety, halogeeni, CN, CF_3, NO_2 tai OR', jossa R' on C_{1-4}-alkyyli. Nämä yhdisteet ovat kirjallisuuden mukaan käyttökelpoisia eksitoivien neurotransmittereiden, etenkin kviskalaattireseptorien, yliaktiivisuuden aiheuttamien oireiden hoitoon, sekä neurolepteinä.

Yoneda ja Ogita, *Biochem. Biophys. Res. Commun. 164*:841-849 (1989) esittävät, että seuraavat 1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dionit syrjäyttivät kilpailevasti [^{3}H]-glysiinin strykniini-epäherkän sitoutumisen vaikuttamatta muihin sitoutumispaikkoihin NMDA-reseptorikompleksissa:



R_1	R_2	
H	H	QX
Cl	H	CQX
Cl	Cl	DCQX
NO_2	CN	CNQX
NO_2	NO_2	DNQX

Kirjoittajien mukaan rakenne-aktiivisuus-riippuvuussuhde

kinoksaliineissa osoittaa selvästi, että kloridiryhmät bentseenirenkaan sekä 6- että 7-asemissa ovat ratkaisevan tärkeitä Gly-paikkojen antagonistiselle kyvylle. Yhden kloridin poistaminen molekyylistä saa aikaan Gly-paikkojen affiniteetin 10-kertaisen pienentymisen.

Kleckner ja Dingledine, *Mol. Pharm.* *36*:430-436 (1989), esittävät, että 6,7-dinitro-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni ja 6-syano-7-nitro-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni ovat tehokkaampia kainaatin kuin glysiinin antagonisteja, mutta substituointi Cl:lla 6-asemaan ja erityisesti 6-ja 7-asemiin lisää tehoa glysiinipaikassa. Lisäksi kirjoittajat ehdottavat, että glysiinipaikan antagonistit voivat olla tehokkaita NMDA-reseptorin välittämien neuropatologisten tilojen hoitoon.

Rao, T.S. *et al.*, *Neuropharmacology* *29*:1031-1035 81990), esittävät, että 6,7-dinitro-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni ja 7-syano-6-nitro-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni antagonisoivat NMDA:iin liittyvien, glysiiniä tunnistavien paikkojen välittämiä vasteita elimistössä.

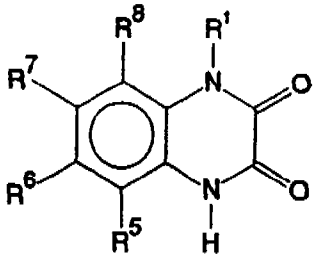
Pellegrini-Giampietro, D.E., *et al.*, *Br. J. Pharmacol.* *98*:1281-1286 (1989), esittävät, että 6-syano-7-nitro-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni ja 6,7-dinitro-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni voivat antagonisoida L-glutamaatti-vasteita vuorovaikuttamalla NMDA-reseptorin ionikanavakompleksin glysiinintunnistuspaikkojen kanssa.

Ogita ja Yoneda, *J. Neurochem.* *54*:699-702 (1990), esittävät, että 6,7-dikloori-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni on NMDA-reseptorikompleksin strykniini-epäherkille [^{3}H]-glysiinin sitoutumispaikoille spesifinen kilpaileva antagonisti. Kirjoittajien mukaan kaksi kloridiradikaalia kinoksaliinin bentseenirenkaan 6- ja 7-asemissa ovat ratkaisevan tärkeitä glysiinisitoutumispaikkojen antagonistiselle teholle.

Kessler, M. *et al.*, *Brain Res.* *489*:377-382 (1989) esittävät,

että 6,7-dinitro-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni ja 6-syano-7-nitro-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni inhiboivat [^{3}H]-glysiinin sitoutumista strykniini-epäherkkiin glysiinisitoutumispaikkoihin, jotka liittyvät NMDA-reseptoreihin.

Eurooppalaisessa patenttihakemusjulkaisussa nro. 0 377 112, joka on tullut julkiseksi 11. heinäkuuta, 1990, esitetään 1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni-yhdisteitä, joilla on seuraava kaava:



jossa muun muassa R^1 voi olla hydroksi, alkoksi, aryloksi, aralkyloksi, sykloalkyylialkoksi, sykloalkoksi, alkanoyloksi; ja R^5, R^6, R^7 ja R^8 voivat olla toisistaan riippumatta vety, nitro, halogeeni, syano, trifluorimetyyli, $SO_2NR'R'$, SO_2R' tai OR', missä R' on vety tai C_{1-4}-alkyyli. Näiden yhdisteiden ilmoitetaan olevan käyttökelpoisia eksitoivien välittäjäaineiden, etenkin kviskalaattireseptorien yliaktiivisuuden aiheuttamien oireiden hoitoon, sekä neurolepteinä.

Lester, R.A., *et al.*, *Mol. Pharm.* 35:565-570 (1989), esittävät, että 6-syano-7-nitro-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni antagonisoi NMDA-reseptorin välittämiä vasteita glysiinin sitoutumispaikan kilpailevalla vuorovaikutuksella.

Patel, J., *et al.*, *J. Neurochem.* 55:114-121 (1990) esittävät, että 6,7-dinitro-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dionin neuroprotektiivinen aktiivisuus johtuu glysiinin koagonistisen aktiivisuuden antagonismista NMDA-reseptorikanavakompleksissa.

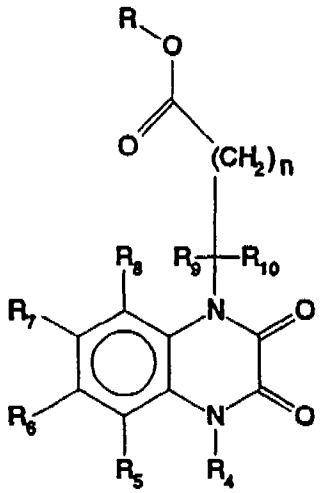
Horner, L. *et al.*, *Chem. Abstracts* 48:2692 (1953) esittävät 6,8-dinitro-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dionin.

Cheeseman, G.W.H., *J. Chem. Soc.*:1170-1176 (1962) esittävät 6,7-dibromi-2,3-dihydroksikinoksaliinin (tunnetaan myös 6,7-dibromi-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dionina).

Honore, T. *et al.*, *Science, 241*:701-703 (1988) esittävät, että 6,7-dinitro-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni ja 7-syano-6-nitro-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni ovat tehokkaita ei-NMDA-glutamaattireseptorin antagonisteja.

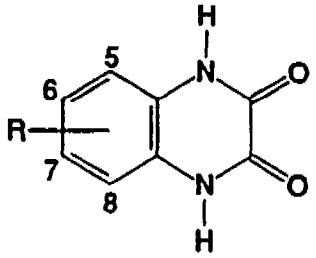
Sheardown, M.J., *et al.*, *Eur. J. Pharmacol. 174*:197-204 (1989), esittävät, että 5,7-dinitro-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni on tehokas strykniini-epäherkän glysiinireseptorin antagonisti ja että sillä on antikonvulsiivisia ominaisuuksia. Sheardown *et al.* esittävät myös, että 5,7-dinitro-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni kuten myös DNQX ja CNQX pääsevät huonosti keskushermostojärjestelmään.

Kansainvälisessä patenttihakemuksessa nro. WO91/13878 esitetään seuraavia N-substituoituja 1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioneita, jotka sitoutuvat glysiinireseptoriin:



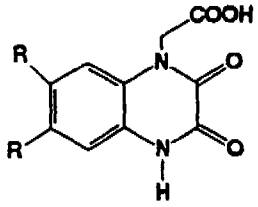
jossa R on vety, C_{1-6}-alkyyli tai aralkyyli, ja n on kokonaisluku 0 - 5; R^4 on vety tai hydroksi; R^5, R^6, R^7 ja R^8 ovat toisistaan riippumatta vety, nitro-, halogeeni-, alkoksi-, aryloksi-, aralkoksi, C_{1-6}-alkyyli- tai aryyli; R^9 on vety, kevyt alkyyli tai aryyli; R^{10} on vety tai alkyyli, sekä niiden farmaseuttisesti hyväksyttäviä suoloja.

Leeson *et al.*, *J. Med. Chem.* 34:1243-1252 (1991), esittävät joukon ei-selektiivisen eksitoivien aminohappoantagonisti-kynurenihapon johdannaisia. He esittävät myös joukon rakenteellisesti toisiinsa liittyviä kinoksaliini-2,3-dioneja, jotka ovat glysiini/NMDA-antagonisteja, mutta jotka eivät ole selektiivisiä ja paljon vähemmän tehokkaita kuin kynureenihappojohdannaiset. Kinoksaliini-2,3-dioneilla on seuraavanlainen rakenne:



missä R on vety, 5-Cl, 7-Cl, 5,7-Cl_2, 6,7-Cl_2, 6,7-$(CH_3)_2$, 6-NO_2 tai 6,7-$(NO_2)_2$. He esittävät myös joukon N-metyylijohdannaisia.

Epperson *et al.*, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 3(12)*:2801-2804 (1993) esittävät kahdentoista N-substituoidun kinoksaliinidionin synteesin aminohappofarmakologian. Etenkin yhdisteillä, joiden rakenne on:



4a R = CH_3
4b R = Cl

ilmoitetaan olevan merkittävä antagonisti sekä AMPA- ja glysiinipaikan NMDA-reseptoreille. 4a:n funktionaalinen antagonismi on osoitettu. Taustaksi kirjoittavat selittävät, että kinoksaliinidionien kuten 6,7-dinitrokinoksaliini-2,3-dionin ja 6-syano-7-nitrokinoksaliini-2,3-dionin ja 6-syano-7-dinitrokinoksaliini-2,3-dionin on osoitettu olevan AMPA-(Honore *et al.*, *Science 241*:701 (1988) sekä glysiiniantagonisteja (Birch *et al.*, *Eur. J. Pharmacol.*

156:177 (1988)) ja myös neuroprotektiiveja *in vitro* (Frandson, et al., *J. Neurochem.* 53:297 (1989)) ja AMPA-selektiivisen kinoksaliinidioni-2,3-dihydroksi-6-nitro-7-sufamoyyli-bentso(F)kinoksaliinin on osoitettu olevan neuroprotektiivi aivoiskeemiamalleissa (Sheardown *et al.*, *Science* 247:571 (1990)).

Glysiiniantagonisteja koskeva äskettäin tehty katsaus on viitejulkaisussa Leeson, P.D., "Glycine-Site N-Methyl-D-aspartate Receptor Antagonists", luku 13, teoksessa Drug Design for Neuroscience, Kozikowski, A.P., (toim.), Raven Press, New York, ss. 338-381 (1993).

Edelleenkin on olemassa tarve tehokkaille ja selektiivisille glysiini/NMDA-antagonisteille, joilla
- ei ole PCP:n kaltaisia käyttäytymissivuvaikutuksia, jotka ovat yleisiä PCP:n kaltaisille NMDA-kanavan sulkijoille, kuten MK801, tai kilpaileville NMDA-reseptoriantagonisteille, kuten CGS19755;
- on tehokas anti-iskeeminen teho johtuen niiden glutamaattiantagonismin ei-kilpailevasta luonteesta NMDA-reseptorilla;
- jotka ylittävät veriaivoesteen riittävän tehokkailla pitoisuuksilla;
- jotka ovat käyttökelpoisia uusina antikonvulsiiveina, joilla on vähemmän sivuvaikutuksia kuin PCP:n kaltaisilla NMDA-kanavan sulkijoilla tai kilpailevilla NMDA-antagonisteilla;
- jotka auttavat määrittelemään NMDA-reseptorin glysiinin sitoutumispaikan funktionaalisen merkittävyyden *in vivo*.

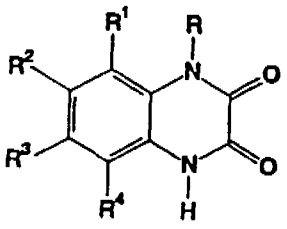
Keksinnön yhteenveto

Tämä keksintö liittyy uuden yhdisteluokan löytämiseen, joilla yhdisteillä on suuri affiniteetti strykniini-epäherkkään glysiinin sitoutumispaikkaan, joilla ei ole PCP-sivuvaikutuksia ja jotka ylittävät veriaivoesteen suurina pitoisuuksina. Näitä yhdisteitä ovat muun muassa alkyyli-, atsido-, alkoksi-, hydroksi- ja fluorisubstituoidut 1,4-kinoksaliini-2,3-

dionit sekä 1,4-kinoksaliini-2,3-dionit, joissa on fuusioituneita renkaita. Alkyylisubstituoitujen 1,4-kinoksaliini-2,3-dionien suuri affiniteetti glysiinin sitoutumispaikkaan oli odottamaton moniin kirjallisuudessa raportoituihin tuloksiin nähden, joissa esitettiin, että elektroneja puoleensavetävät ryhmät bentseeniytimessä ovat välttämättömiä korkealle sitomisaffiniteetille ja siihen nähden että alkyyli- ja alkoksiryhmät ovat elektroneja luovuttavia ja atsidoryhmä on vain heikosti elektroneja puoleensavetävä.

Keksintö liittyy myös menetelmään aivohalvaukseen, iskeemiaan, keskushermostojärjestelmän (CNS) traumaan, hypoglykemiaan ja kirurgiaan liittyvän neuronaalisen vaurion hoitoon tai ennaltaehkäisyyn; neurodegeneratiivisten sairauksien, muun muassa Alzheimerin taudin, amyotrooppisen lateraaliskleroosin, Huntingtonin taudin ja Downin syndrooman hoitoon; eksitoivien aminohappojen yliherkistymisen haitallisten vaikutusten hoitoon tai ennaltaehkäisyyn; ahdistuksen, kouristusten, kroonisen kivun tai psykoosin hoitoon; opiaattien siedon ennaltaehkäisyyn; tai hypnoottisen vaikutuksen tai anestesian aikaansaamiseen, jossa menetelmässä annetaan sellaisen hoidon tai ennaltaehkäisyn tarpeessa olevalle elävälle olennolle tässä määritellyn mukaista substituoitua 1,4-dihydrokinoksaliinia-2,3-dionia, jolla on suuri affiniteetti glysiinin sitoutumispaikkaan ja kyky ylittää veriaivoeste korkeina pitoisuuksina, ilman PCP-sivuvaikutuksia.

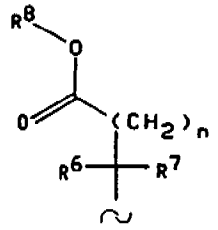
Tämän keksinnön yhdisteitä ovat muun muassa sellaiset, jotka ovat kaavan *I* mukaisia:



I

tai sen tautomeerit;
jossa kaavassa

R on vety, hydroksi, amino, $-CH_2CONHAr$, $-NHCONHAr$, $-NHCOCH_2Ar$, $-COCH_2Ar$, jossa Ar on aryyliryhmä tai radikaali, jonka kaava on:



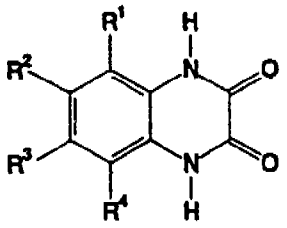
II

jossa R^6 on vety, kevyt alkyyli, jossa on 1 - 6 hiiliatomia, tai aryyli; R^7 on vety tai kevyt alkyyli, jossa on 1 - 7 hiiliatomia; n on kokonaisluku 0 - 5; ja R^8 on vety, C_{1-6}-alkyyli tai aralkyyli;

R^1, R^2, R^3 ja R^4 on toisistaan riippumatta valittu ryhmästä, jossa on vety, hydroksi, asyloksi, aralkoksi, amino, alkanoyyliamino, halogeeni, halogeenialkyyli, nitro, alkyyli, alkoksi, karboksi, alkanoyyli, tioalkyyli, alkoksialkyyli, aryloksialkyyli, aryylialkyyli, alkenyyli, alkynyyli, aryylialkenyyli, aryylialkynyyli, syano, syanometyyli, disyanometyyli, syanoamino, disyanoamino tai atsido; tai jossa R^1 ja R^2, R^2 ja R^3, tai R^3 ja R^4 muodostavat fuusioituneen 5- tai 6-atomisen hiilisyklisen, heterosyklisen, aromaattisen tai heteroaromaattisen renkaan.

Edullisesti vähintään yksi R^1-R^4-ryhmistä on alkyyli, alkoksi, hydroksi tai atsido, tai R^1 on syano, tai R^1 ja R^2, R^2 ja R^3, tai R^3 ja R^4 muodostavat fuusioituneen 5- tai 6-atomisen hiilisyklisen, heterosyklisen, aromaattisen tai heteroaromaattisen renkaan.

Keksintö koskee myös tiettyjä yhdisteitä, joilla on havaittu poikkeuksellinen *in vivo*-aktiivisuus ja joilla on kaava (*III*):



III

tai sen tautomeeri,

jossa kaavassa

R^1 on nitro, fluori tai kloori;

R^2 on fluori, kloori, alkyyli, alkoksi tai atsido;

R^3 on fluori tai kloori; ja

R^4 on vety tai fluori;

sillä edellytyksellä, että vähintään yksi R^1-R^4-ryhmistä on fluori ja että R^2 ja R^4 eivät ole fluori silloin, kun R^1 on nitro.

Keksintö liittyy myös tiettyihin yhdisteisiin, joilla on kaava *III*, tai sen tautomeeri, joissa

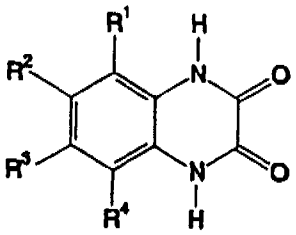
R^1 on nitro, syano, CF_3, karboksi tai alkanoyyli;

R^2 on alkoksi, aralkoksi, tioalkyyli, karboksi, alkanoyyli, hydroksi, merkaptoalkyyli, atsido tai NR^5R^6, jossa R^5 ja R^6 ovat toisistaan riippumatta vety-, alkyyli- tai aryyliryhmiä;

R^3 on halogeeni, halogeenialkyyli, nitro, alkyyli, alkoksi, atsido tai syano; ja

R^4 on vety.

Keksintö liittyy myös menetelmään 1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dionin, jolla on kaava (*IV*):



IV

tai sen tautomeeri, valmistamiseksi,

jossa kaavassa

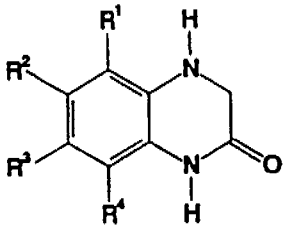
R^1 on nitro;

R^2 on halogeenialkyyli, halogeeni, syano, alkyyli tai alkoksi;

R^3 on halogeenialkyyli, halogeeni, syano, alkyyli tai alkoksi; ja

R^4 on vety;

jossa menetelmässä yhdiste, jonka kaava (*V*) on:



V

tai sen tautomeeri,

jossa kaavassa

R^1 on vety;

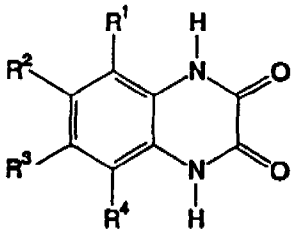
R^2 on halogeenialkyyli, halogeeni, syano, alkyyli tai alkoksi;

R^3 on halogeenialkyyli, halogeeni, syano, alkyyli tai alkoksi; ja

R^4 on vety;

reagoi savuavan typpihapon kanssa ja siten valmistettu 1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni erotetaan.

Keksintö liittyy myös menetelmään yhdisteen, jolla on kaava (*VI*):



VI

tai sen tautomeerin valmistamiseksi,

jossa kaavassa

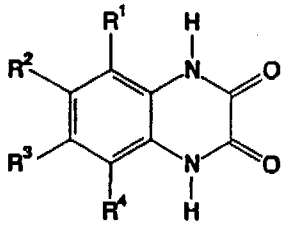
R^1 on nitro, syano, CF_3, karboksi tai alkanoyyli;

R^2 on alkoksi, aralkoksi, hydroksi, merkaptoalkyyli, atsido tai NR^5R^6, jossa R^5 ja R^6 ovat toisistaan riippumatta vety, alkyyli tai aryyliryhmiä;

R^3 on halogeeni, halogeenialkyyli, nitro, alkyyli, alkoksi, atsido tai syano; ja

R^4 on vety;

jossa menetelmässä yhdiste, jonka kaava (*VII*) on:



VII

tai sen tautomeeri,

jossa kaavassa

R^1 on nitro, syano, CF_3, karboksi tai alkanoyyli;

R^2 on fluori;

R^3 on halogeeni, halogeenialkyyli, nitro, alkyyli, atsido tai syano; ja

R^4 on vety;

reagoi erikseen alkoksidin, aryylialkoksidin, hydroksidin, alkyylimerkaptidin, atsidin tai HNR^5R^6:n kanssa inertissä liuottimessa ja siten valmistettu yhdiste erotetaan.

Yksi tämän keksinnön suoritusmuoto liittyy menetelmään aivohalvaukseen, iskeemiaan, keskushermostojärjestelmän (CNS) traumaan tai hypoglykemiaan (A) liittyvien neuronaalisten vaurioiden tai kirurgiaan liittyvien haitallisten neurologisten jälkiseurauksien (B) hoitamiseksi tai ennaltaehkäisemiseksi, jossa menetelmässä annetaan sellaisen hoidon tai ennaltaehkäisyn tarpeessa olevalle elävälle olennolle tehokas määrä kaavan *I* mukaista yhdistettä tai sen tautomeeriä.

Toinen tämän keksinnön suoritusmuoto liittyy neurodegeneratiivisen sairauden, joka on joko Alzheimerin tauti,

amyotrooppinen lateraaliskleroosi, Huntingtonin tauti tai Downin syndrooma, hoitamiseksi, jossa menetelmässä annetaan sellaisen hoidon tarpeessa olevalle elävälle olennolle tehokas määrä kaavan *I* mukaista yhdistettä tai sen tautomeeriä.

Tämän keksinnön kolmas suoritusmuoto liittyy menetelmään NMDA-reseptorikompleksin eksitoivien aminohappojen antagonoimiseksi, jossa menetelmässä annetaan sen tarpeessa olevalle elävälle olennolle tehokas määrä kaavan I mukaista yhdistettä tai sen tautomeeriä.

Tämän keksinnön neljäs suoritusmuoto liittyy menetelmään NMDA-reseptorin yliaktiivisuuden haitallisten vaikutusten hoitamiseksi tai ennaltaehkäisemiseksi, jossa menetelmässä annetaan sellaisen hoidon tai ennaltaehkäisyn tarpeessa olevalle elävälle olennolle tehokas määrä kaavan *I* mukaista yhdistettä tai sen tautomeeriä.

Tämän keksinnön viides suoritusmuoto liittyy menetelmään kroonisen kivun hoitamiseksi, jossa menetelmässä annetaan sellaisen hoidon tarpeessa olevalle elävälle olennolle tehokas määrä kaavan *I* mukaista yhdistettä tai sen tautomeeriä.

Tämän keksinnön kuudes suoritusmuoto liittyy menetelmään ahdistuksen hoitamiseksi tai ennaltaehkäisemiseksi, jossa menetelmässä annetaan sellaisen hoidon tai ennaltaehkäisyn tarpeessa olevalla elävälle olennolle tehokas määrä kaavan *I* mukaista yhdistettä tai sen tautomeeriä.

Tämän keksinnön seitsemäs suoritusmuoto liittyy menetelmään kouristusten hoitamiseksi tai ennaltaehkäisemiseksi, jossa menetelmässä sellaisen hoidon tai ennaltaehkäisyn tarpeessa olevalle elävälle olennolle annetaan tehokas määrä kaavan *I* mukaista yhdistettä tai sen tautomeeriä.

Tämän keksinnön kahdeksas suoritusmuoto liittyy menetelmän

anestesian aikaansaamiseksi, jossa menetelmässä sellaisen anestesian tarpeessa olevalle elävälle olennolle annetaan tehokas määrä kaavan *I* mukaista yhdistettä tai sen tautomeeriä.

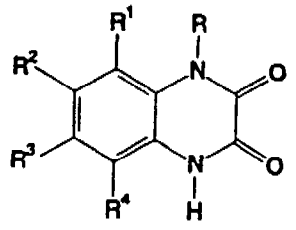
Tämän keksinnön yhdeksäs suoritusmuoto liittyy menetelmään NMDA-reseptori-ionikanavaan liittyvän psykoosin hoitamiseksi tai ennaltaehkäisemiseksi, jossa menetelmässä sellaisen hoidon tai ennaltaehkäisyn tarpeessa olevalle elävälle olennolle annetaan tehokas määrä kaavan *I* mukaista yhdistettä tai sen tautomeeriä.

Tämän keksinnön kymmenes suoritusmuoto liittyy menetelmään hypnoottisen vaikutuksen aikaansaamiseksi, jossa menetelmässä sellaisen hoidon tarpeessa olevalle elävälle olennolle annetaan tehokas määrä kaavan *I* mukaista yhdistettä tai sen tautomeeriä.

Tämän keksinnön yhdestoista suoritusmuoto liittyy radioaktiiviseksi merkattuun, kaavan I mukaiseen yhdisteeseen tai sen tautomeeriin.

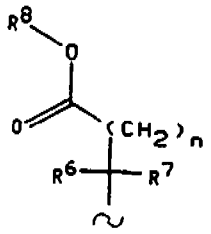
Tämän keksinnön kahdestoista suoritusmuoto liittyy kaavan *I* mukaisen yhdisteen tai sen tautomeerin farmaseuttisesti hyväksyttävään suolaan.

Tämän keksinnön kolmastoista suoritusmuoto liittyy menetelmään opiaattien siedon ehkäisemiseksi, jossa menetelmässä sellaisen ehkäisyn tarpeessa olevalle elävälle olennolle annetaan tehokas määrä yhdistettä, jonka kaava on:



tai sen tautomeeriä, jossa kaavassa

R on vety, hydroksi, amino, $-CH_2CONHAr$, $-NHCONHAr$, $-NHCOCH_2Ar$, $-COCH_2Ar$, jossa Ar on aryyliryhmä tai radikaali, jonka kaava on:



jossa R^6 on vety, kevyt alkyyli, jossa on 1 - 6 hiiliatomia, tai aryyli; R^7 on vety tai kevyt alkyyli, jossa on 1 - 6 hiiliatomia; n on kokonaisluku 0 - 5; ja R^8 on vety, C_{1-6}-alkyyli tai aralkyyli;

R^1, R^2, R^3 ja R^4 on toisistaan riippumatta valittu ryhmästä, johon kuuluvat vety, hydroksi, asyloksi, aralkoksi, amino, alkanoyyliamino, halogeeni, halogeenialkyyli, nitro, alkyyli, alkoksi, karboksi, alkanoyyli, tioalkyyli, alkoksialkyyli, aryloksialkyyli, aryylialkyyli, alkenyyli, alkynyyli, aryylialkenyyli, aryylialkynyyli, syano, syanometyyli, disyanometyyli, syanoamino, disyanoamino tai atsido;
tai jossa R^1 ja R^2, R^2 ja R^3, tai R^3 ja R^4 muodostavat fuusioituneen 5 - tai 6-renkaisen hiilisyklisen, heterosyklisen, aromaattisen tai heteroaromaattisen renkaan.

Lyhyt selitys piirustuksista

Kuvio 1 esittää graafisesti 5-nitro-6,7-dimetyylikinoksaliinidionin (NDMQX) vaikutuksen formaliinikiputestin varhaisvaiheeseen.

Kuvio 2 esittää graafisesti NDMQX:n vaikutuksen formaliinikiputestin myöhemmässä vaiheessa.

Kuvio 3 esittää graafisesti ajan funktiona 7-kloori-6-metyyli-5-nitro-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dionin [7,5 mg/kg NMCQX 0,05 M Tris-puskurissa] antikonvulsiivisen vaikutuksen

MES-testissä.

Kuvio 4 esittää graafisesti NMCQX:n antikonvulsiivisuuden annosvasteen (mitattu 60 minuutti vatsokalvon sisäisen injektion jälkeen) vaikutuksen MES-testissä.

Kuvio 5 esittää graafisesti ajan funktiona NDMQX:n (15 mg/kg NDMQX 0,1 M arginiinipuskurissa) antikonvulsiivisen vaikutuksen MES-testissä.

Kuvio 6 esittää graafisesti NDMQX:n antikonvulsiivisuuden annosvasteen (mitattu 30 minuuttia vatkakalvon sisäisen injektion jälkeen). MES-testissä.

Kuvio 7 esittää graafisesti NDMQX:n kroonisen (8 päivää) vaikutuksen morfiinin sietoon formaliinitestissä; @, $p < 0,03$; *, $p < 0,05$.

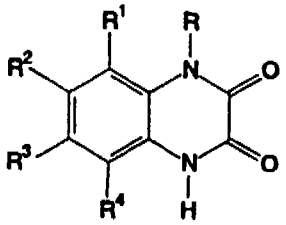
Kuvio 8 esittää graafisesti NDMQX:n kroonisen (8 päivää) vaikutuksen morfiinin aiheuttamaan kipuärsykkeen lievitykseen (antinosiseptioon) formaliinitestissä.

Kuvio 9 esittää graafisesti NDMQX:n vaikutuksen aivokuoren ja kuorenalaiseen infarktitilavuuteen.

Kuvio 10 esittää graafisesti NMCQX:n vaikutuksen aivokuoren ja kuorenalaiseen infarktitilavuuteen.

Edullisten suoritusmuotojen kuvaus

Tämä keksintö liittyy yhdisteisiin, joilla on suuri affiniteetti glysiinin sitoutumispaikkaan ja kyky ylittää veri-aivoeste suurina pitoisuuksina ilman PCP-sivuvaikutuksia. Sellaisia yhdisteitä ovat muun muassa alkyyli-, atsido-, alkoksi- ja fluorisubstituoidut 1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dionit, jotka ovat erittäin selektiivisiä NMDA-reseptorin glysiinisitoutumispaikan kilpailevia antagonisteja. Tietyillä tämän keksinnön 1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioneilla on seuraava kaava *I*:

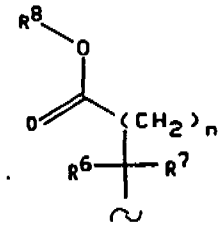


I

tai sen tautomeeri;

jossa kaavassa

R on vety, hydroksi, amino, $-CH_2CONHAr$, $-NHCONHAr$, $-NHCOCH_2Ar$, $-COCH_2Ar$, jossa Ar on aryyliryhmä tai radikaali, jonka kaava on:



II

jossa R^6 on vety, kevyt alkyyli, jossa on 1 - 6 hiiliatomia, tai aryyli; R^7 on vety tai kevyt alkyyli, jossa on 1 - 7 hiiliatomia; n on kokonaisluku 0 - 5; ja R^8 on vety, C_{1-6}-alkyyli tai aralkyyli;

R^1, R^2, R^3 ja R^4 valitaan on toisistaan riippumatta ryhmästä, jossa on vety, hydroksi, asyloksi, aralkoksi, amino, alkanoyyliamino, halogeeni, halogeenialkyyli, nitro, alkyyli, alkoksi, karboksi, alkanoyyli, tioalkyyli, alkoksialkyyli, aryloksialkyyli, aryylialkyyli, alkenyyli, alkynyyli, aryylialkenyyli, aryylialkynyyli, syano, syanometyyli, disyanometyyli, syanoamino, disyanoamino tai atsido;

tai jossa R^1 ja R^2, R^2 ja R^3, tai R^3 ja R^4 muodostavat fuusioituneen 5- tai 6-atomisen hiilisyklisen, heterosyklisen, aromaattisen tai heteroaromaattisen renkaan;

sillä edellytyksellä, että vähintään yksi R^1-R^4-ryhmistä on alkyyli, alkoksi, hydroksi tai atsido, tai R^1 on syano, tai R^1 ja R^2, R^2 ja R^3, tai R^3 ja R^4 muodostavat fuusioituneen 5-

tai 6-atomisen hiilisyklisen, heterosyklisen, aromaattisen tai heteroaromaattisen renkaan.

Tulee tietysti ymmärtää, että R^1-R^4-ryhmät voivat olla samanlaisia tai erilaisia.

Kaavan *I* suojaamissa edullisissa yhdisteissä R^1 on alkyyli, atsido, alkoksi, hydroksi, halogeenialkyyli, halogeeni, nitro, syano tai alkanoyyliamino; R^2 on alkyyli, atsido, alkoksi, aralkoksi, syano, halogeenialkyyli, halogeeni, hydroksi tai nitro; R^3 on alkyyli, atsido, alkoksi, syano, halogeeni, halogeenialkyyli tai hydroksi; ja R^4 on alkyyli, atsido, alkoksi, syano, hydroksi tai vety; mutta vähintään yksi R^1-R^4-ryhmistä on alkyyli, alkoksi, hydroksi tai atsido, tai R^1 on syano. Erityisen edullisia yhdisteitä ovat ne, joissa R^1 on alkyyli, atsido, alkoksi, syano, hydroksi tai nitro; R^2 on alkyyli, atsido, alkoksi, aralkoksi, syano, hydroksi tai halogeeni; R^3 on alkyyli, atsido, alkoksi, halogeeni, syano, hydroksi tai halogeenialkyyli; ja R^4 on alkyyli, alkoksi, atsido, syano, hydroksi tai vety; mutta joissa vähintään yksi R^1-R^4-ryhmistä on alkyyli, alkoksi, hydroksi tai atsido, tai R^1 on syano. Yleensä edullisimmissa yhdisteissä R^4-asema on substituoitu vedyllä tai fluorilla, kun R on joku muu kuin vety. Kun R on vety, edullisimmat yhdisteet ovat sellaisia, joissa R^4 on vety tai fluori ja R^1-R^3 ovat muita kuin vetyjä.

Muissa edullisissa yhdisteissä 1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni-renkaan 6-asema on substituoitu aryylialkyyli-, aryylialkenyyli-, aryylialkynyyli- tai aryloksialkyyli-ryhmällä. Sellaisilla yhdisteillä odotetaan olevan suurempi lipofiilisyys ja siten kyky ylittää veriaivoeste. Sellaisten yhdisteiden odotetaan myös sitoutuvan edullisemmin hypoteettiseen hydrofoobiseen sitoutumistaskuun, joka voi olla kello 10 asemassa 1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni-renkaaseen nähden. Vaihtoehtoisesti pitkäketjuinen alkanoyyliamido-ryhmä (asyyliaminoryhmä) voi olla renkaan 5-asemassa vuorovaikuttaakseen tämän sitoutumistaskun kanssa.

Kun 1,4-dihydrokinoksaaliini-2,3-dioni on substituoitu kaavan *II* mukaisella radikaalilla, voi radikaali olla C_{2-7}-karboksialkyyliryhmä, mukaan lukien karboksimetyyli, 2-karboksietyyli, 3-karboksipropyyli, 4-karboksibutyyli, 5-karboksipentyyli, 6-karboksiheksyyli, 1-karboksietyyli, 1-karboksipropyyli, 1-karboksibutyyli, 1-karboksipentyyli, 1-karboksiheksyyli, 2-karboksipropyyli, 2-karboksibutyyli, 2-karboksipentyyli, 2-karboksiheksyyli, 3-karboksibutyyli, 3-karboksipentyyli, 3-karboksiheksyyli, 5-karboksipentyyli, 5-karboksiheksyyli ja vastaavat.

Tyypillisiä kaavan *II* mukaisia C_{8-12}-karboksiaralkyyli-ryhmiä ovat 1-aryyli-2-karboksietyyli-1-aryyli-3-karboksipropyyli, 1-aryyli-4-karboksibutyyli, 1-aryyli-5-karboksipentyyli, 1-aryyli-6-karboksiheksyyli, 1-aryyli-1-karboksietyyli, 1-aryyli-1-karboksipropyyli, 1-aryyli-1-karboksibutyyli, 1-aryyli-1-karboksipentyyli, 1-aryyli-1-karboksiheksyyli, 1-aryyli-2-karboksipropyyli, 1-aryyli-2-karboksibutyyli, 1-aryyli-2-karboksipentyyli, 1-aryyli-2-karboksiheksyyli, 1-aryyli-3-karboksibutyyli, 1-aryyli-3-karboksipentyyli, 1-aryyli-3-karboksiheksyyli, 1-aryyli-5-karboksipentyyli, 1-aryyli-5-karboksiheksyyli, 2-aryyli-2-karboksietyyli, 2-aryyli-3-karboksipropyyli, 2-aryyli-4-karboksibutyyli, 2-aryyli-5-karboksipentyyli, 2-aryyli-6-karboksiheksyyli, 2-aryyli-1-karboksietyyli, 2-aryyli-1-karboksipropyyli, 2-aryyli-1-karboksibutyyli, 2-aryyli-1-karboksipentyyli, 2-aryyli-1-karboksiheksyyli, 2-aryyli-2-karboksipropyyli, 2-aryyli-2-karboksibutyyli, 2-aryyli-2-karboksipentyyli, 2-aryyli-2-karboksiheksyyli, 2-aryyli-3-karboksibutyyli, 2-aryyli-3-karboksipentyyli, 2-aryyli-3-karboksiheksyyli, 2-aryyli-5-karboksipentyyli, 2-aryyli-5-karboksiheksyyli, ja vastaavat.

Tyypillisiä C_{1-6}-alkyyliryhmiä ovat metyyli, etyyli, propyyli, isopropyyli, butyyli, isobutyyli, *sec*-butyyli, *tert.*-butyyli, pentyyli, 2-pentyyli, 3-pentyyli, neopentyyli, heksyyli, 2-heksyyli, 3-heksyyli, 2-metyyli-1-pentyyli, 3-metyyli-1-pentyyli, 4-metyyli-1-pentyyli ja vastaavat.

Tyypillisiä alkoksi-ryhmiä on happi susbtituoituna millä tahansa yllä mainituista C_{1-6}-alkyyliryhmistä.

Tyypillisiä tioalkyyliryhmiä ovat ryhmät, jossa rikki on substituoituna millä tahansa yllä mainituista C_{1-6}-alkyyliryhmistä.

Tyypillisiin alkoksialkyyliryhmiin kuuluvat mitkä tahansa edellä mainituista alkyyliryhmistä substituoituina alkoksiryhmällä kuten metoksimetyylillä, etoksimetyylillä, propoksimetyylillä, butoksimetyyli, pentoksimetyylillä, heksoimetyyli, metoksietyyli, metoksipropyyli, metoksibutyyli, metoksipentyyli, metoksiheksyyli ja vastaavat.

Edullisia aryyliryhmiä ovat C_{6-14}-aryyliryhmät ja tyypillisesti ne ovat fenyyli-, naftyyli-, fluorenyyli-, fenantryyli- ja antrasyyliryhmiä.

Tyypillisiä aralkoksiryhmiä ovat edellä mainitut alkoksiryhmät substituoituina yhdellä tai useammalla edellä mainituista aryyliryhmistä, esim. 3-fenyylipropoksi, 2-fenyylietoksi ja vastaavat.

Tyypillisiä aryloksialkyyliryhmiä ovat mitkä tahansa edellä mainituista alkyyliryhmistä substituoituina aryloksiryhmällä kuten fenoksimetyyli, fenoksietyyli, fenoksipropyyli, fenoksibutyyli, fenoksipentyyli, fenoksiheksyyli ja vastaavat.

Tyypillisiä aryylialkyyliryhmiä ovat mitkä tahansa edellä mainituista C_{1-6}-alkyyliryhmistä substituoituina millä tahansa C_{6-14}-aryyliryhmistä, mukaan lukien $Ph(CH_2)_n$-ryhmä, jossa n on 1 - 6, esimerkiksi bentsyyli-, 2-fenetyyli-, 3-fenyylipropyyli-, 2-fenyylipropyyli-, 4-fenyylibutyyli, 5-fenyylipentyyli- ja 6-fenyyliheksyyliryhmiä.

Tyypillisiä C_{2-6}-alkenyyliryhmiä ovat etenyyli-, 2-propenyyli-, isopropenyyli-, 2-butenyyli-, 3-butenyyli-, 4-pentenyyli-, 3-pentenyyli-, 2-pentenyyli-, 5-heksenyyli-, 4-heksenyyli-, 3-heksenyyli- ja 2-heksenyyliryhmät.

Tyypillisiä C_{2-6}-alkynyyliryhmiä ovat etynyyli-, 2-propynyyli-, 3-butynyyli-, 4-pentynyyli-, 3-pentynyyli-, 2-pentynyyli-, 5-heksynyyli-, 4-heksynyyli-, 3-heksynyyli- ja 2-heksynyyliryhmät.

Tyypillisiä aryylialkenyyliryhmiä ovat mitkä tahansa edellä mainitut C_{2-6}-alkenyyliryhmät substituoituina millä tahansa edellä mainituista C_{6-14}-aryyliryhmistä, esim. 2-fenyylietenyyli-, 3-fenyyli-2-propenyyli-, 2-fenyyli-isopropenyyli-, 4-fenyyli-2-butenyyli-, 4-fenyyli-3-butenyyli-, 5-fenyyli-4-pentenyyli-, 5-fenyyli-3-pentenyyli-, 5-fenyyli-2-pentenyyli-, 6-fenyyli-5-heksenyyli-, 6-fenyyli-4-heksenyyli-, 6-fenyyli-3-heksenyyli- ja 6-fenyyli-2-heksenyyliryhmät.

Tyypillisiä aryylialkynyyliryhmiä ovat mitkä tahansa edellä mainituista C_{2-6}-alkynyyliryhmistä substituoituina millä tahansa edellä mainituista C_{6-14}-aryyliryhmistä, esim. 2-fenyylietynyyli-, 2-fenyyli-2-propynyyli-, 4-fenyyli-2-butynyyli-, 4-fenyyli-3-butynyyli-, 5-fenyyli-4-pentynyyli-, , 5-fenyyli-3-pentynyyli-, 5-fenyyli-2-pentynyyli-, 6-fenyyli-5-heksynyyli-, 6-fenyyli-4-heksynyyli-, 6-fenyyli-3-heksynyyli- ja 6-fenyyli-2-heksynyyliryhmät.

Tyypillisiä halogeeniryhmiä ovat fluori, kloori, bromi ja jodi.

Tyypillisiä halogeenialkyyliryhmiä ovat C_{1-6}-alkyyliryhmät substituoituna yhdellä tai useammalla fluori-, kloori-, bromi- tai jodiatomeilla, esim. fluorimetyyli-, difluorimetyyli-, trifluorimetyyli-, pentafluorietyyli-, 1,1-difluorietyyli- ja trikloorimetyyliryhmät.

Tyypillisiä aminoryhmiä ovat $-NH_2$, NHR^9 ja NR^9R^{10}, joissa sekä R^9 että R^{10} on yksi edellä mainituista C_{1-6}-alkyyliryhmistä. Aminoryhmä voi olla myös substituoitu yhdellä (-NHCN)- tai kahdella $(-N(CN)_2)$-syanoryhmällä. Näitä ryhmiä voidaan valmistaa vastaavan amiinin reaktiolla syanogeenibromidilla.

Tyypillisiä alkanoyyliryhmiä ovat $C_{1-5}C(O)$-alkanoyyliryhmät, esim. asetyyli-, propionyyli-, butanoyyli-, pentanoyyli- ja heksanoyyliryhmät, tai aryylialkanoyyliryhmä, esim. $C_{1-5}C(O)$-alkanoyyliryhmä substituoituna millä tahansa edellä mainituista aryyliryhmistä.

Tässä yhteydessä käytettynä termillä "asyloksi" tarkoitetaan alkanoyyliryhmää, joka on kiinnittynyt renkaaseen happiatomin kautta, esim. asetyylioksi-, 2-fenyyliasetyylioksi- ja vastaavat ryhmät.

Tyypillisiä alkanoyyliaminoryhmiä on aminoryhmä substituoituna yhdellä $C_{1-5}C(O)$-alkanoyyliryhmistä.

Tyypillisiä fuusioituneita rengassysteemejä, joissa R^1 ja R^2, R_2 ja R^3, tai R^3 ja R^4 on liitetty yhteen 5- tai 6-atomisen karboksykloalkyyliryhmäksi, heterosykliseksi, aromaattiseksi tai heteroaromaattiseksi ryhmäksi, joita ovat bentso[g]kinoksaliini, syklohekso[g]kinoksaliini, syklopento-[g]kinoksaliini, tieno[g]kinoksaliini, tetrahydrotieno[g]kinoksaliini, furo[g]kinoksaliini, tetrahydrofuro[g]kinoksaliini, pyrano[g]kinoksaliini, pyrrolo[g]kinoksaliini, pyrido[g]kinoksaliini, pyratsiino[g]kinoksaliini, pyridatsino[g]kinoksaliini, 6,7-metyleenidioksi-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni ja 6,7-syklinen karbonaatti-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni. Heterosyklisessä fuusioituneessa renkaassa voi olla karbonyyliryhmä, joka muodostaa fuusioituneen laktoni- tai laktaamiryhmän.

Erityisen edullisia tämän keksinnön substituoituja 1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioneja ovat muun muassa 6,7-dimetyyli-5-nitro-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni; 6,7-dimetyyli-1,4-

dihydrokinoksaliini-2,3-dioni; 7-metyyli-5-nitro-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni; 7-fluori-6-metyyli-5-nitro-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni; 5,7-dimetyyli-6-nitro-1,4-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni; 6,7-dietyyli-5-nitro-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni; 7-kloori-6-metyyli-5-nitro-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni; 7-bromi-6-metyyli-5-nitro-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni; 6-fluori-7-metyyli-5-nitro-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni; 6-kloori-7-metyyli-5-nitro-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni; 6,7-dimetoksi-5-nitro-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni; 6-atsido-5,7-difluori-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni; 6-atsido-5,7-dikloori-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni; 5-atsido-6,7-dikloori-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni; 6,7-dimetyyli-5-trifluorimetyyli-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni; 5,7-dimetyyli-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni; 7-metyyli-5-trifluorimetyyli-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni; 6,7-dietyyli-5-trifluorimetyyli-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni; 5,7-dietyyli-6-trifluorimetyyli-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni; 6-bromi-7-metyyli-5-nitro-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni; 7-jodi-6-metyyli-5-nitro-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni; 6-jodi-7-metyyli-5-nitro-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni; 7-fluori-6-metoksi-5-nitro-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni; 7-kloori-6-metoksi-5-nitro-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni; 6-atsido-7-fluori-5-nitro-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni; 7-metyyli-5,6-dinitro-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni; 6-metyyli-5,7-dinitro-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni; 6,7-dikloori-5-syano-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni; 6,7-difluori-5-syano-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni; 1,4-dihydrobentso[g]kinoksaliini-2,3-dioni; 1,4-dihydro-5-nitrobentso[g]kinoksaliini-2,3-dioni; 1,4-dihydro-5-nitrosyklopento[g]kinoksaliini-2,3-dioni; 1,4-dihydro-5-nitrosyklohekso[g]kinoksaliini-2,3-dioni; 1,4-dihydro-5-nitropyrrolo[2,3-g]kinoksaliini-2,3-dioni; 1,4-dihydro-5-nitropyrrolo[3,2-g]kinoksaliini-2,3-dioni; 5,6,7,8-tetrafluori-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni; 5-kloori-7-fluori-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni; 5-bromi-7-fluori-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni; 4-karboksimetyyli-5-

kloori-6,7-difluori-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni; 4-karboksimetyyli-5-bromi-6,7-difluori-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni; 4-karboksimetyyli-5,6,7,8-tetrafluori-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni; 4-karboksimetyyli-5-kloori-7-fluori-1,4-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni; 4-karboksimetyyli-5-bromi-7-fluori-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni; 7-fluori-6-nitro-5-trifluorimetyyli-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni; 6-amino-67-fluori-5-trifluorimetyyli-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni; 7-fluori-5-trifluorimetyyli-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni; 6,7,8-trifluori-5-nitro-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni; 6,7,8-trifluori-5-kloori-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni; 6,7,8-trifluori-5-bromi-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni; 6,7,8-trifluori-5-jodi-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni; 6,7,8-trifluori-5-trifluorimetyyli-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni; 5,6,7-trifluori-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni; 6-kloori-5,7-difluori-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni; 7-kloori-6,8-difluori-5-nitro-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni; 7-kloori-6,8-difluori-5-trifluorimetyyli-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni; 7-kloori-5,6-difluori-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni; 6-kloori-7,8-difluori-5-nitro-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni; 6-kloori-7,8-difluori-5-trifluorimetyyli. 1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni; 6,7-dikloori-8-fluori-5-nitro-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni; 6,7-dikloori-8-fluori-5-trifluorimetyyli-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni; 5,7-bis(trifluorimetyyli)-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni; 7-trifluorimetyyli-5-nitro-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni; 7-kloori-5-nitro-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni; 7-fluori-5-nitro-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni; 6-fluori-5,7-bis(trifluorimetyyli)-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni; 6-kloori-5,7-bis(trifluorimetyyli)-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni; 6-nitro-5,7-bis(trifluorimetyyli)-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni; 6-bromi-5,7-bis(trifluorimetyyli-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni; 6-jodi-5,7-bis(trifluorimetyyli)-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni; 6,7-bis(trifluorimetyyli)-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni; 5-nitro-6,7-bis(trifluorimetyyli-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-

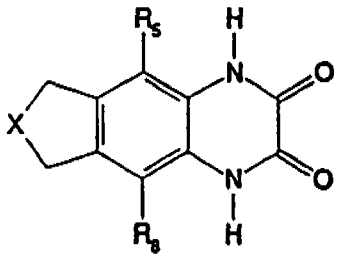
dioni; 5-kloori-6,7-bis(trifluorimetyyli)-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni; 5-fluori-6,7-bis(trifluorimetyyli)-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni; 5-bromi-6,7-bis(trifluorimetyyli)-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni; 5-jodi-6,7-bis(trifluorimetyyli)-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni; 5,6,7-tris(trifluorimetyyli)-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni; 6,7-dikloori-5-trifluorimetyyli-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni; 6,7-difluori-5-trifluorimetyyli-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni; 7-kloori-6-bromi-5-nitro-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni; 7-kloori-6-fluori-5-nitro-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni; 6-kloori-7-fluori-5-nitro-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni; 7-bromi-6-fluori-5-nitro-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni; 6-bromi-7-fluori-5-nitro-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni; 7-fluori-6-jodi-5-nitro-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni; 6-fluori-7-jodi-5-nitro-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni; 7-fluori-6-trifluorimetyyli-5-nitro-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni; 6-fluori-7-trifluorimetyyli-5-nitro-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni; 7-kloori-6-trifluorimetyyli-5-nitro-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni; 6-bromi-7-trifluorimetyyli-5-nitro-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni; 7-bromi-6-trifluorimetyyli-5-nitro-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni; 6-jodi-7-trifluorimetyyli-5-nitro-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni; 7-jodi-6-trifluorimetyyli-5-nitro-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni; 6-fluori-5,7-dinitro-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni; 7-kloori-5,6-dinitro-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni; 6-kloori-5,7-dinitro-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni; 7-bromi-5,7-dinitro-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni; 7-jodi-5,6-dinitro-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni; 6-jodi-5,7-dinitro-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni; 7-trifluorimetyyli-5,6-dinitro-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni; 6-trifluorimetyyli-5,7-dinitro-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni; 5-amino-7-kloori-6-metyyli-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni; 7-kloori-6-etyyli-5-nitro-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni; 5-kloori-8-metyyli-6,7-dinitro-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni; 6-kloori-7-etyyli-5-nitro-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni; 6-kloori-7-etyyli-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni; 6-kloori-7-etyyli-5-nitro-

1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni; 7-kloori-6-etyylitio-5-nitro-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni; 5-hydroksi-6,7-dimetoksi-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni; 5-asetyloksi-6,7-dimetoksi-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni; 5-(2-fenyyliasetyloksi)-6,7-dimetoksi-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni; 5,6,7-trihydroksi-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni; 6,7-dihydroksi-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni; 6-(n-butoksi)-7-fluori-5-nitro-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni; ja 7-fluori-5-nitro-6-(3-fenyylipropoksi)-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni.

Tämä keksintö liittyy osittain siihen havaintoon, että tietyillä alkyylisubstituoiduilla kinoksaliini-2,3-dioneilla on suuri affiniteetti glysiini-/NMDA-reseptoriin ja yllättävän korkea *in vivo*-aktiivisuus antikonvulsiiveina hiirien maksimisähkösokkihalvaus-kokeissa (MES engl. *maximum electroshock seizure*). Nämä yhdisteet pystyvät siten ylittämään veri-aivoesteen suurina pitoisuuksina. 6,7-dimetyyli-5-nitro-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dionilla (NDMQX) havaittiin olevan suuri affiniteetti glysiini-/NMDA-reseptoriin K_i-arvolla 43 nM, mikä on noin 10 kertaa vähemmän aktiivinen kuin 6,7-dikloori-5-nitro-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni. NDMQX:lla havaittiin kuitenkin olevan yllättävän korkea aktiivisuus *in vivo*. Sen ED_{50}-arvo antikonvulsiivina hiirien MES-kokeessa on 4-5 mg/kg. Vertailun vuoksi kerrottakoon, että 6,7-dikloori-5-nitro-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dionin ED_{50}-arvo antikonvulsiivina hiirien MES-kokeessa on 4-5 mg/kg. NDMQX näyttää siten ylittävän veri-aivoesteen 10 kertaa parempi kuin 6,7-dikloori-5-nitro-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni.

Koska NDMQX:n metyyliryhmät voitaisiin korvata muilla, pitemmillä alkyyliryhmillä kuten etyylillä tai propyylillä tai aryylialkyyliryhmillä, kuten bentsyylillä tai fenetyylillä, kuten myös eetteriryhmiä sisältävillä pitemmillä alkyyliketjuilla, kuten metoksietyylillä, joiden ryhmien oletetaan lisäävän molekyylin lipofiilisyyttä ja kykyä ylittää veriaivoeste, on edellä mainittu keksintö johtanut uuteen ryhmään kinoksaliinidioneja (QX), joilla on hyvät *in vivo*-ominaisuu-

det. 6- ja 7-asemissa olevat R^2- ja R^3-ryhmät, vastaavassa järjestyksessä, voidaan liittää rengassysteemiin kaavassa *VIII* esitetyn mukaisesti. Se voi olla tyydyttynyt systeemi ja sisältää heteroatomeja tai tyydyttymätön systeemi kuten 1,4-dihydrobentso[g]kinoksaliini-2,3-dioni (*IX*).

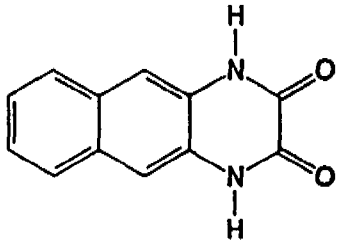


(*VIII*)

X = O, NH, S, CH_2, CH_2-CH_2, N-CN

R5 = H, NO_2, halogeenialkyyli, halogeeni, alkyyli

R8 = H, NO_2, halogeenialkyyli, halogeeni, alkyyli



(*IX*)

Toinen kiinnostava yhdisteryhmä on sellainen, jonka yhdisteissä substituentteina on sekä alkyyli- että halogeenisubstituentit, kuten 6-kloori-7-metyyli-5-nitro-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni, 7-fluori-6-metyyli-5-nitro-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni, 7-kloori-6-metyyli-5-nitro-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni, joiden oletetaan yhdistävän 6,7-dikloori-5-nitro-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dionin, 6,7-dimetyyli-5-nitro-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dionin ja 6,7-dimetyyli-5-nitro-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dionin parhaat ominaisuudet ja joilla on suuri affiniteetti glysiini-/NMDA-reseptoriin ja jotka kykenevät ylittämään veriaivoesteen suurina pitoisuuksina. 7-kloori-6-metyyli-5-nitro-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dionilla (NMCQX) on havaittu olevan suuri affiniteetti glysiini-/NMDA-reseptoriin K_i-arvolla 5 nM, mikä on suurinpiirtein yhtä hyvä kuin 6,7-

dikloori-5-nitro-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni. NMCQX:n on kuitenkin havaittu olevan yllättävän korkea aktiivisuus *in vivo*. Sen ED_{50}-arvo antikonvulsiivina hiirien MES-kokeessa on 1 mg/kg, joka on noin 4 - 5 parempi kuin 6,7-dikloori-5-nitro-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dionin arvo (ED_{50} = 4 - 5 mg/kg). 7-fluori-6-metyyli-5-nitro-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dionilla (K_i = 53 nM, ED_{50} = 2 mg/kg) ja 6-kloori-7-metyyli-5-nitro-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dionilla (K_i = 27 nM, ED_{50} = 2 mg/kg) on myös havaittu olevan suuri affiniteetti glysiini-/NMDA-reseptoriin ja yllättävän korkea aktiivisuus *in vivo*.

Tämä keksintö liittyy myös siihen havaintoon, että tietyillä fluorisubstituoiduilla 1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioneilla on suuri affiniteetti glysiini-/NMDA-reseptoriin ja yllättävän korkea aktiivisuus elimistössä antikonvulsiiveina hiirien MES-kokeissa (taulukko III). Siksi nämä yhdisteet kykenevät ylittämään veri-aivoesteen suurina pitoisuuksina. 6,7-difluori-5-nitro-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dionilla on havaittu olevan suuri affiniteetti glysiini-/NMDA-reseptoriin K_i-arvolla 87 nM, joka on yli 20 kertaa vähemmän aktiivinen kuin 6,7-dikloori-5-nitro-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni (K_i = 3,3 nM). 6,7-difluori-5-nitro-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dionilla on kuitenkin havaittu olevan yllättävän korkea *in vivo*-aktiivisuus. Sen ED_{50}-arvo antikonvulsiivina on 0,7 - 0,8 mg/kg hiirien MES-kokeessa. Vertailun vuoksi kerrottakoon, että 6,7-dikloori-5-nitro-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dionin ED_{50}-arvo antikonvulsiivina on 4 - 5 mg/kg hiirien MES-kokeessa. Tämä tarkoittaa, että 6,7-difluori-5-nitro-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni voisi olla noin 100 kertaa parempi kyky ylittää veri-aivoeste kuin 6,7-dikloori-5-nitro-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dionilla.

Yleensä yhdisteissä, joita käytetään eläinten hoitoon, ei tulisi olla fluoria 6- tai 8-asemissa eikä elektroneja puoleensa vetävää ryhmää kuten nitroryhmää, 5-asemassa, koska sellaiset yhdisteet ovat epästabiileja. Kuten tässä yhteydessä käy esille, korvautuu sellaisten yhdisteiden

fluoriryhmä helposti tavanomaisilla nukleofiileilla. Siten 6,7-difluori-5-nitro-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dionia ei tulisi antaa eläimille, vaikka sillä onkin hyvä *in vivo*-aktiivisuus, koska se voi reagoida biologisten nukleofiilien kanssa.

7-kloori-6,8-difluori-5-nitro-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dionilla havaittiin olevan suuri affiniteetti glysiini-/NMDA-reseptoriin K_i-arvolla 170 nM, joka on noin 50 kertaa vähemmän aktiivinen kuin 6,7-dikloori-5-nitro-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dionin arvo. 7-kloori-6,8-difluori-5-nitro-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dionilla havaittiin myös yllättävän korkea aktiivisuus *in vivo*. Sen ED_{50}-arvo antikonvulsiivina hiirien MES-kokeessa on 2 - 3 mg/kg. Vertailun vuoksi kerrottakoon, että 6,7-dikloori-5-nitro-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dionin ED_{50}-arvo antikonvulsiivina hiirien MES-kokeessa on 4 - 5 mg/kg. Tämä tarkoittaa, että 7-kloori-6,8-difluori-5-nitro-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dionilla voisi olla noin 100 kertaa parempi kyky ylittää veriaivoeste kuin 6,7-dikloori-5-nitro-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dionilla.

Tässä yhteydessä esitetyt yhdisteet ovat aktiivisia hoidettaessa tai ennaltaehkäistäessä hermostovauriota, hermostorappeumasairauksia sekä kroonista kipua ja ne ovat aktiivisia kouristuslääkkeinä (antikonvulsiiveina) ja anestesian aikaansaamisessa ilman haitallisia sivuvaikutuksia, joita aiheuttaa ei-selektiivinen sitoutuminen muihin reseptoreihin, erityisesti kainaattiin, AMPA:n ja kviskalaattireseptoreihin ja NMDA-reseptoriin liittyviin PCP- sekä glutamaattireseptoreihin. Lisäksi nämä yhdisteet ovat tehokkaita hoidettaessa tai ennaltaehkäistäessä eksitoivien aminohappojen yliaktiivisuuden haitallisia vaikutuksia, esim. sellaisten aminohappojen, jotka liittyvät NMDA-reseptorisysteemiin, salpaamalla glysiinireseptorit ja estämällä ligandiportillisia kationikanavia avautumasta ja päästämästä liiallista Ca^{++}-ionin sisäänvirtausta neuroneihin, kuten tapahtuu iskeemiassa.

Ne hermostorappeumasairaudet, joita voidaan hoitaa esillä olevilla yhdisteillä, ovat Alzheimerin taudin, liikerata-kovettumataudin (amyotrooppinen lateraaliskleroosi), Huntingtonin taudin ja Downin syndrooman joukossa.

Nämä yhdisteet ovat erityisen käyttökelpoisia myös dementiaa aiheuttaviin monihalvauksiin liittyvän hermostovaurion hoidossa ja ennaltaehkäisyssä. Kun potilaan on diagnosoitu kärsivän halvauksesta, voidaan yhdisteitä antaa välittömän iskeemian hoitoon ja uusiutuvista halvauksista mahdollisesti aiheutuvien muiden hermostovaurioiden ennaltaehkäisyyn.

Lisäksi nämä yhdisteet kykenevät ylittämään veriaivoesteen, toisin kuin 6-syano-7-nitro-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni, 6,7-dinitro-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni ja muut 6,7-ddisubstituoidut 1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dionit, jotka eivät pysty ylittämään veriaivoestettä *i.p.* annostelun jälkeen (ks. Turski, L. *et al., J. Pharm. Exp. Ther. 260*: 742-747 (1992)). Ks. myös, Sheardown *et al., Eur. J. Pharmacol. 174*: 197-204 (1989), jotka esittävät, että 5,7-dinitro-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni, 6,7-dinitro-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni ja 6-syano-7-nitro-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni pääsevät huonosti keskushermostojärjestelmään.

Jotta yhdiste alkaisi osoittaa *in vivo*-tehoa ja siten kykyä läpäistä veriaivoeste, tulisi yhdisteen ED_{50}-arvon olla alle noin 100 mg/kg eläimen ruumiinpainoa kohden. Edullisesti tämän keksinnön yhdisteiden ED_{50}-arvo on alle noin 20 mg/kg ja vielä edullisemmin alle noin 10 mg/kg.

Nämä yhdisteet ovat erityisen käyttökelpoisia kirurgian aiheuttamien haitallisten neurologisten jälkiseurauksien hoidossa tai ennaltaehkäisyssä. Esimerkiksi sydämenohitusleikkaus edellyttää sydän-keuhkokoneiden käyttöä, joilla koneilla on taipumusta siirtää ilmakuplia kiertosysteemiin, jotka ilmakuplat voivat sijoittua aivoihin. Sellaisten ilmakuplien

läsnäolo vie hermokudoksilta happea johtaen anoksiaan ja iskeemiaan. 1,4-dihydrokinoksaliinien antaminen ennen tai jälkeen kirurgisen operaation hoitaa tai ennaltaehkäisee tuloksena olevan iskeemian. Edullisessa suoritusmuodossa yhdisteitä annetaan potilaille, joille tehdään kardiopulmonaariohitusleikkaus tai kaulavaltimon endarterektomialeikkaus (engl. *carotid endarterectomy*).

Nämä yhdisteet ovat käyttökelpoisia myös hoidettaessa tai ennaltaehkäistäessä kipua, esim. kroonista kipua. Sellainen krooninen kipu voi johtua kirurgiasta, traumasta, päänsärystä, niveltulehduksesta tai muusta rappeumasairaudesta. Tämän keksinnön yhdisteet ovat erityisen käyttökelpoisia raajan amputoimisesta seuraavan aavekivun hoidossa. Kivunhoitamisen lisäksi keksinnön yhdisteet ovat käyttökelpoisia myös anestesian, sekä yleisen että paikallisen anestesian aikaansaamiseen, esimerkiksi leikkauksen aikana.

Tämän keksinnön yhdisteiden aktiivisuutta mahdollisina glysiiniantagonisteina voidaan testata havainnoimalla 1 µM glysiini-stimuloidun [^{3}H]-MK-801:n sitoutumisen inhibointia rotan tai marsun aivomembraanin homogenaateissa. Mitä tehokkaampi glysiiniantagonisti, sitä vähemmän [^{3}H]-MK-801 voi sitoutua, koska [^{3}H]-MK801:n sitoutumispaikka (PCP-reseptori) on lähestyttävissä vain ionikanavan avautuessa glutamaatin *ja* glysiinin vaikutuksesta (Fletcher, E.L., *et al.*, in *Glycine Neurotransmission*, Otterson, P., *et al.*, (toim.), John Wiley and Sons (1990); Johnson, J.W., *et al.*, *Nature 325*:529 (1987)).

Kinoksaliini-2,3-dionien sitoutumisaffiniteetteja NMDA-reseptorin glysiinipaikoissa arvioitiin elektrofysiologisissa kokeissa joko kloonatuilla rotan NMDA-reseptoreilla, jotka on eristetty Xenopus oosyyteissä, tai ei-NMDA-reseptoreilla, jotka on eristetty kokonaisten rotanaivojen poly(A)$^+$-RNA:lla. K_i-arvot arvioitiin olettamalla, että vallitsi kilpaileva inhibitio, ja analysoimalla membraanieston agonistin vakiopitoisuuksien aiheuttama virtavaste: 1 mM glysiiniä ja

100 mM glutamaattia NMDA-reseptoreilla; 20 mM kaiinihapoa ei-NMDA-reseptoreilla. K_i-arvot arvioitiin NMDA-reseptoreille keskimääräistämällä kolmen alatyypin (NR1A/NR2A, NR1A/NR2B ja NR1A/NR2C) arvot. Katso U.S. Application Serial No. 08/148,259, joka on otsikoitu: Glycine Receptor Antagonists and use thereof, yllä.

Edullisesti keksinnön yhdisteiden sitoutumisafiiniteetti glysiinisitoutumispaikkaan on K_i = noin 10 µM tai alle, edullisemmin 1 µM tai alle, ja vielä edullisemmin, 500 nM tai alle ja veilä edullisemmin 100 nM tai alle ja vielä edullisemmin noin 10 nM tai alle. Myös sellaiset yhdisteet ovat edullisia, jotka sitoutuvat kainaatti- ja AMPA-paikkoihin K_i-arvolla, joka on vähintään 1 µM tai edullisemmin vähintään 10 µM.

Uusien glysiiniantagonistien aktiivisuutta *in vivo* voidaan testata vatsaontelon sisäisen injektion jälkeen käyttäen lukuisia antikonvulsiivitestejä hiirillä (audiogeeninen kohtausmalli DBA-2-hiirillä, pentyleenitetratsolilla aiheutetut kohtaukset hiirillä, NMDA:lla aiheutettu kuolema hiiritllä ja MES hiirillä). Edullisilla yhdisteillä on ataksiasivuvaikutuksia rotorod-ataksiakokeessa yli noin 100 mg/kg annoksilla, edullisesti noin 200 mg/kg annoksilla.

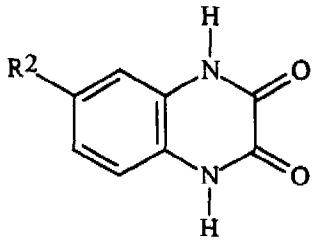
Yhdisteitä voidaan testata myös lääke-erottelukokeissa rotilla, jotka on opetettu erottamaan PCP syljestä. On oletettavaa, että useimmat yhdisteistä eivät sekoitu PCP:iin millään annoksella. Lisäksi odotetaan myös, että mitkään yhdisteistä eivät aiheuta käyttäytymisen kiihottumista hiiren liikeaktiivisuuskokeissa. Odotetaan, että näiden tulosten mukaan tämän keksinnön glysiini-, AMPA-, kainaatti- ja kviskalaattiantagonisteilla ei ole PCP:n kaltaisia käyttäytymissivuvaikutuksia, jotka ovat yleisiä NMDA-kanavasalpaajilla kuten MK-801 ja PCP tai kilpailevilla NMDA-antagonisteilla kuten CGS19755.

Glysiinin ja eksitoivien aminohappoantagonistien oletetaan

myös osoittavan tehokasta aktiivisuutta *in vivo* vatsaontelon sisäisen injektion jälkeen, mikä osoittaisi, että nämä yhdisteet voivat läpäistä veriaivoesteen.

Atsido-substituoituja 1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioneja voidaan käyttää glysiinireseptorin fotoaffiniteettimerkkaukseen. Yllättäen on havaittu, että 6-atsido-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni sitoutuu varsin edullisesti glysiinin sitoutumispaikkaan, verrattuna vastaavaan 6-CF_3, 6-NO_2, 6-F, 6-CN- 6-NH_2 ja substituoimattomat johdannaiset (taulukko I):

Taulukko I

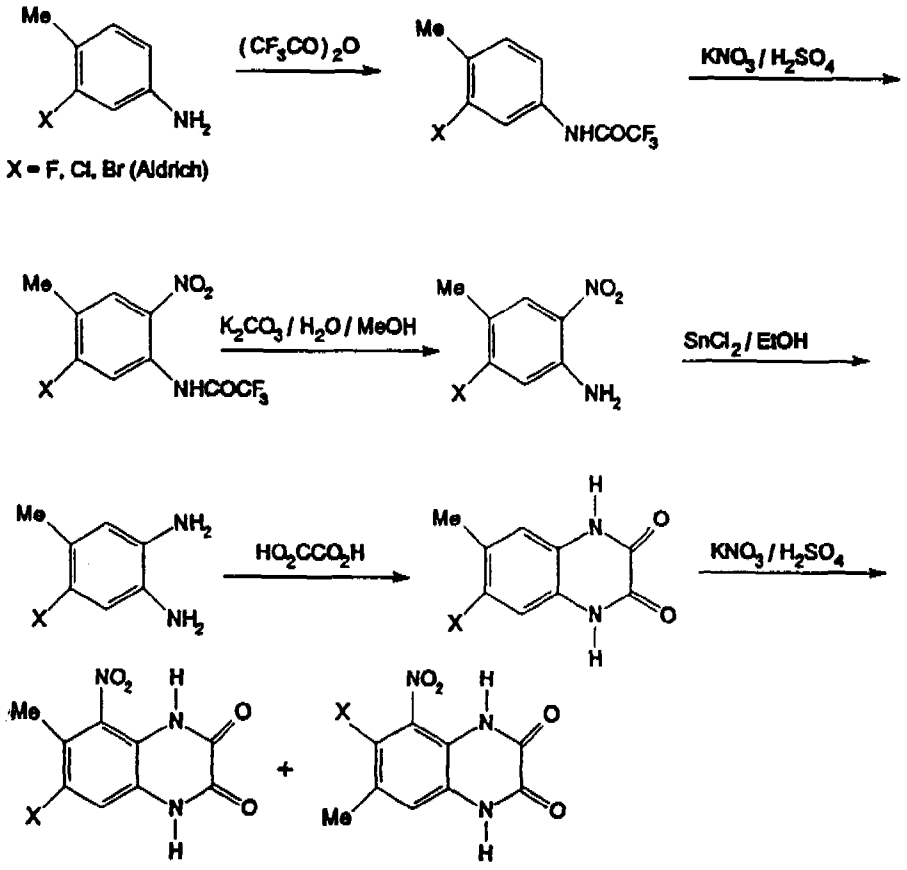


R^2	K_i (nM)
N_3	210
CF_3	360
NO_2	1395
H	2466
F	2880
CN	4889
NH_2	inaktiivinen

Tämän keksinnön yhdisteet valmistetaan seuraavasti. Kuten kaaviossa I on esitetty, isomeerinen 6-halogeeninen-7-metyyli-5-nitro-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni ja 7-halogeeni-6-metyyli-5-nitro-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni; voidaan valmistaa 3-halogeeni-4-metyylianiliinista suojaamalla aminoryhmä esimerkiksi trifluorietikkahappoanhydridillä, jonka jälkeen seuraa orto-nitraus. Aminoryhmää suojaavan ryhmän poistaminen ja orto-nitro-ryhmän pelkistäminen antaa tulokseksi 3-halogeeni-4-

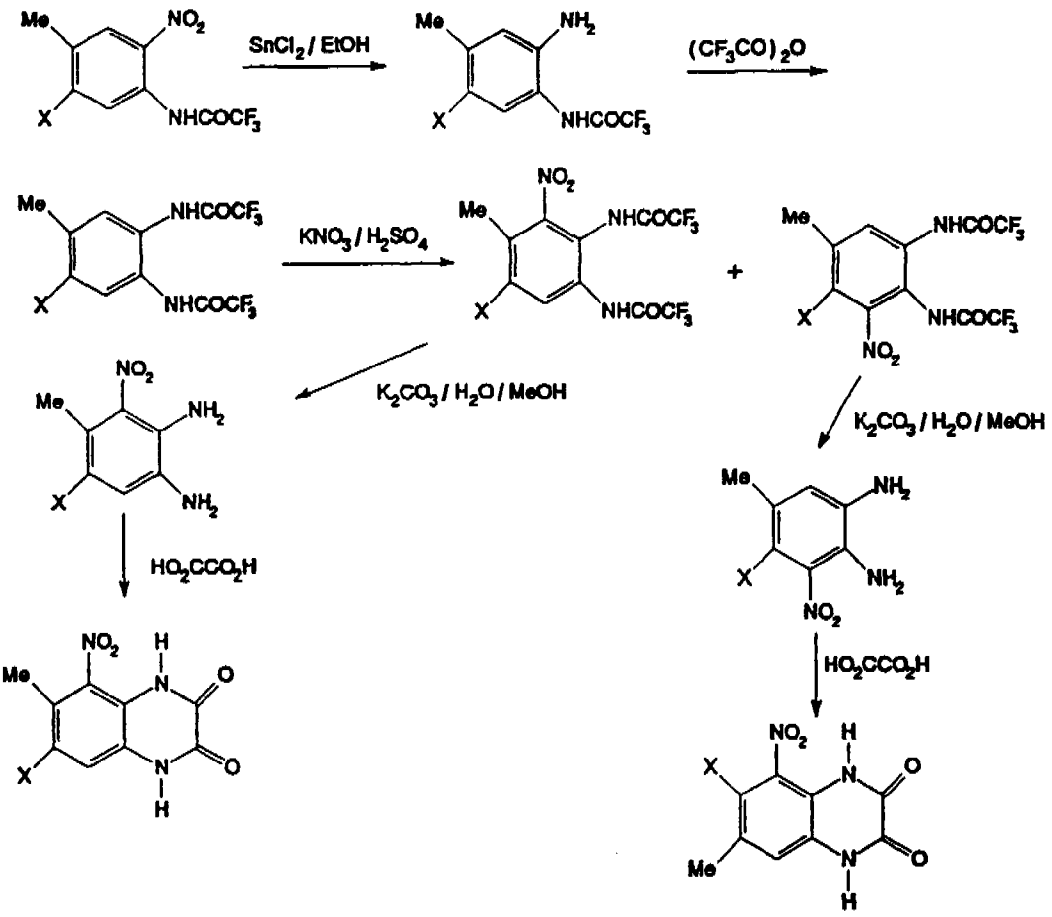
metyyli-1,2-fenyleenidiamiinin. Tämä 1,2-fenyleenidiamiini voidaan sitten kondensoida oksaalihapolla, jotta saadaan 7-halogeeni-6-metyyli-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni. Nitraamalla saada kahden isomeerisen yhdisteen seos.

Kaavio I



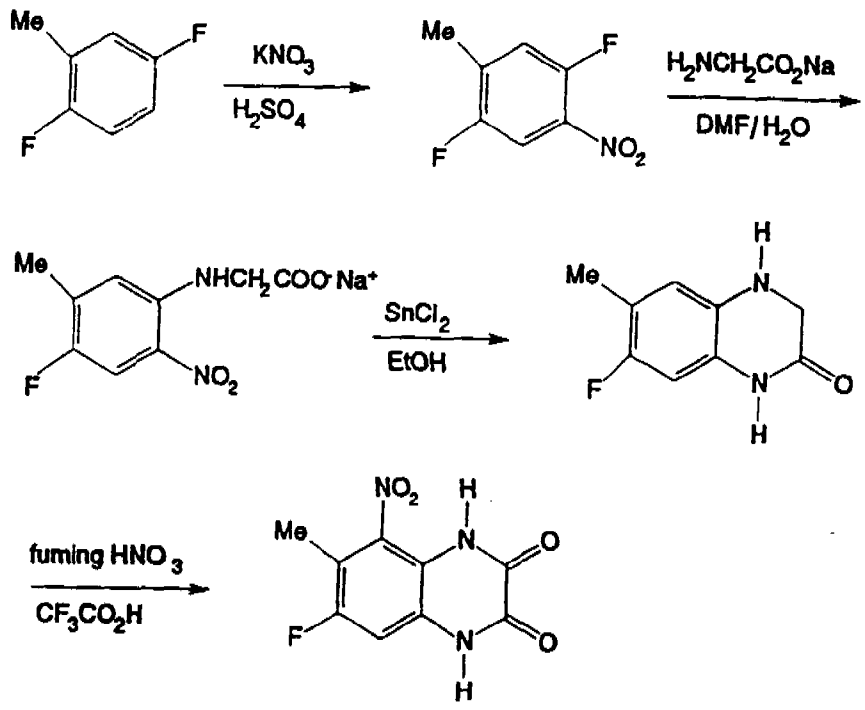
Vaihtoehtoisesti välituotteena saatava trifluoriasetyyli-2-amino-5-halogeeni-4-metyylianilidi voidaan käsitellä edelleen trifluorietikkahappoanhydridillä ja sen jälkeen nitrata, jolloin saadaan kaksi nitroyhdisteen isomeeriä. Suojaavien ryhmien poistaminen, kondensointi oksaalihapolla ja sen jälkeen nitraus antaa tulokseksi isomeerisesti puhtaan 7-halogeeni-6-metyyli-5-nitro-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dionin ja 6-halogeeni-7-metyyli-5-nitro-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dionin. (Katso kaavio II).

Kaavio II



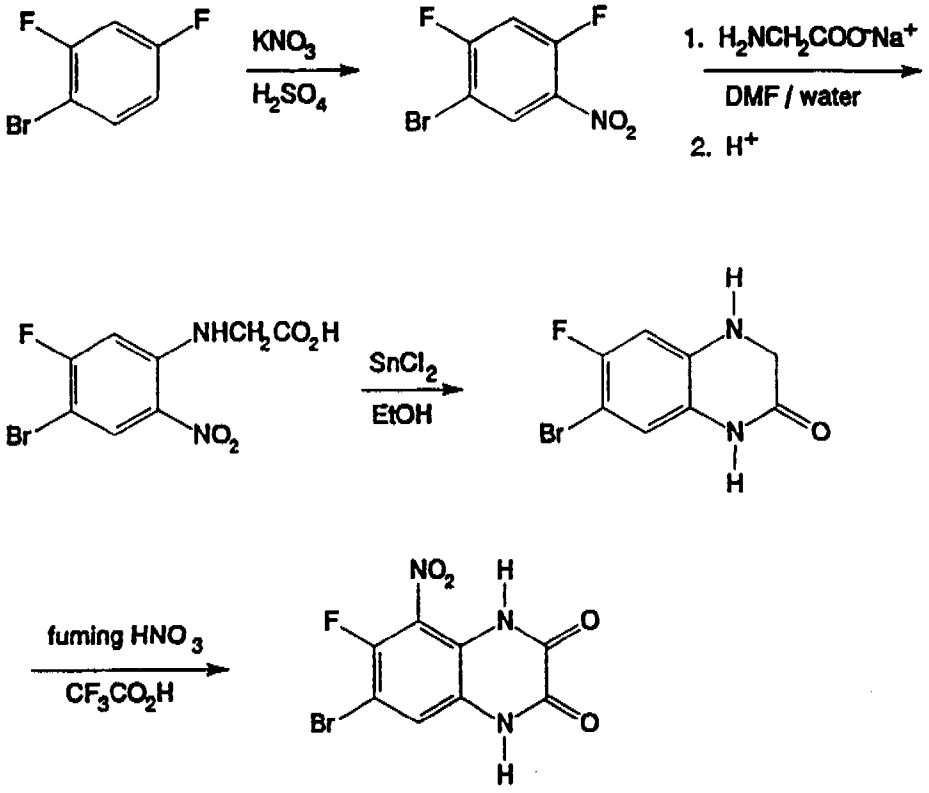
Toinen lähestymistapa perustuu siihen havaintoon, että 3,4-dihydrokinoksaliini-2(1H)-onin nitraus johtaa pääasiassa tuotteeseen, jossa nitro-ryhmä on 5-asemassa. Käsittelemällä esimerkiksi 2,5-difluori-4-nitrotolueenia natriumglysinaatilla saatiin substituoitu aniliini. Nitroryhmä pelkistettiin $SnCl_2$:lla ja tuote syklisoitui spontaanisti, jolloin saatiin 3,4-dihydrokinoksaliini-2(1H)-oni. Se nitrattiin savuavalla HNO_3:lla trifluorietikkahapossa, mikä johti sekä yhdisteen nitraukseen että hapetukseen, jolloin saatiin 7-fluori-6-metyyli-5-nitro-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni yhdessä vaiheessa (kaavio *III*). ^{1}H-NMR-spektristä mitatut F-H-kytkentävakiot vahvistivat, että fluori oli meta-asemassa nitroryhmään nähden.

Kaavio III

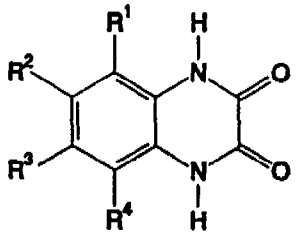


Vastaavasti saatiin käsittelemällä 1-bromi-2,4-difluori-5-nitrobentseeniä natriumglysinaatilla substituoitujen aniliinien seos. Nitroryhmä pelkistettiin $SnCl_2$:lla ja tuote syklisoitiin spontaanisti, jolloin saatiin 3,4-dihydrokinoksaliini-2(1H)-oni. Se nitrattiin HNO_3:lla trifluorietikkahapossa, jolloin tuloksena oli sekä yhdisteen nitraus että hapetus, jolloin saatiin 7-bromi-6-fluori-5-nitro-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni yhdessä vaiheessa (kaavio *IV*). ^{1}H-NMR-spektristä mitatut F-H-kytkentävakiot osoittivat, että fluori oli orto-asemassa nitroryhmään nähden. Vaihtoehtoisesti 1-bromi-2,5-difluori-4-nitrobentseeni voidaan pelkistää, syklisoida ja hapettaa typpihapolla, jolloin saadaan 6-bromi-7-fluori-5-nitro-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni.

Kaavio IV



Keksintö koskee siten myös menetelmää 1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dionin, jonka kaava on:



tai sen tautomeerin valmistamiseksi,
jossa kaavassa

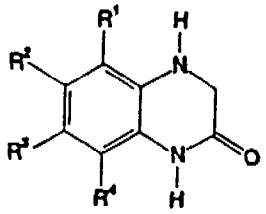
R^1 on nitro;

R^2 on halogeenialkyyli, halogeeni, syano, alkyyli tai alkoksi;

R^3 on halogeenialkyyli, halogeeni, syano, alkyyli tai alkoksi; ja

R^4 on vety;

jossa menetelmässä yhdiste, jonka kaava on:



tai sen tautomeeri,

jossa kaavassa

R^1 on vety;

R^2 on halogeenialkyyli, halogeeni, syano, alkyyli tai alkoksi;

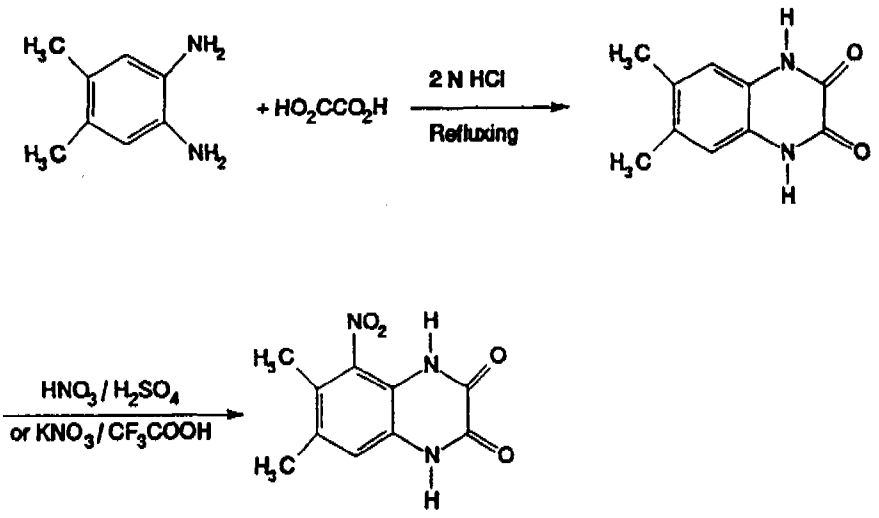
R^3 on halogeenialkyyli, halogeeni, syano, alkyyli tai alkoksi; ja

R^4 on vety;

reagoi savuavan typpihapon kanssa ja siten muodostunut 1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni eristetään. Tähän reaktioon voidaan edullisesti käyttää liuottimena trifluorietikkahappoa. Reaktio tehdään huoneenlämpötilassa kunnes lähtöaine on kulunut loppuun (esim. yön yli).

6,7-dimetyyli-5-nitro-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dionia (NDMQX) voidaan valmistaa kondensoimalla 4,5-dimetyyli-1,2-fenyleenidiamiinia oksaalihapolla, jonka jälkeen seuraa nitraus (HNO_3/H_2SO_4 tai KNO_3/CF_3CO_2H). Havaittiin, että nitraus trifluorietikkahapossa antoi tulokseksi puhtaamman tuotteen kuin rikkihapossa (katso kaavio *V*).

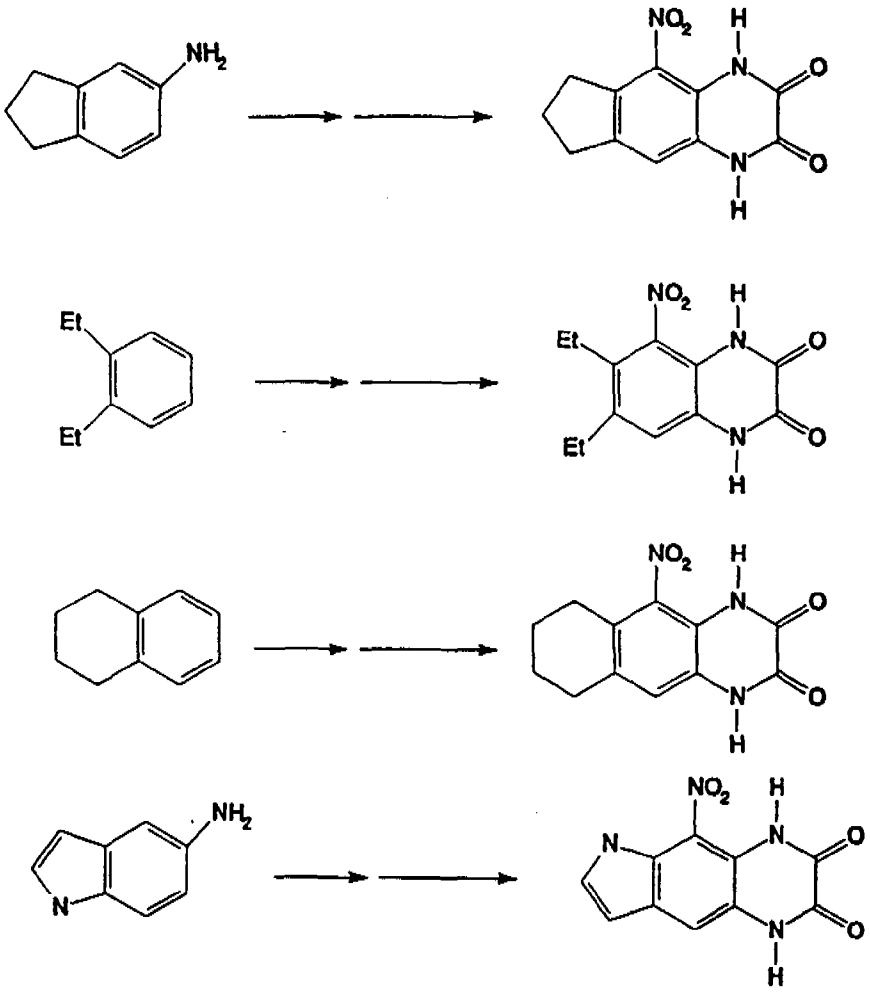
Kaavio V



Käyttäen samantapaista menetelmää kuin kaaviossa *I* on esitetty, voidaan valmistaa yhdisteitä, joissa on fuusioituneita hiilisykloalkyyli-, heteroalkyyli-, aromaatti- ja heteroaromaattiryhmiä fuusioituina kinoksaliinirenkaan 6- ja 7-asemiin.

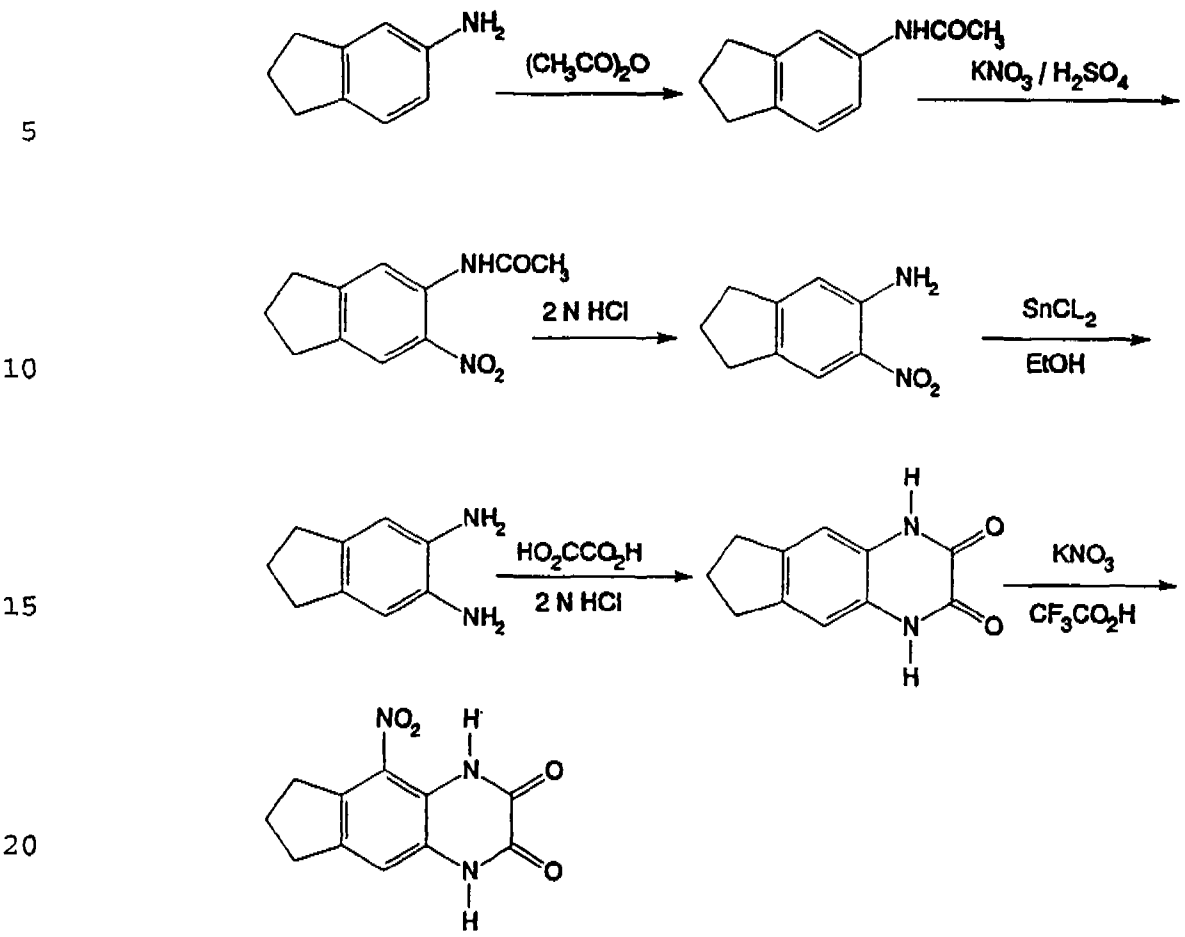
6,7-dimetoksi-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dionia voidaan valmistaa 1,2-dimetoksibentseenistä. 1,2-dimetoksibentseenin nitrauksen tuloksena saatiin 1,2-dimetoksi-4,5-dinitrobentseeni, joka pelkistettin 1,2-diamino-4,5-dimetoksibentseeniksi. Diamiinin fuusiointi oksaalihapolla antoi tulokseksi 6,7-dimetoksi-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dionin.

Kaavio VI

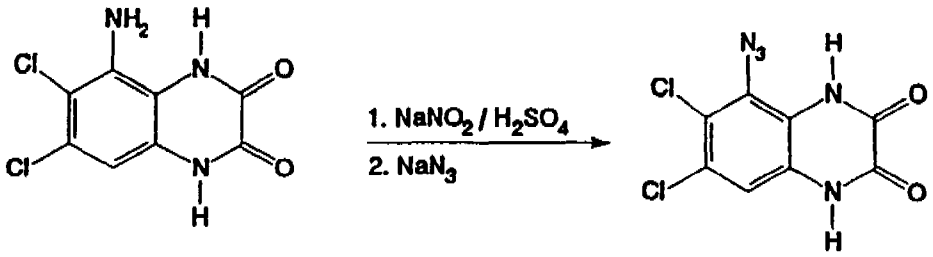


5-nitrosyklopento[g]-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni valmistettiin 5-aminoindaanista kaavion *VII* mukaisesti. Nitraamalla 5-asetamidoindaani saatiin nitro-tuotteiden seos, joka erotettiin kromatografian avulla, jolloin saatiin 5-asetamido-6-nitroindaania noin 20 % saannolla. Suojauksen poistoa seurannut pelkistys ja tuloksena saadun diamiinin kondensointi oksaalihapolla antoi tulokseksi syklopento[g]-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dionin hyvällä saannolla. Nitraus KNO_3/H_2SO_4:ssa tai HNO_3/H_2SO_4:ssa antoi tulokseksi monimutkaisia tuotteita. Kuitenkin nitraus miedoissa olosuhteissa eli KNO_3/CF_3CO_2H:ssa antoi tulokseksi 5-nitro-syklopento[g]-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dionin ainoana tuotteena.

Kaavio VII

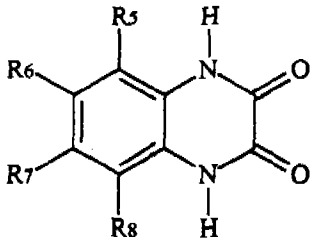


Atsidosubstituoituja kinoksaliini-2,3-dioneja valmistettiin diatsotisoimalla aminosubstituoituja 1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioneja ja käsittelemällä sen jälkeen natriumatsidilla:



Rakenne-aktiivisuus-riippuvuussuhteet joukolle alkyyli-, atsido-, fluori-, alkoksi- ja syanosubstituoituja 1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioneja on esitetty taulukossa II.

Taulukko II. Alkyyli-, atsido-, fluori-, alkoksi- ja syano-substituoitujen 1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dionien rakenne ja aktiivisuus.



R_5	R_6	R_7	R_8	K_i (nM)[a]
NO_2	Me	Me	H	43
NO_2	Me	F	H	53
NO_2	Me	Br	H	40[b]
NO_2	Cl	Me	H	27
NO_2	Me	Cl	H	5
NO_2	OMe	F	H	320
NO_2	OEt	F	H	1000
NO_2	N_3	F	H	280
NO_2	OMe	Cl	H	450[b]
NO_2	Et	Cl	H	200[b]
NO_2	Cl	Et	H	40[b]
NO_2	OBu-n	F	H	6500[b]
NO_2	$O(CH_2)_3Ph$	F	H	6700[b]
NO_2	SEt	Cl	H	500
NH_2	Me	Cl	H	500[b]
H	OMe	OMe	H	OA[b,c]
H	Et	Et	H	800[b]
H	Cl	Et	H	730[b]
CN	Cl	NO_2	H	50
CN	Cl	Cl	H	15[d]
NO_2	H	Me	H	1200
Me	H	Me	H	1700
Et	H	Br	H	900

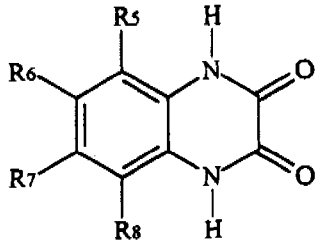
H	Me	Me	H	980
Me	H	H	H	OA[b,c]
H	Me	H	H	9000[b]
H	$CH_2CH_2CH_2$		H	6300
NO_2	$CH_2CH_2CH_2$		H	800
H	CH=CHCH=CH		H	11000
N_3	Cl	Cl	H	71
Cl	N_3	Cl	H	536
Cl	H	H	Me	OA[b,c]
Cl	NO_2	NO_2	Me	3800[b]
H	N_3	H	H	910[b]

[a]*Xenopus*-oosyyteillä tehdystä elektrofysiologiasta, jollei toisin mainittu
[b]sitoutumiskokeista
[c]OA = osittain aktiivinen
[d]Sisältää noin 4 % yhdistettä, jossa R_5 = CN, R_6 = Cl, R_7 = NH_2, R_8 = H.

Taulukossa III on esitetty *in vivo*-aktiivisuudet joukolle fluorisubstituoituja 1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioneja. Kuten on nähtävissä, on näillä yhdisteillä hyvä antikonvulsiivinen aktiivisuus *in vivo*.

Taulukossa IV on esitetty yhteenveto kahdeksan 1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dionin testauksesta suonensisäisinä antikonvulsiiveina hiirien MES-kokeissa. Useimmilla testatuista yhdisteistä on hyvin nopeat toimintahuiput, etenkin fluorisubstituoiduilla yhdisteillä. Fluorisubstituoitujen yhdisteiden suojaava vaikutus MES:ä vastaan hyvin nopeasti. 60 minuutin kuluttua 6,7-difluori-5-nitro-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dionilla ja 5,6,7-trifluori-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dionilla ei ollut enää suojaavaa vaikutusta. Kloorisubstituoiduilla yhdisteillä on nopea toimintahuippu, mutta suojaava vaikutus kestää paljon kauemmin kuin fluorisubstituoiduilla yhdisteillä. Trifluorimetyyli-substituoiduilla yhdisteillä on melko hitaat toimintahuiput ja suojaava vaikutus kestää pitempään kuin fluorisubstituoiduilla yhdisteillä. Tätä 1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dionien erilaista toimintamallia voitaisiin käyttää yksittäisten yhdisteiden soveltamiseksi erityyppisiin hoitoihin. Tämä keksintö kohdistuu myös tähän havaintoon.

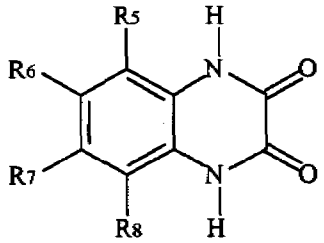
Taulukko III. Fluori-substituoitujen 1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dionien *in vivo*-aktiivisuus



R_5	R_6	R_7	R_8	K_i (nM)[a]	ED_{50} (DBA-2-)[a] mg/kg	ED_{50} (MES)[c] mg/kg
F	F	F	F	2186	9	20[a]
NO_2	F	Cl	F	170	ND[b]	2-3
NO_2	Br	F	H	43	ND	3,5
NO_2	F	Cl	H	70	ND	0,9
NO_2	Cl	F	H	180	ND	4-5
F	F	F	H	2966	ND	4-5
NO_2(H)	Cl	F	H(NO_2)	18	ND	0,5-0,7
Br	F	F	H	2300	30	ND
F	Cl	F	H	1000	ND	10
H	Me	F	H	8200	ND	15
NO_2	Me	F	H	53	ND	2
NO_2	OMe	F	H	320	ND	7,5
NO_2	N_3	F	H	280	ND	7,5
NO_2	F	F	H	87	ND	0,7-0,8

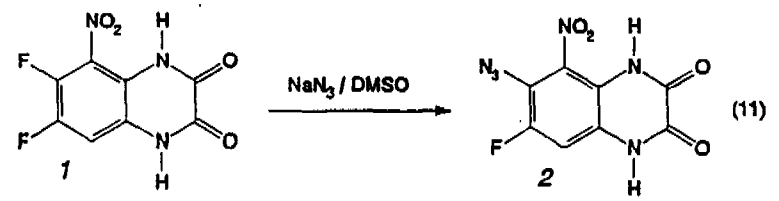
[a]i.p. injektio
[b]ND = ei määritetty
[c]i.v. injektio, jollei toisin mainittu

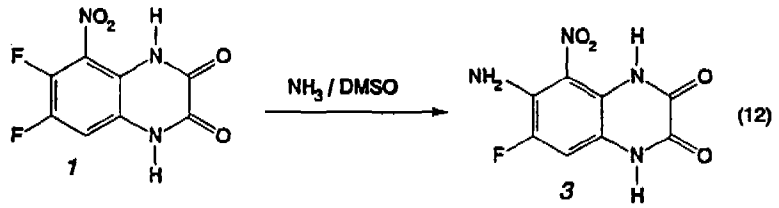
Taulukko IV. 1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dionien suojaavan vaikutuksen MES-testit *i.v.*

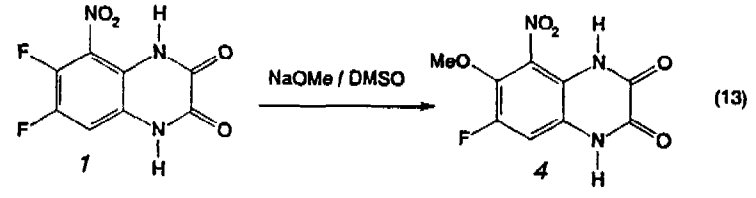


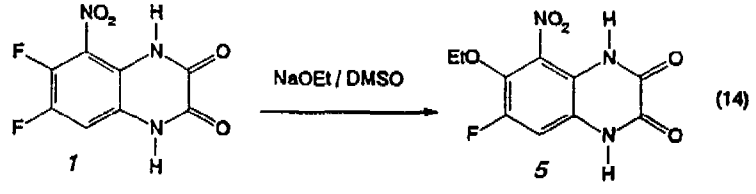
R_5	R_6	R_7	R_8	K_i (nM)[a]	IV aktiivisuuden huippu (min)	ED_{50} (MES) mg/kg	ED_{100} (MES) mg/kg	suojaava vaikutus, %, 60 min. kuluttua
NO_2	Cl	Cl	H	3,3	5	4-5	7-10	55 (10 mg/kg)
NO_2	F	Cl	F	170	2-5	2-3	5	50 (5mg/kg)
F	F	F	H	2966	2	4-5	15-20	0 (10 mg/kg)
NO_2(H)	Cl	F	H(NO_2)	18	5	0,5-0,7	4	14 (10 mg/kg)
CF_3	H	Cl	H	395	30	10	30	87 (30 mg/kg)
Cl	H	CF_3	H	320	15	10	20-25	62 (20 mg/kg)
NO_2	H	CF_3	H	95	30	17	40	62 (40 mg/kg)
NO_2	F	F	H	87	1	0,7-0,8	2,5	0 (2,5 mg/kg)

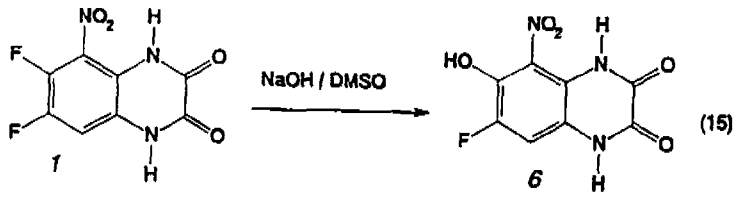
Nitro- ja fluorisubstituoiduilla 1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioneilla tehdyissä formulointi- ja stabiilisuuskokeissa havaittiin, että jotkut näistä yhdisteistä ovat epästabiileja nukleofiilien kuten 2-merkaptoetanolin tiolin (SH) ja arginiinin aminon ja guanidiinin vaikutukselle, ja että tioli- ja aminoryhmät korvaavat fluoria. Todettiin, että näitä havaintoja voitaisiin käyttää valmistettaessa ryhmä 1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioneja, joita muutoin ei voitaisi helposti valmistaa. Orto-fluorin nukleofiilinen substituointi nitroryhmällä 6,7-difluori-5-nitrokinoksaliini-2,3-dionissa (1) erilaisilla nukleofiileillä tehtiin reaktioyhtälöiden 11-15 mukaisesti. Reaktiota seurattiin yleensä ^{1}H-NMR ja/ tai ^{19}F-NMR-spektroskopian avulla. Orto-fluorin korvaaminen nukleofiilin avulla nitroryhmäksi muuntaa aromaattisen protonin kaksinkertaisen dupletin yksinkertaiseksi. F-H-kytkentävakiot ovat noin 11,5 Hz, mikä vahvistaa, että jäljellä oleva F on orto-asemassa vetyyn nähden. Reaktio 1:n ja natriumatsidin välillä tapahtuu välittömästi sen jälkeen, kun ne on sekoitettu DMSO:ssa. ^{1}H-NMR-spektrissä, joka mitattiin välittömästi näytteen sekoittamisen jälkeen, esiintyi aromaattisen protonin dupletti 7,1 ppm:ssä eikä lähtöainetta ollut havaittavissa.







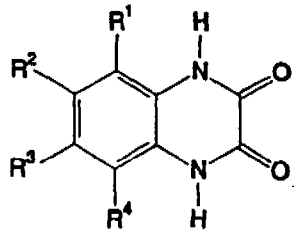




(15)

Vastaavasti 7-kloori-6-fluori-5-nitro-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dionin reaktiossa natriummetoksidin kanssa saatiin 7-kloori-6-metoksi-5-nitrokinoksaliini-2,3-dionia ja reaktiossa etaanitiolin kanssa saatiin 7-kloori-6-etyylitio-5-nitrokinoksaliini-2,3-dionia.

Siten keksintö koskee myös menetelmää sellaisten yhdisteiden valmistamiseksi, joiden yhdisteiden kaava on:



tai sen tautomeeri;

jossa kaavassa

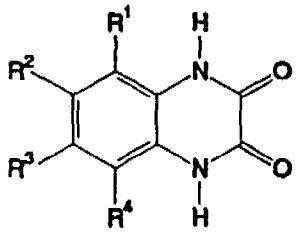
R^1 on nitro, syano, CF_3, karboksi tai alkanoyyli;

R^2 on alkoksi, aralkoksi, hydroksi, merkaptoalkyyli, atsido tai NR^5R^6, jossa R^5 ja R^6 ovat toisistaan riippumatta vety-, alkyyli- tai aryyliryhmiä.

R^3 on halogeeni, halogeenialkyyli, nitro, alkyyli, alkoksi, atsido tai syano; ja

R^4 on vety;

jossa menetelmässä yhdiste, jonka kaava on:



tai sen tautomeeri;

jossa kaavassa

R^1 on nitro, syano, CF_3, karboksi tai alkanoyyli;

R^2 on fluori;

R^3 on halogeeni, halogeenialkyyli, nitro, alkyyli, alkoksi, atsido tai syano; ja

R^4 on vety;

reagoi alkoksidin, aryylialkoksidin, hydroksidin, alkyylimerkaptidin, atsidin tai HNR^5R^6, kanssa, vastaavassa järjestyksessä, inertissä liuottimessa, ja eristetään siten valmistettu yhdiste. Esimerkkejä sellaisista inerteistä liuottimista ovat dipolaariset, aproottiset liuottimet kuten DMF ja DMSO. Nukleofiilin ollessa alkoksiryhmä voi liuotin olla vastaava alkoholi. Reaktio suoritetaan lämpötilavälillä, joka on huoneenlämpötilasta 120 °C:een, ja edistymistä seurataan NMR-spektroskopian avulla.

Elektroneja puoleensa vetävien ryhmien kuten syano-, CF_3, karboksi- ja alkanoyyli-ryhmillä 5-asemassa oletetaan käyttäytyvän samalla tavoin kuin nitro. Reaktion edistymisen kannalta 7- ja 8-asemissa voi olla mikä tahansa ryhmä.

Esimerkkejä yhdisteistä, joita voidaan valmistaa tämän menetelmän mukaisesti, ovat 6-atsido-7-fluori-5-nitro-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni; 6-amino-7-fluori-5-nitro-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni; 7-fluori-6-metoksi-5-nitro-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni; 7-fluori-6-etoksi-5-nitro-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni; 7-fluori-6-hydroksi-5-nitro-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni; 7-kloori-6-metoksi-5-nitro-kinoksaliini-2,3-dioni ja 7-kloori-6-etyylitio-5-nitro-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni.

Tämä keksintö kohdistuu siten yhdisteisiin, jotka sitoutuvat voimakkaasti glysiinireseptoriin ja heikosti kainaatti- ja AMPA-paikkoihin. Glysiiniantagonistin tehokkuus elimistössä voidaan määrittää käyttämällä 1 µM glysiinistimuloitua [^{3}H]-MK801-sitoutumiskoetta. Tässä kokeessa hyödynnetään [^{3}H]-

MK801:n sitoutumisen PCP-reseptoriin NMDA-kanavan huokosen sisällä riippuvuutta sekä glutamaatin että glysiinin läsnäolosta. Ilman glysiiniä mutta glutamaatin läsnäollessa, [^{3}H]-MK801 ei voi sitoutua tehokkaasti PCP-reseptoriin, koska NMDA-kanava pysyy suljettuna ja [^{3}H]-MK801:n pääsy PCP-reseptoriin suljetun kanavahuokosen sisälle rajoittuu voimakkaasti.

Koe suoritetaan käyttäen rotan aivojen membraanihomogenaatteja, jotka rikastetaan NMDA-reseptoreilla. Membraanit valmistetaan seuraavasti. Jäädytettyjä rotan aivoja (toimittaja Pel-Freez, Rogers, Arkansas) homogenisoidaan 15 tilavuudessa (massa/tilavuus) jääkylmää 0,32 M sukroosiliuosta. Homogenaattia lingotaan (spun) 1000 x g kymmenen minuutin ajan. Yläpuolella oleva liuos kerätään ja lingotaan 20 minuutin ajan 44 000 x g. Pelletti lietetään 15 tilavuuteen vettä (suhteessa aivojen alkuperäiseen massaan). Homogenaatti lingotaan jälleen 44 000 x g kahdenkymmenen minuutin ajan. Pelletti suspentoidaan uudelleen 5 tilavuuteen vettä ja suspensio jäähdytetään ja sulatetaan 2 kertaa (freeze-thawed). Viimeisen sulatuksen jälkeen lietteen tilavuus tehdään 15 osaan ja lingotaan. 44 000 x g 20 minuutin ajan. Pelletti suspentoidaan uudelleen 5 tilavuusosaan jääkylmää 10 mM HEPES:a ja titrataan pH-arvoon 7,4 KOH:lla, joka sisältää 0,04 % Triton X-100:a. Membraaneja inkuboidaan Triton/HEPES-puskurissa, 37 °C:ssa 15 minuutin ajan. Tilavuus nostetaan 15 osaan jääkylmällä 10 mM HEPES:lla, pH:ssa 7,4 ja linkous-pesu-käsittely tehdään kolme kertaa ja pesujen välissä linkoukset 44 000 kierrosta x g. Lopullinen pelletti suspentoidaan kolmeen tilavuusosaan 50 mM HEPES:a, pH:ssa 7,4, ja proteiinipitoisuus määritetään standardiproteiinivärikokeella (Bio-Rad, Richmond, CA). Suspensiota säilytetään -80 °C:ssa käyttöön asti. Kaikkiin puskureihin ja suspensioihin/pesuihin käytetään vain HPLC-laatuista vettä. Runsas pesu on tarpeellista, jotta poistettaisiin niin paljon kuin mahdollista membraanivalmisteen endogeenisestä glysiinistä.

Koepäivänä aiemmin valmistetut membraanit sulatetaan pH:ssa 7,4, ja lisätään 5 mM Tris/HCl-puskuria, jotta lopullinen proteiinipitoisuus on 0,156 mg/ml. Sitoutumiskokeita varten 0,8ml membraaneja pipetoidaan polypropeeniputkiin, jonka jälkeen lisätään 0,033 ml 15,1 µM 5,7-dikloorikynureenihappoa (DCK), 0,033 ml 30,3 µM glysiiniä puskurissa (tai pelkästään puskuria), 0,033 ml 303 µM glutamaattia puskurissa (tai vertailukokeissa 0,1 ml 1mM PCP:a DCK/gly/glu-seoksen sijasta), 0,033 ml glysiiniantagonistia puskurissa (tai pelkästään puskuria) ja 0,1 ml puskuria, joka sisältää 200 000 cpm [^{3}]-MK801:ä. Ei-spesifiseksi sitoutumiseksi määritellään ero, joka sitoutumisessa on ilman PCP:a tai PCP:n kanssa (lopullinen pitoisuus: 100 µM). Jotta määritettäisiin 1 µM glysiinin vaikutus [^{3}]-MK801:n sitoutumiseen, sitoutunut radioaktiivisuus 10 µM (lopullinen pitoisuus) glutamaatin läsnäollessa vähennetään sitoutuneesta radioaktiivisuudesta, joka vallitsee sekä 10 µM glutamaattia ja 1 µM glysiiniä läsnäollessa (lopullinen pitoisuus). 500 nM pitoisuus (lopullinen) 5,7-dikloorikynureenihappoa (DCK) lisätään kaikkiin koeputkiin. Tämä DCK-glysiiniantagonistin pitoisus "puskuroi" suurimman osan jäljellä olevasta endogeenisestä glysiinistä, jota ei ole poistettu useissa pesuvaiheissa, jotka suoritettiin membraanin valmistuksen aikana. 500 nM DCK ei häiritse [^{3}H]-MK801:n sitoutumisen stimuloimista, johon vaikuttaa lisäys 1 µM eksogeenistä glysiiniä.

Kokeita inkuboitiin 120 minuutin ajan huoneenlämpötilassa, jonka jälkeen membraaniin sitoutunut radioaktiivisuus erotetaan vapaasta radioaktiivisuudesta tyhjösuodattamalla 0,3 % polyetyleeni-imiinillä käsiteltyjen Whatman lasikuitusuodattimien läpi. Suodatus suoritettiin käyttäen Brandel 48-kaivosolukeräintä (engl. *well cell harvester*). Suodatetut membraanit pestää kolme kertaa 3 millilitralla jääkylmää puskuria. Suodattimet siirretään tuikepulloihin ja lisätään 5 ml tuikeseosta. Pulloja ravistellaan yön yli ja radioaktiivisuus lasketaan nestetuikespektroskopialla. Kokeista tehdään kolme

rinnakkaista ja kaikki koesarjat suoritetaan kolme kertaa.

Inhibition annosvastekäyrät määritetään käyttäen glysiiniantagonistien kasvavia pitoisuuksia 5 nM - 330 µM. IC_{50}-arvot määritetään yhdisteille, jotka ovat aktiivisia inhiboimaan 1µM glysiini-stimuloidun [^{3}H]-MK801:n sitoutumiselle piirtämällä inhibitiokäyrät tietokoneen avulla ja interpoloimalla ne. Kun yhdisteiden havaitaan inhiboivan glysiinistimuloitua [^{3}H]-MK801:n sitoutumista, suoritetaan kokeet, joissa määritetään, onko glysiini-stimuloidun [^{3}H]-MK801:n sitoutumisen inhibitio todella NMDA-reseptorin glysiinisitoutumispaikan välittämä. Näissä kokeissa inkuboidaan antagonistia sellaisena vakiopitoisuutena, joka on riittävä aiheuttamaan >95 % inhibition 1 µM glysiini-stimuloidun [^{3}H]-MK801:n sitoutumisessa, membraanien kanssa ilman glysiinilisäykstä (yli 1 µM) ja kasvavien glysiinipitoisuuksien läsnäollessa (2 µM - 1 µM). Jos lääkkeen aikaansaama [^{3}H]-MK801:n sitoutumisen inhibitio peruuntuu täysin lisäämällä kasvavia pitoisuuksia glysiiniä, välittyy [^{3}H]-MK801:n sitoutumisen inhibitio NMDA-reseptorin glysiinisitoutumispaikan antagonistina toimivan lääkkeen kautta.

Sen jälkeen, kun inhibition annosvastekäyrät ja glysiinin reversibiliteetti on määritetty, lasketaan K_i-arvot glysiiniantagonisteille käyttämällä Cheng'n ja Prusoff'n yhtälöä ja sijoittamalla siihen kokeellisesti määritetyt IC_{50}-arvot, kokeissa käytetty tunnettu glysiinin pitoisuus (1 µM) ja NMDA-reseptorin glysiinisitoutumispaikan tunnettu glysiiniaffiniteetti (100 nM).

[^{3}H]-AMPA-radioaktiivisen ligandin sitoutumiskokeessa käytetään samoja rotanaivomembraanihomogenaatteja, kuin 1µM glysiinistimuloidussa [^{3}H]-MK801:n sitoutumiskokeessa. Koepäivänä jäädytetyt membraanit (valmistettu edellä kuvatun mukaisesti) sulatetaan ja laimennetaan 30 mM Tris/HCl-puskurilla, joka sisältää 2,5 mM $CaCl_2$:a ja 100 mM KSCN:a, pH:ssa 7,4, jotta saadaan membraanin loppupitoisuudeksi 1,25 mg/ml

membraaniproteiinia. Sitoutumiskoetta varten lisätään polypropeeniputkiin 0,8 ml membraanihomogenaattia ja sen jälkeen 0,033 ml lääkettä ja 0,067 ml puskuria (tai vertailukokeissa 0,1 ml pelkästään puskuria) ja 0,1 ml puskuria, joka sisältää 200 000 cpm [^{3}H]-AMPA:a. Koetta inkuboidaan 30 minuutin ajan jäässä. Sitoutunut radioaktiivisuus erotetaan vapaasta radioaktiivisuudesta suodattamalla Whatman-lasikuitusuodattamilla (esikäsitelty 0,3 % polyetyleeni-iminillä) käyttäen Brandel-48 kaivosolukeräintä.

Suodatetut membraanit pestää kolme kertaa 3 millilitralla jääkylmää puskuria. Suodattimet siirretään tuikepulloihin ja lisätään 5 ml tuikeseosta. Pulloja ravistellaan yön yli ja radiaktiivisuus lasketaan nestetuikespektroskopian avulla. Ei-spesifinen sitouminen määritetään radioaktiivisuudeksi, joka jää sitoutuneeksi membraaneihin 10 mM glutamaattia ollessa läsnä. Inhibition annosvastekäyrät määritetään lisäämällä kasvavia pitoisuuksia lääkettä annoksen kasvaessa 10 nM - 100 µM.

Samaa membraanivalmistetta, jota käytetään [^{3}H]-AMPA:n sitoutumiskokeessa, voidaan käyttää [^{3}H]-kainaatin radioaktiivisen ligandin sitoutumiskokeessa. Koepäivänä jäädytetyt rotanaivomembraanit (valmistettu edellä kuvatun mukaisesti) sulatetaan ja lisätään 5 mM Tris/HCl-puskuria, pH:ssa 7,4, jotta saadaan membraanin loppupitoisuudeksi 0,5 mg/ml membraaniproteiinia. Sitoutumiskoetta varten lisätään polypropeeniputkiin 0,8 ml membraanihomogenaattia ja sen jälkeen 0,033 ml lääkettä ja 0,067 ml puskuria (tai vertailukokeissa 0,1 ml pelkästään puskuria) ja 0,1 ml puskuria, joka sisältää 200 000 cpm. [^{3}H]-kainaattia. Koetta inkuboidaan kaksi tuntia jäässä. Sitoutunut radioaktiivisuus erotetaan vapaasta radioaktiivisuudesta suodattamalla Whatman-lasikuitusuodattamilla (esikäsitelty 0,3 % polyetyleeni-iminillä) käyttäen Brandel-48 kaivosolukeräintä Suodatetut membraanit pestää kolme kertaa 3 millilitralla jääkylmää puskuria. Suodattimet siir-

retään tuikepulloihin ja lisätään 5 ml tuikeseosta. Pulloja ravistellaan yön yli ja radiaktiivisuus lasketaan nestetuike-spektroskopian avulla. Ei-spesifinen sitouminen määritetään radioaktiivisuudeksi, joka jää sitoutuneeksi membraaneihin 10 mM glutamaattia ollessa läsnä. Inhibition annosvastekäyrät määritetään lisäämällä kasvavia pitoisuuksia lääkettä annoksen kasvaessa 250 nM - 330 µM.

Minkä tahansa tämän keksinnön yhdisteen ahdistusta vähentävä (anksiolyyttinen) aktiivisuus voidaan määrittää käyttämällä mitä hyvänsä eläinmallia ahdistukselle. Jones, B.J., *et al.*, *Br. J. Pharmacol.* *93*:985-993 (1988), ovat selittäneet edullista mallia. Tässä mallissa tutkittavaa yhdistettä annetaan hiirille, joilla on korkea ahdistuksen perustaso. Koe perustuu siihen havaintoon, että sellaisista hiiristä on vastenmielistä, jos ne otetaan pimeästä kotiympäristöstä pimeässä testihuoneessa ja pannaan alueelle, joka on maalattu valkoiseksi ja valaistu kirkkaasti. Testilaatikossa on kaksi osastoa, toinen valkoinen ja kirkkaasti valaistu, toinen musta ja valaisematon. Hiiret pääsevät molempiin osastoihin lattian tasolla kahden osaston välillä olevassa jakajalevyssä olevasta aukosta. Vertailuhiirillä on taipumus viettää suhteessa enemmän aikaa pimeässä osastossa. Annettaessa anksiolyyttistä ainetta hiirillä on taipumus viettää enemmän aikaa uudemmassa kirkkaammin valaistussa osastossa ja viivästynyttä piilevyyttä siirtyä pimeään osastoon. Lisäksi anksiolyyttisillä aineella hoidetut hiiret liikehtivät valkoisessa osastossa enemmän, mikä havaitaan tutkivina kohottautumisina ja viivan ylityksinä. Koska hiiret voivat tottua testitilanteeseen tulisi testissä käyttää aina kokemattomia hiiriä. Testissä voidaan mitata viisi parametriä: piilevä taipumus mennä pimeään osastoon, viivojen ylityskertojen lukumäärä kussakin osastossa ja kohottautumiskertojen lukumäärä kussakin osastossa. Tämän keksinnön yhdisteiden antamisen uskotaan johtavan hiirissä siihen, että ne viettävät enemmän aikaa testikammion suuremmassa, kirkkaammin valaistussa alueessa.

Valoisa/tumma-tutkimusmallissa oletetun lääkeaineen anksiolyyttinen aktiivisuus voidaan tunnistaa viivanylitysten ja kohottautumisten lukumäärän kasvusta valoisassa osastossa suhteessa viivanylitysten ja kohottautumisten määrän pimeässä osastossa, verrattuna vertailuhiiriin.

Toinen edullinen eläinmalli on rotan sosiaalisen vuorovaikutuksen testi, jota Jones, B.J., *et al.*, *supra*, ovat selittäneet, jossa testissa mitataan aikaa, jonka kaksi hiirtä viettävät sosiaalisessa kanssakäymisessä. Mahdollisen lääkeaineen anksiolyyttinen aktiivisuus voidaan tunnistaa lisäyksestä ajassa, jonka urosrottaparit viettävät aktiivisessa sosiaalisessa kanssa käymisessä (90 % käyttäytymisestä on luonteeltaan tutkivaa). Sekä testiareenan tuttuutta että valaisutasoa voidaan muutella. Lääkitsemättömillä rotilla on eniten sosiaalista kanssakäymistä, kun testiareena on tuttu ja vähän valaistu. Sosiaalinen kanssakäyminen vähentyy, kun areena on rotille outo tai valaistu kirkkailla valoilla. Anksiolyytit estävän tämän vähentymisen. Motoorisen aktiivisuuden yleistasoa voidaan myös mitata, jotta voitaisiin havainnoida lääkkeen vaikutuksia erityisesti sosiaaliseen kanssakäymiseen.

Glysiinin ja eksitoivien aminohappojen antagonistien tehokkuutta inhiboida glutamaatin neurotoksisuutta rotan aivokuoren hermosoluviljelmäsysteemissä voidaan määrittää seuraavasti. Glysiinin ja eksitoivien aminohappojen antagonistien anti-eksitotoksisuustehon mittaamiseen voidaan käyttää Choin (Choi, D.W., *J. Neuroscience* 7: 357 (1987)) kehittämää eksitotoksisuusmallia modifioiden. Rotan 19. alkiopäivän sikiöt poistetaan sopivalla aikaa paritetuista raskaana olevista rotista. Sikiöistä poistetaan aivot ja leikataan aivokuori. Leikatun kuoren solut erotetaan mekaanisesti sekoittamalla ja entsymaattisella irrotuksella Landon'n ja Robbins'n menetelmän mukaan (*Methods in Enzymology 124:* 412 (1986)). Erotetut solut johdetaan 80

mikrometrin nitex-seulan läpi ja solujen elinkelpoisuus tutkitaan Trypan-sinisellä. Solut levitetään poly-D-lysiinillä pinnoitetuille levyille ja inkuboidaan 37 °C:ssa ilmakehässä, joka sisältää 91 % O_2 ja 9 % CO_2. Kuusi päivää myöhemmin lisätäänn fluori-d-urasiilia kahdeksi päiväksi muiden kuin hermosolujen kasvun estämiseksi. 12. viljelypäivänä altistetaan primäärineuroniviljelmät 100 µM:lle glutamaattia 5 minuutin ajaksi, kun läsnä on kasvavia annoksia glysiinin ja eksitoivien aminohappojen antagonisteja tai muita lääkkeitä. 5 minuutin kuluttua viljelmät pestään ja inkuboidaan 24 tunnin ajan 37 °C.ssa. Hermosoluvaurio määritetään mittaamalla viljelmän väliaineeseen vapautuvan laktaattidehydrogenaasin (LDH) aktiivisuutta. LDH-aktiivisuus mitataan Decker'n *et al.* (Decker *et al.*, *J. Immunol. Methods* 15:16 (1988)).

Glysiinin ja eksitoivien aminohappojen antagonistien antikonvulsiivista aktiivisuutta voidaan tutkia DBA-2-hiirien audiogeeni-kohtausmallissa seuraavassa kuvatun mukaisesti. DBA-2-hiiriä on saatavissa Jackson Laboratories:sta, Bar Harbor, Maine. Nämä alle 27 päivän ikäiset hiiret saavat kouristuskohtauksen 5-10 sekunnissa ja kuolevat altistettaessa ne 14 kHz äänelle (siniaalto) 110 dB:ssä (Lnosdale, D., *Dev. Pharmacol. Ther.* 4:28 (1982)). Suojaus kohtausta vastaan määritellään siten, että eläimet, jotka on injektoitu lääkkeellä 30 minuuttia ennen äänialtistusta, eivät saa kohtausta eivätkä kuole 1 minuutin äänialtistuksen aikana. Kaikkiin kokeisiin käytetään 21 päivää vanhoja DBA-2-hiiriä. Yhdisteet annetaan vatsakalvon sisäisesti joko suolaliuoksessa, DMSO:ssa tai polyetyleeniglykoli-400:ssa. Sopivat liuottimen säätöarvot sisältyvät kuhunkin kokeeseen. Annosvastekäyrät määritetään antamalla kasvavia lääkeannoksia 1 - 100 mg/kg. Kukin annosryhmä (tai liuotinsäätöarvo) sisältää ainakin kuusi eläintä.

Glysiinireseptorin antagonistien antikonvulsiivista vaikutusta voidaan arvioida pentyleenitetratsolilla (PTZ) aikaan-

saadussa kohtauskokeessa seuraavassa kuvatun mukaisesti. Annettaessa Swiss-Webster-hiirille ruiskeena 50 mg/kg PTZ:a (*i.p.*) tulee niille 5 - 15 minuutin kuluessa lääkkeen injektoimisesta noin 5 sekunnin pituinen minimiklooninen kohtaus (engl. *minimal clonic seizure*). Glysiini-/eksitoivien aminohappojen antagonistilääkkeen (tai muun lääkkeen) antikonvulsiivinen teho määritellään kohtauksen poisjäämiseksi, kun lääke annetaan 30 minuuttia ennen PTZ:n antamista ja kohtausta ei kehity 45 minuutin kuluessa PTZ:n antamista. Glysiini-/eksitoivien aminohappojen antagonisteja annetaan vatsakalvon sisäisesti joko suolaliuoksessa, DMSO:ssa tai polyetyleeniglykoli-400:ssa. Sopivat liuottimen säätöarvot sisältyvät kuhunkin kokeeseen. Annosvastekäyrät määritetään antamalla kasvavia lääkeannoksia 1 - 100 mg/kg. Kukin annosryhmä (tai liuotinsäätöarvo) sisältää ainakin kuusi eläintä.

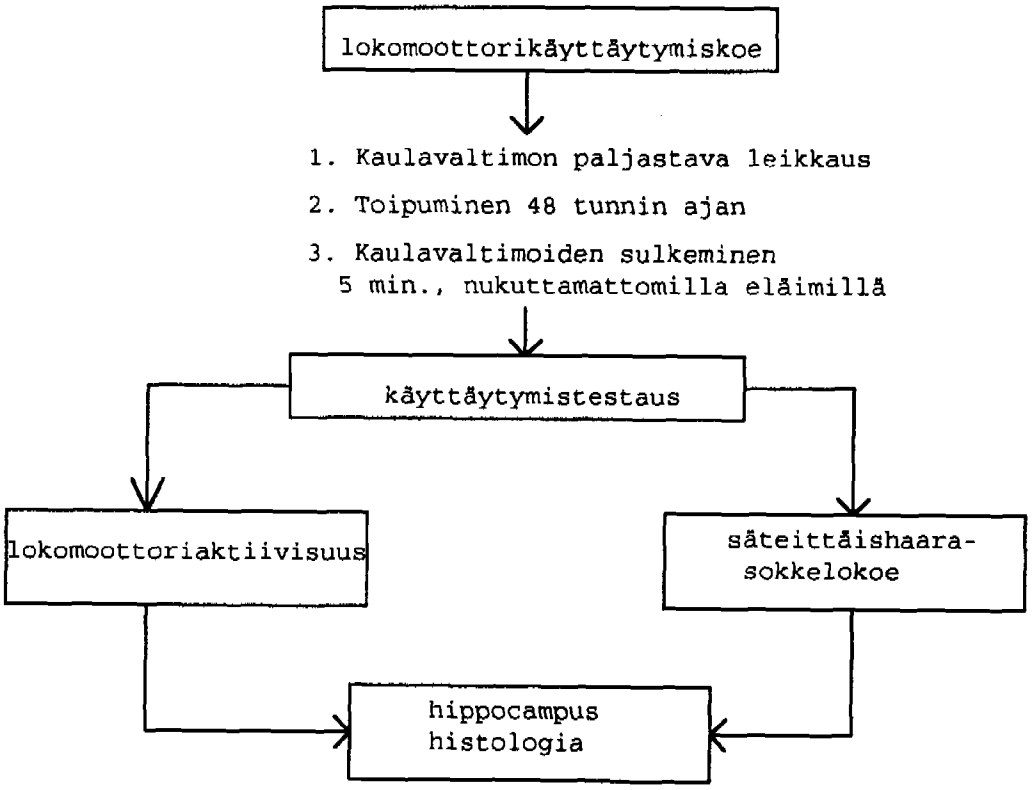
Glysiini-/eksitoivien aminohappojen antagonistien kykyä suojata hiiriä NMDA:n aiheuttamalta kuolemalta voidaan arvioida seuraavassa kuvatun mukaisesti. Kun hiiriin injektoidaan 200 mg/kg N-metyyli-D-aspartaattia (NMDA) *i.p.* eläimet saavat kohtauksen, jota seuraa kuolema 5 - 10 minuutin kuluessa. Glysiini-/eksitoivien aminohappojen antagonistien kykyä estää NMDA:n aiheuttama kuolema testataan antamalla lääkkeitä *i.p.* 30 minuuttia ennen NMDA:n antamista. Glysiini-/eksitoivien aminohappoantagonisteja tai muita lääkkeitä annetaan vatsakalvon sisäisesti joko suolaliuoksessa, DMSO:ssa tai polyetyleeniglykoli-400:ssa. Sopivat liuottimen säätöarvot sisältyvät kuhunkin kokeeseen. Annosvastekäyrät määritetään antamalla kasvavia lääkeannoksia 1 - 100 mg/kg. Kukin annosryhmä (tai liuotinsäätöarvo) sisältää ainakin kuusi eläintä.

Glysiiniantagonistien antikonvulsiivista aktiivisuutta voidaan arvioida MES-kokeissa hiirillä. Sähköshokki annettiin Swiss-Webster-uroshiirille (20 - 30 g, Simonsen) sarveiskalvoelektrodien (Swinyard, E.A. (1973) teoksessa *Anticonvul-*

sant drugs, Mercier, J., toim., Pergamon Press, Oxford, ss. 47 - 65). Kokeen ärsykeparametrit olivat: 50 mA, 60 Hz, suorakulmainen pulssi, pituus 0,8 ms, kesto 200 ms. Sähköärsykkeen antamisen jälkeen havaittu kouristuksenomainen raajanojennus todettiin kohtauksen esiintymiseksi. Lääkettä annettiin *i.v.* Tris:n (trometamiinin) vesiliuoksena. Keksinnön glysiini-/eksitoivien aminohappojen antogonistiannoksille voidaan tehdä sarja erilaisia arviointeja yhdisteiden biologisen aktiivisuuden määrittämiseksi sekä normaaleilla hyppyrotilla että eläimillä, jotka on altistettu 5 minuutin ajan molemmanpuoliselle kaulavaltimon sulkemiselle. Katso kaaviota *VIII*.

Kaavio VIII

Hyppyrotan iskeemiamalli



Nämä kokeet tehdään eläimellä, jotka ovat tajuissaan ja joille ei ole annettu muita farmakologisia aineita. Hyppyrotat esi-instrumentoidaan 48 tuntia ennen iskeemiaa, jotta mahdollistetaan käytetyn pentobarbitaalianesteetin

täydellinen poistuminen. Testattaessa eläimiä lääkkeillä niille annetaan *i.p.*-ruiskeet glysiini-/eksitatiivisen aminohapon antagonistia tai vehikkeliä. Annettaessa eläimille useita ruiskeita ne annetaan *i.p.* 2 tunnin välein ja viimeinen ruiske 30 minuuttia ennen iskeemistä vaihetta tai jälkihoitoa annettaessa eläimille annetaan ruiskeita 30 minuuttia, 2 tuntia, 4 tuntia ja 6 tuntia iskeemian jälkeen vaikuttavan reperfuusion aikana.

Jotta arvioitaisiin glysiini-/eksitoivien aminohappojen suoraa farmakologista aktiivisuutta tai mahdollista aktiivisuutta, injektoidaan lääkitsemättömiin (naivi) hyppyrottiin joko suolaliuosta tai erilaisia annoksia antagonistia. Käyttäytymismuutoksia arvioidaan käyttämällä valonsädelokomoottoriaktiivisuuskammiota, joka on kahden jalan levyinen pyöreä areena, jossa on valonsäteen detektio. Kammiot on sijoitettu suljettuun koteloon ja kohinaa vaimennetaan käyttämällä sekä valkoisen taustakohinan generaattoria ja tuuletinta. Eläimet pannaan näihin kammioihin farmakologisen evaluoinnin alussa 6 tunnin ajaksi ja kunkin tunnin aikana kerätään kokonaisaktiivisuus tietokonesysteemin avulla.

Suolaliuos johtaa aluksi korkeaan aktiivisuuteen; vertailueläimillä ensimmäisen tunnin aktiivisuustaso on noin 1600 lukemaa. Tämä vertailuaktiivisuustaso on tyypillinen hyppyrotille näissä koeolosuhteissa. Kokeen edetessä eläinten tutkiva aktiivisuus vähenee ja viimeisellä jaksolla aktiivisuus laskee noin 250 lukemaan tunnissa. On oletettavissa, että tämän keksinnön glysiini-/eksitatiivisilla aminohappoantagonisteilla ei tule olemaan merkittävää vaikutusta tutkivan käyttäytymisen määrään alussa eikä lopussa.

Seuraavassa glysiini-/eksitoivien aminohappojen antagonistien arviointivaiheessa hyppyrottia esihoidetaan vaihtelevilla antagonistiannoksilla ja altistetaan sitten viideksi minuutiksi kaksipuoliselle kaulavaltimon sulkemiselle. Alun reperfuusion jälkeen eläimet pannaan ympyränmuotoiseen

lokomoottoriaktiivisuuskoelaitteeseen ja aktiivisuutta mitataan reperfuusion jälkeen ensimmäisen tunnin alusta seuraavien neljän tunnin ajan.

Vertailueläimillä, joita ei altisteta iskeemialle eikä anneta suolaliuosruiskeita ennen niiden laittamista lokomoottoriaktiivisuus kammioon, ei ole luonteenomaista aktiivisuuskuviota, jossa lokomoottoriaktiivisuus on ensimmäisen tunnin aikana huomattavasti korkeampi kuin kaikkien muiden tuntien aikana ja laskee asteittain neljän tunnin kuluessa hyvin alhaiseen arvoon. Vastakohtana tälle aktiivisuuden asteittaiselle laskulle neljän tunnin koejakson aikana on vertailueläimillä, jotka on altistettu viideksi minuutiksi kuorikerroksen iskeemialle, täysin erilainen lokomoottoriaktiivisuuskuvio. Ensimmäisen tunnin aika aktiivisuus laskee merkittävästi, jonka jälkeen seuraa asteittainen kasvu, jolloin aktiivisuus on neljän tunnin aikana kymmenen kertaa korkeampi kuin eläimillä, joita ei ole altistettu kaulavaltimon sulkemiselle. Nämä tulokset ovat tavanomaisia ja luotettava tulos niistä muutoksista, joita viiden kahdenpuolinen päänvaltion tukkiminen hyppyrotissa aiheuttaa.

Erillisiä hyppyrottaryhmiä esihoidetaan keksinnön glysiini-/eksitoivien aminohappojen antagonisteilla 30 minuuttia ennen kaulavaltimon tukkimista ja pannaan sitten lokomoottoriaktiivisuuskammioon tunnin ajan uudelleen avaamisen jälkeen. Odotetaan, että hyppyrottien esihoito keksinnön glysiini-/eksitoivien aminohappojen antagonisteilla estää sekä iskeemian jälkeistä aktiivisuuden laskua ja kasvua. Iskeemian jälkeisten aktiivisuuden laskujen oletetaan olevan likimain nolla ensimmäisen tunnin ajan uudelleen avaamisen jälkeen. Odotetaan, että esihoito keksinnön glysiini-/eksitoivien aminohappojen antagonisteilla estää iskeemian jälkeistä käyttäytymisen stimuloitumista.

Kun yksittäisannosesihoitojen arvioinnit on suoritettu, testataan hyppyrotilla myös keksinnön glysiini-/eksitoivien

aminohappojen antagonistien useita ruiskeita. Annos annetaan i.p. 6 tuntia, 4 tuntia, 2 tuntia ja 30 minuuttia ennen 5 minuutin iskeemiaa.

24 tunnin kuluttua arvioitiin kaikkien eläinten käyttäytymiseroa partioinnissa käyttäen kahdeksanhaaraista säteittäistä sokkeloa. Tässä menettelytavassa eläimet pannaan keskellä olevaan aloituskammioon, este poistetaan ja mitataan kulunut aika ja eläinten tekemien virheiden lukumäärä siihen asti, että sokkelon kaikki 8 haaraa on tutkittu. Virheeksi määritellään eläimen käynti uudelleen haarassa koko vartalonsa mitan verran lukuunottamatta häntää. Mikäli eläin on itsepintainen tai poistu haarasta yli viiteen minuuttiin, koe lopetetaan. Eläinten vertailujoukossa virheiden lukumäärä sokkeloa tutkittaessa ilman aiempaa kokemusta (naiveilla eläimillä) on noin kuusi virhettä. Tämä on 28 hyppyrotan, N=28, keskiarvo. 5 minuutin kaksipuolisen kaulavaltimon sulkemisen ja 24 tunnin testauksen kuluttua hyppyrotat tekevät keskimäärin 21 virhettä. Esihoidettaessa eläimiä keksinnön glysiini-/eksitoivien aminohappoantagonisteilla odotetaan, että tehtyjen virheiden määrässä tapahtuu merkittävä vähentyminen. Odotetaan myös, että säteittäishaaraisessa sokkelossa tehtävään suoritukseen aiheutuvissa käyttäytymismuutoksissa tapahtuu merkittävä vähentyminen.

Odotetaan myös, että jälkihoito keksinnön glysiini-/eksitatiivisillä aminohappoantagonisteilla vähentää lyhytaikaista muistinhuononemista 24 tuntia iskeemian/uudelleenvirtauksen jälkeen.

5 minuutin kaksipuolisen kaulavaltimon sulkemisen vaikutuksia hermosolujen kuolemaan selkäpuolen aivokuoren taitteessa (engl. *dorsal hippocampus*) voidaan arvioida eläimissä 7 päivää iskeemian reperfuusiovaurion jälkeen. Aiemmat tutkimukset ovat osoittaneet, että neuronaalinen rappeuma alkaa noin 3 päivää aivoiskeemian jälkeen. Seitsemässä

päivässä niille neuroneille, joihin vaikutus on kohdistunut, tapahtuu sytolyysi ja ne joko rappeutuvat täydellisesti tai näkyvät selvästi tummina solutumina ja paikaltaan siirtyneinä tumina tai soluina, joissa on eosinofiilinen sytoplasma ja pyknoottinen tuma. Viiden minuutin iskeemian aiheuttama vamma rajoittuu pääasiassa aivokuoren taitteen selkäpuolelle aivokuoren taitteen CA1-alueella. Tuntoalueen välissä oleva sivuttaissuuntainen alue (engl. *intermedial lateral zone of the horn*) on vahingoittumaton ja hammaslaitainen aivopoimu ja/tai CA3:ssa olevat solut eivät ole patologisia. Hyppyrotat nukutetaan seitsemäntenä iskeemian jälkeisenä päivänä 60 mg/kg pentobarbitaalia. Aivoille kaadetaan transkardiaalisti jääkylmää suolaliuosta ja sen jälkeen puskuroitua paraformaldehydia (10 %). Aivot poistetaan, upotetaan ja niistä otetaan leikkeitä. Leikkeet värjätään hematoksyliini-eosiiniä ja hermosolujen lukumäärät määritetään hermosolutumia/100 mikrometriä. Normaaleilla vertailueläimillä (joita ei ole altistettu iskeemiselle reperfuusiovammalle) ei näy mitään merkittäviä muutoksia normaalissa tumatiheydessä tällä aluella. Altistus viideksi minuutiksi kaksipuoliselle kaulavaltimon sulkemiselle johtaa tumien lukumäärän merkittävään laskuun CA1-alueella. Yleensä tämä vamma johtaa paikoittaiseen kuolioon yhtenäisen kuolion sijasta, joka havaitaan käytettäessä 10 minuutin iskeemiaa. On odotettavissa, että esihoito keksinnön glysiinireseptorin antagonisteilla suojaa aivokuoren taitetta (hippocampus) neuronirappeumalta merkittävästi.

Tiedetään, että NMDA-reseptoreilla on tärkeä osa jatkuvan kivun kehittymisessä hermo- ja kudosvaurion jälkeen. Kudosvaurion, kuten sellaisen, joka seuraa koe-eläimen takakäpälään ihonalaisesti injektoidusta formaliinista, on osoitettu aiheuttavan välittömän nousun selkäytimen glutamaatti- ja aspartaattipitoisuuksissa (Skilling, S.R., *et al.*, *J. Neurosci.* 10:1309-1318 (1990)). NMDA-reseptorin salpaajien antaminen vähentää selkäytimen selän tuntohermosolujen vastetta formaliiniruiskeeseen (Dickenson ja Aydar,

Neuroscience Lett. 121: 263-266 (1991); Haley, J.E., *et al., Brain Res. 518*:218-226 (1990)). Nämä selän tuntohermosolut ovat kriittisen tärkeitä kuljetettaessa kipusignaalia selkäytimestä aivoihin ja näiden neuronien vähentynyt vaste osoittaa koe-eläinten havaitseman kivun vähentymistä, joka kipu on aiheutettu ihonalaisella formaliiniruiskeella.

Koska on havaittu, että NMDA-reseptorin antagonistit pystyvät salpaamaan ihonalaisen formaliiniruiskeen aiheuttamat selän tuntohermosolujen vasteet, on NMDA-reseptoriantagonisteilla mahdollista kykyä kroonisen kivun hoidossa, kuten sellaisen kivun hoidossa, jota aiheutuu kirurgiasta, amputoinnista (aavekipu) tai muista haavoista (haavakipu). Tavanomaisten NMDA-antagonistien, kuten MK801:n tai CGS19755, käyttöä kroonisen kivun ehkäisyssä tai hoidossa rajoittavat kuitenkin suuresti ne haitalliset PCP:n kaltaiset käyttäytymissivuvaikutukset, joita nämä lääkkeet aiheuttavat. On odotettavissa, että tämän keksinnön kohteena olevat glysiinireseptorin antagonistit ovat erittäin tehokkaita estämään eläinten takakäpälän ihon alle injektoidun formaliinin aiheuttamaa kroonista kipua hiirissä. Koska on odotettavissa, että tämän keksinnön glysiini-/eksitoivien aminohappojen antagonisteilla ei ole PCP:n kaltaisia sivuvaikutuksia, ovat nämä lääkkeet erittäin käyttökelpoisia ennaltaehkäistäessä tai hoidettaessa kroonista kipua ilman, että ne aiheuttavat PCP:n kaltaisia haitallisia käyttäytymissivuvaikutuksia.

Tämän keksinnön glysiinireseptorin antagonistien vaikutuksia voidaan arvioida seuraavasti. Swiss-Webster-uroshiiriä, jotka painavat 25 - 35 g, pidetään viisi häkissä siten, että niillä on vapaa pääsy ruokaan ja veteen, ja niitä pidetään 12 tunnin valokierrossa (valo alkaa klo 8). Glysiinireseptorin antagonistia liuotetaan DMSO:iin 1 - 40 ja 5 - 40 mg/ml pitoisuuksina, vastaavassa järjestyksessä. DMSO:a käytetään vehikkelivertailuaineena. Kaikki lääkkeet injektoidaan intraperitonaalisesti (1 µl/g). Formaliinikoe suoritetaan aiemmin

selitetyn mukaisesti (Dubuisson ja Dennis, *Pain* 4:H161-174 81977)). Hiiriä tarkaillaan pleksilasisylinterissä, jonka halkaisija on 25 cm ja korkeus 30 cm. Yhden käpälän pohjaan injektoidaan ihonalaisesti 20 µl 5 % formaliinia. Kipuaste määritetään mittaamalla sitä aikaa, jonka eläin viettää nuolemassa formaliinilla injektoitua käpälää eri aikaväleillä: 0 - 5', 10'-15' ja 10'-15' ja 15'-50' (myöhäinen vaihe). Jotta testattaisiin, estävätkö glysiini-/eksitoivien aminohappojen antagonistit koe-eläimissä kroonista kipua, vehikkeliä (DMSO) tai vehikkeliin liuotettuja lääkkeitä injektoidaan 1 - 40 mg/kg annoksina vatsaontelon sisäisesti 30 minuuttia ennen formaliiniruisketta. Kullekin lääkeannokselle tai vehikkelivertailukokeelle käytetään vähintään kuusi eläintä.

On odotettavissa, että glysiinireseptorin antagonistien injektoiminen 30 minuuttia ennen formaliiniruiskeen antamista takakäpälään vähentää merkittävästi formaliinin aiheuttamaa kroonista kipua annoksesta riippuvalla tavalla, mikä on määritettävissä sen ajan lyhentymisenä, jonka hiiri viettää nuollen formaliinilla injektoitua takakäpälää, ja mikä johtuu glysiini-/eksitoivien aminohappojen antagonistin annosten kasvusta.

Lääkealalla on tunnettua käyttää opiaatteja, esim. morfiinia, kivun lievittämiseen. (Tässä yhteydessä käytettynä termillä "opiaatit" tarkoitetaan mitä tahansa oopiumvalmisteita tai -johdannaisia, etenkin oopiumiin luonnollisesti sisältyviä alkaloideja, joita ovat esim. morfiini, noskapiini, kodeiini, papaveriini ja tebaiini, ja niiden johdannaiset). Valitettavasti keho jatkuvan käytön myötä alkaa tottua opiaatteihin eivätkä lääkkeen kipua lievittävät ominaisuudet enää ole tehokkaita. Lisäksi suuremmat morfiiniannokset voivat johtaa hengityksen lamaantumiseen, mikä voi aiheuttaa hengityspysähdyksen. Viimeaikaisten tutkimusten mukaan NMDA-reseptorilla olisi mukauttava vaikutus morfiinin sietoon. Nyt on havaittu, että kinoksaliinidionien antaminen voi estää opiaatteihin

tottumista salpaamalla glysiinin koagonistipaikan, joka liittyy NMDA-reseptoriin.

Tämän keksinnön alueeseen kuuluvat koostumukset, jotka sisältävät tämän keksinnön yhdisteitä tehollisina määrinä aiotun tarkoituksensa toteuttamiseen. Koska yksilölliset tarpeet voivat vaihdella, pystyy ammattimies määrittämään kunkin aineosan tehollisen määrän optimialueen. Tavallisesti yhdisteitä voidaan antaa nisäkkäille, esim. ihmisille, suun kautta annoksina, jotka vaihtelevat 0,0025 - 50 mg/kg päivässä, tai vastaavana määränä niiden farmaseuttisesti hyväksyttävää suolaa, ahdistusoireiden vuoksi hoidettavan nisäkkään ruumiinpainoa kohden, joita ahdistusoireita ovat esim. yleinen ahdistus, fobiat, pakkomielteet, paniikkihäiriö ja tapaturman jälkeiset rasitustilat. Edullisesti annetaan suun kautta noin 0,01 - 10 mg/kg sellaisten häiriöiden hoitoon tai ennaltaehkäisyyn. Lihaksen sisäisissä ruiskeissa annos on yleensä noin puolet suun kautta annettavasta annoksesta. Esimerkiksi ahdistuksen hoitoon tai ehkäisyyn on lihaksen sisälle annettava sopiva annos noin 0,0025 - 15 mg/kg ja edullisimmin noin 0,01 - 10 mg/kg.

Menetelmässä iskeemiaan, aivo- ja selkäydinvaurioihin, hypoksiaan, hypoglykemiaan ja kirurgiaan sekä Alzheimerin taudin, amyotrooppisen lateraaliskleroosin, Huntingtonin taudin ja Downin syndrooman liittyvien neuronihäviöiden hoitamiseksi tai ehkäisemiseksi, tai menetelmässä sellaisen sairauden hoitamiseksi, jossa patofysiologisen häiriön eksitoivien aminohappojen tai NDMA-reseptori-ionikanavan yliaktiivisuuteen liittyy neurotoksisuutta tai psykoosia, keksinnön farmaseuttiset koostumukset voivat sisältää tämän keksinnön yhdisteitä yksikköannoksen ollessa noin 0,01 - 50 mg/kg tai vastaava määrän keksinnön yhdisteen farmaseuttisesti hyväksyttävää suolaa, hoidon tapahtuessa 1 - 4 kertaa päivässä. Käytettäessä keksinnön yhdisteitä kroonisen kivun hoitoon tai anestesian aikaansaamiseen niitä voidaan antaa yksikköannoksen ollessa noin 0,01 - 50 mg/kg kehon

painoa, tai vastaava määrä niiden farmaseuttisesti hyväksyttävää suolaan, hoidon tapahtuessa 1 - 4 kertaa päivässä. On tietenkin selvää, että tarkka hoitopitoisuus riippuu hoidettavan eläimen, esim. ihmisen, tapaushistoriasta. Ammattimies voi määrittää tarkan hoitopitoisuuden ilman liiallisia kokeita.

Suun kautta annettava yksikköannos voi sisältää yhdistettä noin 0,01 - 50 mg, edullisesti noin 0,1 - 10 mg. Yksikköannos voidaan antaa yhden tai useamman kertaa päivässä yhtenä tai useampana tablettina, joista kukin sisältää noin 0,1 - 10, edullisesti noin 0,25 - 50 mg, yhdistettä tai sen solvaatteja.

Sen lisäksi, että yhdistettä annetaan raakakemikaalina, voidaan keksinnön yhdisteitä antaa osana lääkevalmistetta, joka sisältää farmaseuttisesti hyväksyttäviä kantajia, jotka sisältävät täyte- ja lisäaineita, jotka helpottavat yhdisteiden työstämistä valmisteiksi, joita voidaan käyttää farmaseuttisesti. Edullisesti valmisteet, etenkin ne valmisteet, joita annetaan suun kautta ja joita voidaan käyttää edullista annosmuotoa varten, kuten tabletteihin, rakeisiin ja kapseleihin, ja valmisteisiin, joita voidaan antaa peräsuolen kautta, kuten peräpuikkoihin, sekä ruiskeina tai suun kautta annettavaksi sopiviin liuoksiin, sisältävät noin 0,01 - 99 prosenttia, edullisesti noin 0,25 - 75 prosenttia aktiivista yhdistettä (aktiivisia yhdisteitä), yhdessä täyteaineen kanssa.

Tämän keksinnön alaan kuuluvat myös tämän keksinnön yhdisteiden farmaseuttisesti hyväksyttävät suolat, jotka eivät ole myrkyllisiä. Emäksisiä suoloja muodostetaan sekoittamalla tämän keksinnön tarkoittama 1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni farmaseuttisesti hyväksyttävän myrkyttömän emäksen, kuten natriumhydroksidin, kaliumhydroksidin, natriumbikarbonaatin, natriumkarbonaatin tai aminoyhdisteen kuten koliinihydroksidin, tris-, bis-tris-, N-metyyliglukamiinin,

arginiin ja vastaavien liuosten kanssa. Katso yhdysvaltalainen patenttihakemussarja nro. 08/148,268, *supra*.

Keksinnön lääkeainekoostumuksia voidaan antaa mille tahansa elävälle olennolle, jolle keksinnön yhdisteistä voi olla etua. Etenkin sellaisia eläviä olentoja ovat ihmiset, vaikkakaan keksintöä ei ole tarkoitettu rajoittumaan siihen.

Tämän keksinnön lääkeainekoostumuksia voidaan antaa millä tahansa tavalla, jolla saavutetaan haluttu tarkoitus. Esimerkiksi annostelu voi tapahtua parenteraalisti, ihonalaisesti, suonensisäisesti, lihaksensisäisesti, vatsakalvon sisäisesti, ihon läpi, suun tai silmän kautta. Vaihtoehtoisesti tai samanaikaisesti voidaan antaa myös suun kautta. Annoskoko riippuu vastaanottajan iästä, terveydentilasta ja massasta, mahdollisen samanaikaisen hoidon tyypistä ja hoidon taajuudesta sekä toivotun vaikutuksen luonteesta.

Annettaessa keksinnön koostumuksia silmän kautta, voidaan päästä joko paikalliseen tai systeemiseen antoon. Tämän keksinnön koostumuksia voidaan esimerkiksi antaa sellaisten silmätippojen muodossa, jotka ovat käytännössä katsoen isotoonisia kyynelnesteen kanssa, jolloin saavutetaan systeeminen anto. Sellaiset koostumukset sisältävät myös edullisesti läpäisyä vahvistavia aineita, jotka auttavat tämän keksinnön yhdisteiden systeemistä absorptiota. Katso esim. yhdysvaltalainen patentti nro. 5,182,258. Vaihtoehtoisesti keksinnön koostumuksia voidaan antaa silmän kautta silmähermon rappeuman hoitamiseksi tai ennaltaehkäisemiseksi. Tässä suoritusmuodossa tämän keksinnön ydhisteitä annetaan silmätippojen muodossa edellä esitetyn mukaisesti tai niitä voidaan injektoida lähelle näköhermoa. Vaihtoehtona voidaan käyttää ohuita silmäimplantteja, jotka vapauttavat hitaasti tämän keksinnön yhdisteitä.

Farmakologisesti aktiivisten yhdisteiden lisäksi uuden lääkeainevalmisteet voivat sisältää sopivia farmaseuttisesti

hyväksyttäviä kantaja-aineita, jotka sisältävät täyte- ja lisäaineita, jotka helpottavat aktiivisten yhdisteiden työstämistä valmisteiksi, joita voidaan käyttää farmaseuttisesti.

Tämän keksinnön farmaseuttiset valmisteet valmistetaan sinänsä tunnetulla tavalla, esimerkiksi käyttämällä tavanomaisia sekoitus-, rakeistus-, pilleröinti-, liuotus tai lyofilisointimenetelmillä. Suun kautta käytettäviä lääke-ainevalmisteita voidaan siis saada yhdistämällä aktiivisia yhdisteitä kiinteiden täyteaineiden kanssa, mahdollisesti jauhamalla tuloksena saatava seos ja työstämällä raeseos haluttaessa tai tarvittaessa sopivien lisäaineiden lisäämisen jälkeen tableteiksi tai pilleriytimiksi.

Sopivia täyteaineita ovat etenkin fillerit, kuten sakkaridit, esimerkiksi laktoosi tai sukroosi, mannitoli tai sorbitoli, selluloosavalmisteet ja/tai kalsiumfosfaatit, esimerkiksi trikalsiumfosfaatti tai kalsiumvetyfosfaatti sekä sideaineet kuten tärkkelyspasta, jossa käytetään esimerkiksi maissi-, vehnä-, riisi-, perunatärkkelystä, gelatiinia, tragakanttia, metyyliselluloosaa, hydroksipropyylimetyyliselluloosaa, natriumkarboksimetyyliselluloosaa ja/tai polyvinyylipyrrolidonia. Haluttaessa voidaan lisätä disintegroivia aineita kuten edellä mainittuja tärkkelyksiä ja myös karboksimetyylitärkkelystä, ristisilloitettua polyvinyylipyrrolidonia tai algiinihappoa tai sen suolaa, kuten natriumalginaattia. Lisäaineet ovat ennenkaikkea virtausta sääteleviä aineita ja voiteluaineita, esimerkiksi silikaa, talkkia, steariinihappoa tai sen suoloja kuten magnesiumstearaattia tai kalsiumstearaattia, ja/tai polyetyleeniglykolia. Pilleriytimet varustetaan sopivilla pinnoitteilla, jotka niin haluttaessa kestäviä mahanesteitä. Tähän tarkoitukseen voidaan käyttää konsentroituja sakkaridiliuoksia, jotka valinnaisesti voivat sisältää arabikumia, talkkia, polyvinyylipyrrolidonia, polyetyleeniglykolia ja/tai titaanidioksidia, lakkaliuoksia, ja sopivia orgaaniliuoksia tai liuotinseoksia. Mahanesteitä

kestävien pinnoitteiden valmistamiseen käytetään sopivien selluloosavalmisteiden liuoksia kuten asetyyliselluloosaftalaattia tai hydroksipropyylimetyyliselluloosaftalaattia. Tabletteihin tai pilleripinnoitteisiin voidaan lisätä väriaineita tai pigmenttejä esimerkiksi tunnistamista varten tai aktiivisen yhdisteen annosten yhdistelmien merkitsemiseksi.

Muita lääkeainevalmisteita, joita voidaan käyttää suun kautta, ovat gelatiinista valmistetut limittäin työnnetyt (push-fit) kapselit sekä pehmeät, suljetut gelatiinista ja pehmittimistä kuten glyserolista tai sorbitolista valmistetut kapselit. Limittäin työnnetyt kapselit voivat sisältää aktiivisia yhdisteitä rakeina, joihin voidaan sekoittaa täyteaineita kuten laktoosia, sideaineita kuten tärkkelyksiä ja/tai voiteluaineita kuten talkkia tai magnesiumstearaattia ja valinnaisesti stabilisaattoreita. Pehmeissä kapseleissa aktiiviset yhdisteet edullisesti liuotetaan tai suspentoidaan sopiviin nesteisiin kuten rasvahappoihin tai nestemäiseen parafiiniin. Lisäksi voidaan lisätä stabilisaattoreita.

Peräaukon kautta käytettäviin mahdollisiin lääkeainevalmisteisiin kuuluvat esimerkiksi peräpuikot, jotka sisältävät yhden tai useamman aktiivisen yhdisteen yhdistelmänä peräpuikkoperusmateriaalin kanssa. Sopivia peräpuikko perusmateriaaleja ovat esimerkiksi luontaiset tai synteettiset triglyseridit tai parafiinihiilivedyt. Lisäksi on mahdollista käyttää gelatiiniperäaukkokapseleita, jotka koostuvat aktiivista yhdisteistä yhdistelmänä perusmateriaalin kanssa. Mahdollisiin perusmateriaaleihin kuuluvat esimerkiksi nestemäiset triglyseridit, polyetyleeniglykolit tai paraffiinihiilivedyt.

Sopivia koostumuksia parenteraalia antoa varten ovat aktiivisten yhdisteiden vesiliukoisten muotojen vesiliuokset, esimerkiksi vesiliukoisten suolojen ja emäksisten liuosten vesiliuokset. Lisäksi voidaan antaa aktiivisten yhdisteiden suspensioita sopivina öljyisinä injektiosuspensioina.

Sopiviin lipofiilisiin liuottimiin tai vehikkeleihin kuuluvat rasvaöljyt, esimerkiksi seesamöljy tai synteettiset rasvahappoesterit, esimerkiksi etyylioleaatti tai triglyseridit tai polyetyleeniglykoli-400 (yhdisteet liukenevat PEG-400:aan). Injektoitavat vesisuspensiot voivat sisältää aineita, jotka lisäävät suspension viskositeettia, esimerkiksi natriumkarboksimetyyliselluloosaa, sorbitolia ja/tai dekstraania. Valinnaisesti suspensio voi myös sisältää stabilisaattoreita.

Glysiinisitoutumispaikkojen karakterisointi *in vitro* on ollut vaikeaa selektiivisten lääkeligandien puutteen vuoksi. Tämän keksinnön glysiiniligandeja voidaan siten käyttää glysiinisitoutumispaikkojen karakterisointiin. Erityisen edullisia yhdisteitä tähän tarkoitukseen ovat radioaktiivisilla isotoopeilla leimatut johdannaiset, esim. sellaiset, joissa yksi tai useampi atomi on korvattu ^{3}H:lla, ^{11}C:llä, ^{14}C:llä, ^{15}N:llä tai ^{18}F:lla. Esimerkkejä edullisista fotoaffiniteettiligandeista ovat ^{3}H- tai ^{18}F-substituoitu 6-atsido-5,7-difluori-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni ja ^{3}H-substituoitu 6-atsido-5,7-dikloori-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni.

Seuraavat esimerkit ovat tämän keksinnön menetelmää ja koostumuksia kuvaavia mutta eivät rajoittavia. Muut sopivat ja ammattimiehelle itsestäänselvät muutokset ja mukautukset kliinisessä terapiassa normaalisti tavattaviin olosuhteisiin ja parametreihin kuuluvat keksinnön henkeen ja alaan.

Esimerkit

Esimerkki 1

6,7-difluori-5-nitro-1,4-dihydro-2,3-kinoksaliinidionin valmistus

6,7-difluori-1,4-dihydro-2,3-kinoksaliinidionin valmistus

Menetelmä 1.

4,5-difluori-1,2-diaminobentseeni. 4,5-difluori-1,2-diaminobentseeniä valmistettiin Tsuji'n *et al.*, (Tsuji, Y. *et al.*, *J. Org. Chem.* 55:580 (1990)). Zn-jauhe (942 mg, 14,4 mmol), $CaCl_2$ (94,4 mg), H_2O (1 ml) ja 4,0 ml EtOH yhdistetään ja tuodaan kiehumispisteeseenkuten on selitetty 4-fluori-1,2-diaminobentseenille (katso esimerkki 11) ja tähän seokseen lisätään hitaasti tipoittain 4,5-difluori-2-nitroaniliinia (200 mg, 1,15 mmol) 2 millilitrassa EtOH:a. Analyysi ja työskentely olivat 4-fluori-1,2-diaminobentseenille selitetyn mukaiset (Esimerkki 11) paitsi, että reaktioseos liuotettiin 5 millilitraan H_2O:a ja liuos uutettiin 3 kertaa 10 millilitralla Et_2O:a. Orgaaniset kerrokset yhdistettiin ja käsiteltiin aktiivihiilellä, kuivattiin ($MgSO_4$) ja suodatettiin Celite-täytteen läpi. Liuotin haihdutettiin alennetussa paineessa, jotta saatiin 111,5 mg (67,3 %) ruskeaa, kiteistä kiinteää ainetta. ^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ 3,34 (bs, 4H, NH_2), 6,53 (t, 2H, ArH).

6,7-difluori-1,4-dihydro-2,3-kinoksaliinidioni. Otsikon yhdiste (Sarges, R. *et al.*, *J. Med. Chem.* 33:2240 (1990)) valmistettiin käyttäen Cheesemanin menetelmän mukaelmaa. (Cheeseman, G.W.H. *J. Chem. Soc.* 1171 (1962)). Dietyylioksalaatin (1,11 g, 7,63 mmol) ja 4,5-difluori-1,2-diaminobentseeniä (110 mg, 0,763 mmol) kuumennettiin kiehumispisteeseen N_2-kehässä 2 h ajan. Reaktioseoksen annettiin jäähtyä huoneenlämpötilaan ja kiintoaine kerättiin tyhjösuodatuksella, huuhdottiin heksaaneilla ja kuivattiin ilmassa. Harmaanruskea kiinteä aine kiteytettiin uudelleen 20 millilitrasta EtOH:a ja ruskean valkoiset kiteet kerättiin tyhjösuodatuksella ja kiteet kuivattiin tyhjössä (66,5 Pa, 25 °C), jolloin saatiin 45,3 mg (30,0 %) tuotetta; sulamispiste >360 °C (kirjall. >310 °C); ^{1}H-NMR (d_6-asetoni) δ 7,19 (t, 2H, ArH, J_{H-F} = 9,3) 10, 9 (bs, 2H, NH).

Menetelmä 2

Liuokseen, jossa on 2,0 g (11,5 mmol) 4,5-difluori-2-nitroaniliinia (Aldrich, käytetty sellaisenaan) EtOH:ssa (20 ml), lisättiin 100 mg 10 % Pd/C. Suspensiota ravisteltiin H_2-kehässä (275,6 kPa - 137,8 kPa) 3 tunnin ajan. Katalyytti poistettiin suodattamalla ja pestiin EtOH:lla (2 x 15 ml). EtOH-liuos pyöröhaihdutettiin kuiviin. Jäljelle jääneeseen mustaan kiintoaineeseen lisättiin oksaalihappodihydraattia (1,74 g, 13,8 mmol) ja 2 M HCl-vesiliuosta (18 ml). Seosta kuumennettiin 125 °C:ssa sekoittaen 3 tunnin ajan ja jäähdytettiin sitten 25 °C:een. Musta saostuma kerättiin tyhjösuodatuksella ja pestiin vedellä (5 x 5 ml). Märkä tuote liuotettiin 0,2 M NaOH-vesiliuokseen (100 ml) sekoittaen ja suodatettiin sitten. Kirkas, hieman oranssinkeltainen suodos tehtiin happamaksi lisäämällä 2 M HCl-vesiliuosta sekoittaen pH-arvoon 4. Taitetun valkoinen saostuma kerättiin vakuumisuodatuksella, pestiin vedellä ja kuivattiin 1 mm Hg paineessa, 40 °C:ssa, jolloin saatiin 1,83 g (89 %) otsikon yhdistettä kermanvärisenä jauheena. Sulamispiste 360 °C. IR (KBr) 3454, 3120, 1708, 1530, 1400, 1298 cm^{-1}. ^{1}H-NMR (DMSO-d_6) 11,939 (s, 2H), 7,054 (m, 2H).

6,7-difluori-1,4-dihydro-2,3-kinoksaliinidionien (837 mg, 4,23 mmol) suspensioon trifluorietikkahapossa (30 ml) lisättiin KNO_3 (512 mg, 5,07 mmol). Seosta sekoitettin 55 °C:ssa 20 tunnin ajan. Tämän ajan päättyessä lisättiin 256 mg (2,50 mmol) KNO_3:a ja reaktioseosta sekoitettiin 55 °C:ssa 20 tunnin ajan. Reaktioseos pyöröhaihdutettiin sitten kuiviin. Jäljelle jääneeseen kiintoaineeseen lisättiin sitten jääkylmää vettä (noin 15 ml). Kiintoaine kerättiin vakuumisuodatuksella, pestiin jääkylmällä vedellä (5x15 ml) ja kuivattiin 40 °C:ssa 133 Pa:n paineessa 14 tunnin ajan, jolloin saatiin 700 mg (68 %) otsikon yhdistettä keltaisena jauheena. Sulamispiste 288-290 °C. IR (KBr) 4324, 3226, 1752, 1717, 1554, 1304 cm^{-1}, ^{1}H-NMR (DMSO-d_6): 12,249 (s, 1H) 11,864 (bs, 1H), 7,330 (dd, 1H, J=10,5, 7,8 Hz). $C_8H_3F_2N_3O_4$-analyysi, laskettu: C: 9,50, H: 1,24, N: 17,29; havaittu: C: 39,42,

H:1,26, N: 17,08.

Esimerkki 2

5,6,7-trifluori-1,4-dihydro-2,3-kinoksaliinidionin valmistus

2,3,4-trifluoriasetanilidi. 2,3,4-trifluoroaniliinin (1,04 g, 9,45 mmol) vaaleanpunaiseen kloroformiliuokseen (12 ml) lisättiin etikkahappoanhydridiä (1,63 g, 16,0 mmol), jolloin saatiin heikosti vaaleanpunainen liuos, jota sekoitettiin yön yli typessä. Kloroformi poistettiin tyhjössä, jolloin saatiin 1,35 g ()) %) asetanilidia valkoisena kiinteänä aineena: ^{1}H-NMR ($CDCl_3$), 2,28 (s, 3H), 6,95 (m, 1H), 7,31 (m, 1H), 7,97 (m, 1H).

3,4,5-trifluori-1,2-fenyleenidiamiini. 2,3,4-tri-fluoriasetanilidiin (1,35 g, 7,09 mmol) lisätään väkevää rikkihappoa (8 ml). Pullon ollessa jäähauteessa lisätään hitaasti KNO_3:a, jolloin saadaan ruskea seos, jotak sekoitetaan yön yli. Reaktioseosta, joka on nyt tumman punainen, lisätään jääveteen (45 ml), jolloin saadaan välittömästi oranssi saostuma. Haihtuva yhdiste, joka on oletettavasti 2,3,4-trifluori-6-nitroaniliinia, liuotetaan etyyliasetaattiin (18 ml) ja etyylialkoholiin (12 ml). Oranssiin liuokseen lisätään tinakloridididihydraattia (7,6 g, 34 mmol). Tuloksena saatavaa seosta sekoitetaan ja kuumennetaan kiehumispisteeseen N_2-kehässä 4 tunnin ajan. Seos lisätään jääveteen (40 ml) ja tehdään emäksiseksi 2 M NaOH:lla (40 ml). Se uutetaan etyyliasetaatilla (3 x 20 ml) ja yhdistetyt uutteet pestään vedellä (20 ml) ja suolavedellä (20 ml). Tämä tummanpunainen liuos kuivataan ($MgSO_4$) ja haihdutetaan, jolloin saadaan 285 mg (25 %) diamiinia tummanpunaisena kiinteänä aineena. ^{1}H-NMR ($CDCl_3$), 3,22 (bs, 2H), 3,46 (bs, 2H), 6,32 (m, 1H).

5,6,7-trifluori-1,4-dihydro-2,3-kinoksaliinidioni. Ruskeaan 3,4,5-trifluori-1,2-fenyleenidiamiinin (285 mg, 1,75 mmol) liuokseen 2 M HCl:ssa (10 ml) lisätään oksaalihappoa (221 mg, 1,75 mmol). Tuloksena saatava ruskea seos kuumennetaan kiehumispisteeseen ja sekoitetaan N_2-kehässä yön yli. Seos suodatetaan, jolloin saadaan 139 mg (37 %) otsikon yhdistettä puhdistamattomana. Analyysiä varten valmistetaan näyte liuot-

tamalla 42 mg tätä ruskeaa jauhetta 2,5 ml kiehuvaa etanolia. Jäähdytettäessä muodostuu ruskeita, sauvamaisia kiteitä, jotka suodatetaan ja kuivataan tyhjössä, jolloin saadaan 15 mg (36 %) otsikon yhdistettä puhtaana: ^{1}H-NMR (DMSO-d_6), 6,91 (m, 1H), 12,02 (singletti, 1H), 12,19 (singletti, 1H); $C_8H_3F_3N_2O_2$:n analyysin lasketut pitoisuudet: C 44,46; H 1,40; N 12,96. Havaittu: C 44,42; H 1,16; N 12,76.

Esimerkki 3

5-nitro-6,7,8-trifluori-1,4-dihydro-2,3-kinoksaliinidioni

5,6,7-trifluori-1,4-dihydro-2,3-kinoksaliinidioniin (93 mg, 0,43 mmol) lisätään väkevää rikkihappoa (0,5 ml). Kolvin ollessa jäähauteessa lisätään hitaasti KNO_3:a, jolloin saadaan ruskea seos, jota sekoitetaan yön yli. Reaktioseos, joka on nyt tummanpunainen, lisätään sitten jääveteen (5 ml), jolloin saadaan oranssi saostuma, joka kerätään sentrifugoimalla. Jauhe kiteytetään EtOH:sta (5 ml) ja kuivataan tyhjössä, jolloin saadaan 24 mg (10 %) vaalean oransseja mikrokiteitä. ^{1}H-NMR (DMSO-d_6) 11,9 (bs, 1H) 12,6 (bs, 1H).

Esimerkki 4

6-kloori-5,7-difluori-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dionin valmistus

3-kloori-2,4-difluori-(trifluoriasetamido)bentseeni Jäähauteessa olevaan liuokseen, jossa on 10,5 g (64,3 mmol) 3-kloori-2,4-difluorianiliinia 25 millilitrassa dioksaania, lisätään tipoittain 10 ml (14,8 g, 70,4 mmol) trifluorietikkahappoanhydridiä. Liuosta sekoitetaan huoneenlämpötilassa 20 tunnin ajan. Sitten liuos lisätiin 150 ml jäävettä ja seosta sekoitettiin 1 h. Seos suodatettiin, pestiin vedellä ja kuivattiin, jolloin saatiin lähes väritön kiintoaine 16,1 g (96 %); sp. 73 - 74 °C; ^{1}H-NMR ($CDCl_3$), 7,068 (m,1), 7,976 (mb, 1), 8,146 (m, 1).

3-kloori-2,4-difluori-6-nitro-(trifluoriasetamido)bentseeni. Jäähauteessa olevaan liuokseen, jossa on 15,1 g (58,1 mmol) 3-kloori-2,4-difluori-(trifluoriasetamido)-bentseeniä 80 millilitrassa H_2SO_4:ssa, lisättiin tipoittain 10 ml HNO_3:a. Kiinteä saostuma havaittiin lisättäessä HNO_3:as. Seosta sekoitettiin jäähauteessa 4 tunnin ajan ja lisättiin se sitten 600 millilitraan jäävettä. Saostuma suodatettiin, pestiin vedellä ja kuivattiin, jolloin jäljelle jäi lähes väritön kiinteä aine (16,8 g, 95 %); sp 124 - 125; ^{1}H-NMR ($CDCl_3$), 7,69 (dd, 1); 8,936 (mb, 1).

3-kloori-2,4-difluori-6-nitroaniliini. Liuosta, jossa oli 6,35 g (20,8 mmol) 3-kloori-2,4-difluori-6-nitro-(trifluoriasetamido)bentseeniä 60 millilitrassa 7 % K_2CO_3:a metanoli/vesi-seoksessa (3:2), sekoitettiin 25 °C:ssa 4 tunnin ajan. Liuosta haihdutettiin metanolin poistamiseksi. Jäännöksessä havaittiin kiinteä tuote. Jäännös suodatettiin, pestiin vedellä ja kuivattiin, jolloin jäljelle jäi 301 mg kiteistä, keltaista kiinteää ainetta; sp. 96-97 °C; ^{1}H-NMR ($CDCl_3$), 6,07 (mb, 2), 7,815 (dd, 1, J = 1,92, 9,13). Lisää kiintoainetta havaittiin muodostuvan sen jälkeen, kun vettä sisältävän emäliuoksen oli annettu seisoa huoneenlämpötilassa yön yli. Liuos suodatettiin, pestiin vedellä ja kuivattiin, jolloin jäljelle jäi keltainen, kiinteä aine (1,01 g). Emäliuoksesta kiteytyi lisää kiintoainetta. Sitä kerättiin vielä kolme kertaa, jolloin saatiin 2,48 g keltaista kiinteää ainetta. ^{1}H-NMR oli edellä kuvatun tuotteen kanssa yhdenmukainen, kokonaissaannon ollessa 3,80 g (87 %).

4-kloori-3,5-difluori-1,2-fenyleenidiamiini. Liousta, jossa oli 348 mg (1,67 mmol) 3-kloori-2,4-difluori-6-nitroaniliinia ja 1,57 (8,28 mmol) $SnCl_2$:a 8 millilitrassa etanolia, kuumennettiin 70 °C:ssa 2 tunnin ajan. Liuos haihdutettiin etanolin poistamiseksi. Jäännöstä käsiteltiin 2 M NaOH:lla pH-arvoon 13. Havaittiin valkoisen saostuman muodostuminen. Seosta uutettiin $CHCl_3$:lla (3x10 ml). Uute kuivattiin ($MgSO_4$) ja haihdutettiin, jolloin saatiin punainen kiintoaine (285

mg, 95 %); sp 77-78 °C; ^{1}H-NMR ($CDCl_3$), 3,156 (b, 2), 3,704 (b, 2), 6,352 (dd, 1, J = 1,86, 9,96).

6-kloori-5,7-difluori-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni. Seosta, jossa oli 230 mg (1,29 mmol) 4-kloori-3,5-difluori-1,2-fenyleenidiamiinia ja 125 mg (1,38 mmol) oksaalihappoa 4 millilitrassa HCl:a refluksoitiin 3 h ja jäähdytettiin huoneenlämpötilaan. Seos suodatettiin, pestiin vedellä ja kuivattiin, jolloin jäljelle jäi ruskea kiintoaine (245 mg, 82 %); sp > 250 °C; ^{1}H-NMR (DMSO-d_6), 6,921 (dupletti, 1, J = 9,61), 12,143 (singletti,1), 12,168 (singletti,1). MS 232 (M^+, 100), 204 880), 176 (40), 149 (70), 171 880). $C_8H_3{}^{35}ClF_2N_2O_2$:lle laskettu HRMS: 231,9848, havaittu 231,9851.

Esimerkki 5

7-kloori-6,8-difluori-5-nitro-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dionin valmistus

Jäähauteessa pidettyyn liuokseen, jossa oli 120 mg (5,16 mmol) 6-kloori-5,7-difluori-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dionia 1 millilitrassa H_2SO_4:a (97 %), lisättiin annoksittain 60 mg (0,59 mmol) KNO_3:a. Liuosta sekoitettiin huoneenlämpötilassa 14 tunnin ajan ja lisättiin 60 mg KNO_3:a. Liuosta sekoitettiin huoneenlämpötilassa 24 tuntia, laimennettiin sitten jääkylmällä vedellä (4 ml), suodatettiin, pestiin vedellä ja kuivattiin, jolloin saatiin keltaista kiinteää ainetta (94 mg, 65 %). Kiintoaine puhdistettiin NaOH/HCl-saostuksella, jolloin saatiin 63 mg keltaista kiintoainetta; sp. > 250 °C; ^{1}H-NMR (DMSO-d_6), 12,11 (mb, 1), 12,503 (s, 1).

Esimerkki 6

7-fluori-5-nitro-1,4-dihydro-2,3-kinoksaliinidionin valmistus

4-fluori-2,6-dinitroaniliini. Liuosta, jossa oli 4-fluori-2,6-dinitro(trifluoriasetamido)bentseeniä (297 mg, 1,00 mmol) 10 % K_2CO_3:ssa (10 ml), refluksoitiin 1 tunnin ajan ja

jäähdytettiin sitten huoneenlämpötilaan, jotta saatiin keltaisia kiteitä. Liuos suodatettiin ja pestiin kylmällä vedellä (2x1ml), jolloin saatiin 105 mg (52 %) otsikon yhdistettä. ^{1}H-NMR (DMSO-d_6): δ 8,254 (singletti, 2H), 8,460 (d, 2H, J = 8,4).

1,2-diamino-4-fluori-6-nitrobentseeni. Liuosta, jossa oli 4-fluori-2,6-dinitroaniliinia (125 mg, 0,62 mmol) vasta valmistetussa 6 % $(NH_4)_2S$ (5 ml) ja EtOH:ssa (5 ml), refluksoitiin 30 minuutin ajan, laimennettiin vedellä (10 ml) ja pidettiin °C:ssa useita tunteja. Saostuma kerättiin ja pestiin sitten kylmällä vedellä (2 x 1 ml), jolloin saatiin 53 mf (50 %) 1,2-diamino-4-fluori-6-nitrobentseeniä punaisina kiteinä. ^{1}H-NMR ($CDCl_3$: δ 3,619 (s, 2H), 5,724 (s, 2H), 6,732 (dd), 1H, J_1 = 2,4 Hz, J_2 = 8,4 Hz), 7,403 (dd), 1H, J_1 = 2,4 Hz), J_2 = 8,4 Hz).

7-fluori-5-nitro-1,4-dihydro-2,3-kinoksaliinidioni. Seosta, jossa oli 1,2-diamino-4-fluori-6-nitrobentseeniä (80 mg, 0,46 mmol) ja oksaalihappodihydraattia (70 mg, 0,56 mmol, käytettiin sellaisenaan) 4 M HCl:ssa (4 ml) refluksoitiin 120-5 °C:ssa 3 tunnin ajan ja jäähdytettiin sitten huoneenlämpötilaan. Seos sentrifugoitiin ja yläpuolelle jäävä liuos poistettiin. Keltainen kiintoaine pestiin kylmällä vedellä (2x2 ml), otettiin talteen suodattamalla ja kuivattiin tyhjössä 2 tunnin ajan, jolloin saatiin 45 mg (42 %) puhdistamatonta 7-fluori-5-nitro-1,4-dihydro-2,3-kinoksaliinidionia keltaisena jauheena. Puhdistamaton tuote pantiin 1 M NaOH:iin (1 ml) ja suodatettiin. Suodos tehtiin happamaksi pH-arvoon 3, jolloin saatiin 35 mg (33 %) 7-fluori-5-nitro-1,4-dihydro-2,3-kinoksaliinidionia; s.p. 333 - 335 °C (haj.); IR (KBR, c-1): 3427, 3328, 3104, 3072, 1716, 1545. ^{1}H-NMR (DMSO-d_6): δ 12,418 (s, 1H), 7,819 (dd, J_1 = 2,4 Hz, J_2 = 9,0 Hz, 1H), 7,297 (dd, J_1 = 2,4 Hz, J_2 = 9,0 Hz, 1H); korkean erotuskyvyn MS: laskettu $C_8H_4FN_3O_4$ (M^+) m/z: 225,0185; havaittu 225,0188.

Esimerkki 7

6-kloori-7-metyyli-5-nitro-1,4-dihydrokinoksallini-2,3-dionin valmistus

2-kloori-4-fluori-5-nitrotolueeni. 2-kloori-4-fluoritolueenin (2,000 g, 1,383 mmol, Aldrich, käytetty sellaisenaan) liuokseen väkevssä H_2SO_4.ssa 815,0 ml) 0 °C:ssa lisättiin KNO_3:a (1,400 g, 1,385 mmol) yhdessä erässä. Vaalean keltaisen liuoksen annettiin lämmetä 28 °C:een ja sekoitettiin yön yli 28 °C:ssa. Sen jälkeen se kaadettiin jäälle (100 g) ja uutettiin etyyliasetaatilla (2 x 100 ml). Etyyliasetaatti kuivattiin vedettömän Na_2SO_4:n yläpuolella, poistettiin tyhjössä ja tuloksena saatu öljy kuivattiin vielä tyhjössä, jotta saatiin 2,085 g (80 %) otsikon yhdistettä öljynä, jota käytettiin sellaisenaan seuraavassa reaktiossa; ^{1}H-NMR ($CDCl_3$): δ 2,422 (s, 3H), 7,325 (d, 1H, J_1 = 10,2 Hz), 7,973 (d, 1H, J_1 = 5,2 Hz).

N-(5'-kloori-4'-metyyli-2'-nitrofenyyli)glysiinin natrium-suola. 2-kloori-4-fluori-5-nitrotolueenin (2,080 g, 10,97 mmol, valmistettu edellä kuvatun mukaisesti) liuokseen DMF:ssa (11,0 ml) 70 °C:ssa, lisättiin tipoittaan natriumglysinaatin (1,065 g, 10,97 mmol, Aldrich, käytettiin sellaisenaan) liuokseen vedessä (11,0 ml). Tuloksena saatua suspensiota sekoitettiin yön yli 70 °C:ssa, jäähdytettiin huoneenlämpötilaan ja tuloksean saatava punainen kiintoaine suodatettiin, pestiin asetonissa (35 ml) ja kuivattiin tyhjössä, jotta saatiin 1,005 g (37 %) puhdasta (^{1}H-NMR) otsikon yhdistettä punaisena jauheena; ^{1}H-NMR (DMSO-d_6): δ 2,184 (s, 3H), 3,396 (d, 2H, J = 4,2 Hz), 6,852 (s, 1H), 7,991 (s, 1H), 8,671 (s, 1H).

6-kloori-3,4-dihydro-7-metyylikinoksaliini-2-(1H)-oni. N-(5'-kloori-4'-metyyli-2'-nitrofenyyli)glysiinin (1,000g, 4,088 mmol, valmistettu edellä kuvatun mukaisesti) ja tinta(II)kloridididihydraatin (2,767 g, 12,26 mmol, Aldrich, käytettiin sellaisenaan) etanoliliuosta (20 ml) refluksoitiin

30 minuutin ajan. Sitten seos jäähdytettiin huoneenlämpötilaan ja saostunut kiintoaine suodatettiin, pestiin etanolilla (4,0 ml) ja kuivattiin tyhjössä, jotta saatiin 0,251 g (31 %) otsikon yhdistettä keltaisena jauheena, ^{1}H-NMR (DMSO-d_6): δ 2,093 (s, 3), 3,657 (d, 2H, = 1,5 Hz), 5,984 (s, 1H), 6,583 (s, 1H), 6,632 (s, 1H), 10,253 (s, 1H).

6-kloori-7-metyyli-5-nitro-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni. 6-kloori-3,4-dihydro-7-metyylikinoksaliini-2(1H)-onin (0,150 g, 0,763 mmol, valmistettu edellä kuvatun mukaisesti) sekoitettuun CF_3COOH-suspensioon (1,6 ml) lisättiin ylimäärä savuavaa HNO_3:a (0,40 ml) ja tuloksena saatua punaista liuosta sekoitettiin yön yli 28 °C:ssa. Liuotin poistettiin tyhjössä ja jäännös laimennettiin vedellä (3,0 ml). Saostunut kiintoaine suodatettiin ja kuivattiin tyhjössä, jolloin saatiin 0,151 g (77 %) puhdasta (puhtaus HPLC:llä 100 %) otsikon yhdistettä vaaleankeltaisena jauheena; s.p.-tummenee 350 °C:ssa; ^{1}H-NMR (DMSO-d_6): δ 2,311 (s, 3H), 7,149 (s, 1H), 12,107 (s, 1H), 12,193 (s, 1H); $C_9H_6ClN_3O_4$:n alkuaineanalyysi: laskettu C, 42,29 %; H, 2,37 %; N, 16,44 %, havaittu C, 42,46 %; H, 2,10 %; N, 16,33 %.

Esimerkki 8

7-kloori-6-metyyli-5-nitro-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni

2-kloori-5-fluori-4-nitrotolueeni. 2-kloori-5-fluoritolueenin (0,500 g, 3,46 mmol, Lancaster, käytettiin sellaisenaan) sekoitettuun liuokseen väkevässä H_2SO_4:ssa (5,0 ml), 0 °C:ssa, lisättiin KNO_3 (0,350 g, 3,46 mmol) yhdellä kertaa. Tuloksena saadun vaaleankeltaisen liuoksen annettiin lämmitä 28 °C:een ja sekoitettiin yön yli 28 °C:ssa. Sitten se kaadettiin jään joukkoon (50 g) ja uutettiin eetterillä (2x50 ml). Eetteri kuivattiin vedettömän Na_2SO_4:n yläpuolella, poistettiin tyhjössä ja tuloksena saatu öljy kuivattiin edelleen tyhjössä, jolloin saatiin 0,616 g (94 %) otsikon yhdistettä öljynä, jota käytettiin sellaisenaan seuraavaan reaktioon;

^{1}H-NMR ($CDCl_3$): δ 2,459 (s, 3H), 7,193 (d, 1H, J_1 = 11,1 Hz), 8,083 (d, 1H, J_1 = 6,6 Hz).

N-(4'-kloori-5'-metyyli-2'-nitrofenyyli)glysiinin natrium-suola. 2-kloori-5-fluori-4-nitrotolueenin (0,605 g, 3,19 mmol, valmistettu edellä kuvatun mukaisesti) DMF-liuosta (3,0 ml), 70 °C:ssa, lisättiin tipoittain natriumglysinaatin vesiliuokseen (0,310 g, 3,19 mmol, Aldrich, käytettiin sellaisenaan) (3,0 ml). Tuloksena saatua suspensiota sekoitettiin yön yli 70 °C:ssa. Suspensiota jäähdytettiin huoneenlämpötilaan ja tuloksena saatu punainen kiintoaine suodatettiin, pestiin kloroformilla (10 ml) ja kuivattiin tyhjössä, jotta saatiin 0,360 g (46 %) puhdasta (^{1}H-NMR) otsikon yhdistettä punaisena jauheena; ^{1}H-NMR (DMSO-d_6): δ 2,276 (s, 3H), 3,431 (d, 2H, J = 4,2 Hz), 6,848 (s, 1H), 7,963 (s, 1H), 8,773 (s, 1H).

7-kloori-3,4-dihydro-6-metyylikinoksaliini-2(1H)-oni. N-(4'-kloori-5'-metyyli-2'-nitrofenyyli)glysiinin natriumsuolan (0,300 g, 1,23 mmol, valmistettu edellä kuvatun mukaisesti) ja tina(II)kloridihydraatin (0,830 g, 3,68 mmol, ALdrich, käytettiin sellaisenaan) etanoliliuosta (4,0 ml) refluksoitiin 30 minuutin ajan. Sitten se jäähdytettiin huoneenlämpötilaan ja saostunut kiintoaine suodatettiin, pestiin etanolilla (1,0 ml) ja kuivattiin tyhjössä, jolloin saatiin 0,160 g (66 %) otsikon yhdistettä keltaisena jauheena; ^{1}H-NMR (DMSO-d_6): δ 2,099 (s, 3H), 3,655 (s,2H), 6,037 (s, 1H), 6,538 (s, 1H), 6,685 (s, 1H), 10,241 (s, 1H).

7-kloori-6-metyyli-5-nitrokinoksaliini-2(1H),3(4H)-dioni. 7-kloori-3,4-dihydro-6-metyyli-kinoksaliini-2(1H)-onin (0,100 g, 0,509 mmol, valmistettu edellä kuvatun mukaisesti) sekoitettuun suspensioon CH_3COOH:ssa (3,0 ml) lisättiin ylimäärä savuavaa HNO_3:a (0,30 ml) ja tuloksena saatua punaista liuosta sekoitettiin yön yli 28 °C:ssa. Liuotin poistettiin tyhjössä ja jäännös laimennettiin vedellä (4,0 ml). Saostunut kiintoaine suodatettiin ja kuivattiin

tyhjössä, jolloin saatiin 0,067 g (52 %) puhdasta (puhtaus HPLC:lla 10 %) otsikon yhdistettä vaaleankeltaisena jauheena; s.p. - tummuu 340 °C:ssa; ^{1}H-NMR (DMSO-d_6) δ 2,184 (s, 3H), 7,263 (s, 1H), 11,948 (s, 1H), 12,144 (s, 1H); $C_9H_6CN_3O_4 \cdot H_2O$:n alkuaineanalyysi laskettu C, 40,85 %; H, 2,28 %; N, 15,87 %; havaittu C, 40,63 %; H, 2,05 %; N, 15,75 %.

Esimerkki 9

6-bromi-7-kloori-5-nitro-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni

2,5-dikloori-4-nitrobromibentseeni: 2-bromi-1,4-diklooribentseeniä (1,000 g, 4,443 mmol, Aldrich, käytettiin sellaisenaan) savuavassa HNO_3:ssa (7,0 ml) sekoitettiin 50 °C:ssa 1,5 h ajan ja kaadettiin jään (80 g) joukkoon. Kellertävä valkoinen kiintoaine suodatettiin, pestiin vedellä (10 ml) ja kuivattiin tyhjössä, jotta saatiin 1,14 g (95 %) puhdasta (^{1}H-NMR) otsikon yhdistettä kellertävän valkoista jauhetta, s.p. 50 - 53 °C (kirj. s.p. 57 - 58 °C; Fox, D.L. ja Turner, E.E., *J. Chem. Soc.* 1859 81930)); ^{1}H-NMR ($CDCl_3$): δ 7,863 (s, 1H), 8,030 (s, 1H). Tätä jauhetta käytetään sellaisenaan seuraavaan reaktioon.

N-(5'-bromi-4'-kloori-2'-nitrofenyyli)glysiinin natriumsuola: 2,5-dikloori-54-nitrobromibentseenin (1,000 g, 3,691 mmol, valmistettu edellä kuvatun mukaisesti) sekoitettuun liuokseen DMF:ssa (10,0 ml) 65 °C:ssa lisättiin tipoittain $NaCO_3$-liuosta (0,316 g, 3,76 mmol) ja glysiiniä (0,280 g, 3,73 mmol, Aldrich, käytettiin sellaisenaan) vedessä (3,8 ml). Tuloksena saatua suspensiota sekoitettiin 65 °C:ssa 65 tunnin ajan. Kirkkaan oranssi suspensio jäähdytettiin sitten huoneenlämpötilaan, pestiin vedellä (1,0 ml) ja kuivattiin tyhjössä, jotta saatiin 0,284 g (98 % lähtöaineesta laskettuna) puhdasta (^{1}H-NMR) otsikon yhdistettä oranssina jauheena; s.p. 264 - 265 °C (hajotettu); ^{1}H-NMR (DMSO-d_6): δ 3,541 (d, 2H, J = 3,9 Hz), 7,199 (s, 1H), 8,130 (s, 1H), 8,793 8t, 1H, J = 3,6 Hz). Jauhetta käytettiin sellaisenaan seuraavassa reaktiossa.

6-bromi-7-kloori-3,4-dihydrokinoksaliini-2(1H)-oni: N-(5'-bromi-4'-kloori-2'-nitrofenyyli)glysiinin natriumsuolan (0,255 g, 0,824 mmol, valmistettuna edellä kuvatun mukaisesti) ja tina(II)kloridididihydraatin (0,560 g, 2,48 mmol, Aldrich, käytettiin sellaisenaan) liuosta etanolissa (6 ml) refluksoitiin 3 tunnin ajan. Sitten liuos jäähdytettiin huoneenlämpötilaan ja annettiin seisoa yön yli huoneenlämpötilassa. Valkoinen kiintoaine suodatettiin ja kuivattiin saannon ollessa 0,038 g (18 %) puhdasta (^{1}H-NMR) otsikon yhdistettä valkoisina hiutaleina; s.p. 230 - 232 °C; ^{1}H-NMR (DMSO-d_6): δ 3,732 (s, 2H), 6,371 (s, 1H), 6,830 (s, 1H),6,912 (s, 1H), 10,437 (s, 1H). Uuttamalla suodosta etyyliasetaatilla (30 ml) saatiin 0,136 g (68 %) lisää tuotetta, jolloin yhdistetty saanto oli 86 %. Tuotetta käytettiin sellaisenaan seuraavaan reaktioon.

6-bromi-7-kloori-5-nitrokinoksaliini-2(1H)-oni: 6-bromi-7-kloori-3,4-dihydrokinoksaliini-2(1H)-onin (0,06 g, 0,23 mmol, valmistettuna edellä kuvatun mukaisesti) sekoitettuun suspensioon CF_3COOH:ssa (0,5 ml) lisättiin savuavaa HNO_3:a (0,02 ml, 0,46 mmol) ja tuloksena saatua punertavan keltaista suspensiota sekoitetaan huoneenlämpötilassa yön yli. Siten saatu kermanvärinen suspensio kaadettiin jäälle (2,5 ml) ja saostunut kiintoaine suodatettiin, pestiin vedellä (1,0 ml) ja kuivattiin tyhjössä, jotta saatiin 0,049 g (70 %) otsikon yhdistettä kermanvärisenä jauheena. ^{1}H-NMR (DMSO-d_6): δ 7,577 (s, 1H), 8,251 (s, 1H), 12,879 (s, 1H). Raakatuotetta käytettiin sellaisenaan lopulliseen reaktioon.

6-bromi-7-kloori-5-nitro-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni: 6-bromi-7-kloori-5-nitrokinoksaliini-2(1H)-onin (0,025 g, 0,082 mmol, valmistettuna edellä kuvatun mukaisesti) liuokseen väkevässä H_2SO_4.ssa (0,5 ml) lisättiin KNO_3:a (0,011 g, 0,11 mmol) ja tuloksena saatua tummanpunaista liuosta sekoitettiin huoneenlämpötilassa 65 tunnin ajan. Liuos jäähdytettiin sitten jäähauteessa ja laimennettiin jäällä

kokonaistilavuuteen 5,0 ml. Saostunut kiintoaine suodatettiin, pestiin vedellä (2,0 ml) ja kuivattiin tyhjössä, jolloin saatiin 0,019 g (72 %) raakatuotetta. Sitä puhdistettiin seuraavasti. Liukenematon kiintoaine sentrifugoitiin ja yläpuolella oleva liuos tehtiin happamaksi väkevällä HCl:lla pH-arvoon ~ 2. Saostunut kiintoaine suodatettiin, pestiin vedellä (1,0 ml) ja kuivattiin tyhjössä, jolloin saatiin 0,010 g (38 %) puhdasta (puhtaudeksi määritettiin HPLC:llä >97 %) otsikon yhdistettä kermanvärisenä jauheena; s.p. 338 - 343 °C (hajonnut); ^{1}H-NMR (DMSO-d_6): δ 7,51 (s, 1H), 12,251 (s päällekkäin br s, 2H); $C_8H_3BrClN_3O_4$:n alkuaineanalyysi, laskettu: C, 29,98 %; H, 0,94 %; N, 13,11 %, havaittu: C, 29,79; H, 0,77; N 12,71.

Esimerkki 10
6-bromi-7-fluori-5-nitro-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dionin valmistus

1-bromi-2,5-difluori-4-nitrobentseeni: 1-bromi-2,5-difluori-bentseenin (1,000 g, 5,181 mmmol, Aldrich, käytettiin sellaisenaan) sekoitettuun liuokseen väkevässä H_2SO_4.ssa (8 ml) 0 °C:ssa, lisättiin KNO_3:a (0,525 g, 5,19 mmol) yhtenä eränä. Tuloksena saadun keltaisen liuoksen annettiin lämmitä 28 °C:een ja sekoitettiin 28 °C:ssa yön yli. Sitten se kaadettiin jäähän (80 g) ja uutettiin etyyliasetaatilla (75 ml). Etyyliasetaatti kuivattiin vedettömän Na_2SO_4:n yläpuolella, poistettiin tyhjössä ja tuloksena saatu valkoinen kiintoaine kuivattiin vielä tyhjössä, jolloin saatiin 1,102 g (89 %) otsikon yhdistettä valkoisena jauheena; s.p. 58-60 °C; ^{1}H-NMR ($CDCl_3$): δ 7,591 (dd, 1H, J_1 = 9,6 Hz, J_2 = 5,4 Hz) 7,891 (t,1H, J = 6,9 Hz).

N-(5'-bromi-4'-fluori-2'-nitrofenyyli)glysiinin natriumsuola: 1-bromi-2,5-difluori-4-nitrobentseenin (1,100 g, 4,622 mmol, valmistettu kuten edellä) sekoitettuun liuokseen DMF:ssä (11,0 ml) 70 °C:ssa lisättiin tipoittain natriumglysinaatin (0,451 g, 4,65 mmol, Aldrich, käytettiin sellaisenaan)

vedessä (5,0 ml). Tuloksena saatua liuosta sekoitettiin yön yli 70 °C:ssa. Liuos jäähdytettiin huoneenlämpötilaan ja kirkkaan oranssi lious suodatettiin, pestiin kylmällä asetonilla (10 ml) ja kuivattiin tyhjössä, jolloin saatiin 0,469 g (35 %) otsikon yhdistettä kirkkaan oranssina jauheena; ^{1}H-NMR (DMSO-d_6): δ 3,458 (d, 2H, J = 3,9 Hz), 7,148 (d, 1H, J = 6,0 Hz), 7,944 (d, 1H, J = 9,3 Hz) 7,148 (d, 1H, J = 6,0 Hz), 7,944 (d, 1H, J = 9,3 Hz), 8,740 (s, 1H).

6-bromi-3,4-dihydro-7-fluori-kinoksaliini-2(1H)-oni: N-(5'-bromi-4'-fluori-2'-nitrofenyyli)glysiinin natriumsuolan (0,450 g, 1,54 mmol, valmistettuna edellä kuvatun mukaisesti) ja tina(II)kloridididihydraatin (1,039 g, 4,605 mmol, Aldrich, käytettiin sellaisenaan) liuosta etanolissa (7,0 ml) refluksoitiin 30 minuutin aan. Sitten liuos jäähdytettiin huoneenlämpötilaan ja liuotin poistettiin tyhjössä. Jäännös laimennettiin vedellä (15,0 ml) ja tehtiin emäksiseksi 10 % Na_2CO_3:la pH-arvoon ~ 8. Tuloksena saatua suspensiota uutettiin etyyliasetaatilla (100 ml). Etyyliasetaatti kuivattiin vedettömän Na_2SO_4:n yläpuolella ja poistettiin tyhjössä, jolloin saatiin 0,241 g (64 %) otsikon yhdistettä keltaisena jauheena, s.p. 214 - 216 °C; ^{1}H-NMR (DMSO-d_6): δ 3,684 (s, 2H), 6,062 (s, 1H), 6,631 (d, 1H, J = 9,3 Hz), 6,825 (d, 1H, J = 6,6 Hz), 10,303 (s, 1H).

6-bromi-7-fluori-5-nitro-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni: 6-bromi-3,4-dihydro-7-fluori-kinoksaliini-2(1H)-onin (0,050 g, 0,20 mmol, valmistettuna edellä kuvatun mukaisesti) sekoitettuun liuokseen CF_3COOH:ssa (1,0 ml) lisättiin ylimäärä savuavaa HNO_3:a (0,10 ml) ja tuloksena saatua punaista suspensiota sekoitettiin yön yli 28 °C:ssa. Liuotin poistettiin tyhjössä ja jäännös laimennettiin vedellä (2,0ml). Saostunut kiintoaine suodatettiin, pestiin vedellä (2,0 ml) ja kuivattiin kuivauspistoolissa (tolueenirefluksointi), jolloin saatiin 0,034 g(55 %) puhdasta (^{1}H-NMR) otsikon yhdistettä keltaisena jauheena; s.p. 323 - 327 °C;

^{1}H-NMR (DMSO-d_6): δ 7,179 (d, 1H, J = 9,0 Hz), 12,208 (s, 1H), 12,317 (s, 1H); $C_8H_3BrFN_3O_4$:n alkuaineanalyysi laskettu, C, 31,60 %; H, 0,99 %; N, 13,82 %, havaittu C, 31,30 %; H, 0,87 %; N, 13,66 %.

Esimerkki 11

7-bromi-6-fluori-5-nitro-1,4-dihydroksikinoksaliini-2,3-dioni

1-bromi-2,4-difluoro-5-nitrobentseeni Seokseen, joka sisälsi 1-bromi-2,4-difluoribentseeniä (0,512 g, 2,65 mmol, Aldrich käytettiin sellaisenaan) ja väkevää H_2SO_4:a (5,0 ml) 0 °C lämpötilassa, lisättiin kerralla KNO_3:a (0,275 g, 2,72 mmol). Saadun liuoksen annettiin lämmetä 28 °C lämpötilaan, ja sitä sekoitettiin tässä lämpötilassa yön yli. Tämän jälkeen liuos kaadettiin jään (50 g) joukkoon ja uutettiin etyyliasetaatilla. Etyyliasetaatti kuivattiin vedettömällä Na_2SO_4:llä, poistettiin tyhjössä, ja saatu öljy kuivattiin edelleen tyhjössä, jolloin tuotteeksi saatiin 0,576 g (91%) puhdasta (^{1}H NMR) otsikon mukaista yhdistettä vaalean punaisena öljynä; ^{1}H NMR ($CDCl_3$); δ 7,141 (dd, 1H, J_1 = 10,2 Hz, J_2 = 7,8 Hz), 8,375 (t, 1H, J = 7,5 Hz).

N-(4'-bromi-5'-fluoro-2'-nitrofenyyli)glysiini ja N-(2'-bromi-5'-fluori-4'-nitrofenyyli)glysiini: Sekoitettuun 1-bromi-2,4-difluori-5-nitrobentseenin (365 mg, 1,53 mmol, valmistettu edellä kuvatun mukaisesti) DMF-liuokseen (3,0 ml) lisättiin tipoittain natriumglysinaatin (0,152 g, 1,57 mmol, Aldrich, käytettiin sellaisenaan) vesiliuosta (0,6 ml). Saatua suspensiota sekoitettiin 28 °C lämpötilassa yön yli. Liuotin poistettiin tyhjössä ja jäljelle jäänyt liete jäähdytettiin jäähauteessa. 1N HCl (1,5 ml) lisättiin lietteeseen, josta välittömästi saostui keltainen sakka, joka suodatettiin ja kuivattiin kuivauslaitteessa (tolueeniref-luksi), jolloin tuotteeksi saatiin 0,175 g (39%) otsikossa mainittujen aineiden seosta, keltaisena jauheena, suhteessa 1,0:0,6 (^{1}H NMR); ^{1}H NMR (DMSO-d_6): δ 4,039 (d, 2H, J = 6 Hz), 4,109 (d, 2H, J = 5,4 Hz), 6,691 (d, 1H, J = 14,7 Hz), 6,900

(s,1H), 7,005 (d, 1H, J = 12,0 Hz), 8,219 (d, 1H, J = 8,1 Hz), 8,337 (d, 1H, J = 7,5 Hz), 8,494 (s,1H). Tässä vaiheessa seoksen erottaminen ei ollut mahdollista, joten sitä käytettiin sellaisenaan seuraavaan reaktioon.

7-bromi-3,4-dihydro-6-fluorikinoksalini-2(1*H*)-oni: N-(4'-bromi-5'-fluori-2'-nitrofenyyli)glysiinin ja N-(2'-bromi-5'-fluori-4'-nitrofenyyli)glysiinin (0,150 g, 0,512 mmol, valmistettu edellä kuvatun mukaisesti) seoksen liuosta ja tina(II)kloridididihydraattia (0,346 g, 153 mmol, Aldrich, käytetty sellaisenaan) etanolissa (3,0 ml) refluksoitiin 30 min ajan. Tämän jälkeen liuos jäähdytettiin huoneen lämpötilaan, ja liuotin poistettiin tyhjössä. Jäännös laimennettiin vedellä (10 ml) ja tehtiin emäksiseksi kyllästetyllä $NaHCO_3$:lla (3,0 ml) noin pH-arvoon 8. Saatu suspensio uutettiin etyyliasetaatilla (30 ml). Etyyliasetaatti kuivattiin vedettömällä Na_2SO_4:lla ja poistettiin tyhjössä, jolloin saatiin 0,050 g raakaa tuotetta, joka puhdistettiin etanoli:vesi-seoksesta (1:1) saostamalla, jolloin saatiin 30 mg (24 %) puhdasta (^{1}H NMR), otsikon mukaista yhdistettä keltaisena jauheena, sp. 172 °C (hajoaa); ^{1}H NMR (DMSO-d_6): δ 3,73 (s, 2H), 6,37 (s, 1H), 6,551 (d, 1H, J = 10,2 Hz), 6,825 (s,1H, J = 6,6 Hz), 10,303 (s, 1H)).

7-bromi-6-fluori-5-nitro-1,4-dihydrokinoksalini-2,3-dioni: Sekoitettuun 7-bromi-3,4-dihydro-6-fluorikinoksalini-2(1*H*)-onin (0,023 g, 0,094 mmol, valmistettu edellä kuvatun mukaisesti) liuokseen CF_3COOH:ssa (0,30 ml), lisättiin ylimäärin savuavaa HNO_3 :a (0,015 ml), ja saatua punaista suspensiota sekoitettiin yön yli 28 °C lämpötilassa. Saatu punainen liuos jäähdytettiin jäähauteessa ja laimennettiin vedellä (2,0 ml) ja kuivattiin kuivauspistoolilla (tolueenirefluksi), jolloin saatiin 0,017 g (60%) puhdasta (^{1}H NMR) otsikon mukaista yhdistettä tiilenpunaisena jauheena; sp. 316-321 °C; ^{1}H NMR (DMSO-d_6): δ 7,458 (d, 1H, J = 6,3 Hz), 12,006 (br s, 1H), 12,178 (s, 1H);

alkuaineanalyysi $C_8H_3BrFN_3O_4$:lle laskennallisesi: C, 31,60%; H, 0,99%; N, 13,82%, havaittiin C, 31,78%; H, 0,84%; N, 13,49%.

Esimerkki 12

7-bromi-6-metyyli-5-nitro-1,4-dihydrokinoksalini-2,3-dioni

2-bromi-5-fluori-4-nitrotolueeni: Sekoitettuun 2-bromi-5-fluoritolueenin (1,495 g, 7,909 mmol, Aldrich, käytetty sellaisenaan) liuokseen väkevässä H_2SO_4:ssä (10,0 ml) 0 °C lämpötilassa lisättiin yhtenä annoksena KNO_3 (0,800 g, 7,91 mmol). Saatu vaaleankeltainen liuos lämmitettiin 28 °C lämpötilaan ja sekoitettiin yli yön 28 °C lämpötilassa. Tämän jälkeen liuos kaadettiin jään (50 g) päälle ja uutettiin etyyliasetaatilla (75 ml). Etyyliasetaatti kuivattiin vedettömällä Na_2SO_4:lla, poistettiin tyhjössä, ja saatua öljyä kuivattiin edelleen tyhjössä, ja tuotteeksi saatiin 1,832 g (98 %) otsikon mukaista yhdistettä öljynä; ^{1}H NMR ($CDCl_3$); δ 2,495 (s, 3H), 7,213 (d, 1H, J_1 = 11,4 Hz), 8,268 (d, 1H, J_1 = 7,8 Hz).

N-(4'-bromi-5'-metyyli-2'-nitrofenyyli)glysiinin natriumsuola: 2-bromi-5-fluori-4-nitrotolueenin (1,662 g, 7,102 mmol, valmistettu edellä kuvatun mukaisesti) sekoitettuun DMF- liuokseen(7,0 ml) 70 °C lämpötilassa, lisättiin, tipoittain natriumglysinaatin (0,690 g, 7,11 mmol, Aldrich, käytetty sellaisenaan) vesiliuosta (7,0 ml). Saatua suspensiota sekoitettiin yön yli 70 °C lämpötilassa. Suspensio jäähdytettiin huoneen lämpötilaan, ja kiinteä punainen aine suodatettiin, pestiin asetonilla ja kuivattiin tyhjössä, jolloin saatiin 0,932 g (45 %) puhdasta (^{1}H NMR) otsikon mukaista yhdistettä punaisena jauheena; ^{1}H NMR (DMSO-d_6): δ 2,306 (s, 3H), 3,674 (s, 2H), 6,120 (s, 1H), 6,583 (s, 1H), 6,868 (s, 1H), 10,284 (s, 1H).

7-bromi-3,4-dihydro-6-metyylikinoksalini-2(1*H*)-dioni: N-(4'-bromi-5'-metyyli-2'-nitrofenyyli)glysiinin natriumsuolan

(0,200 g, 0,692 mmol, valmistettu edellä esitetyn mukaisesti) ja tina(II)kloridididihydraatin (0,468 g, 2,07 mmol, Aldrich, käytetty sellaisenaan) etanoliliuosta (2,0 ml) refluksoitiin 30 min ajan. Tämän jälkeen liuos jäähdytettiin huoneen lämpötilaan. Saostunut kiinteä aine suodatettiin ja kuivattiin tyhjössä, jolloin saatiin 0,064 g (38 %) otsikon mukaista yhdistettä keltaisena jauheena; ^{1}H NMR (DMSO-d_6): δ 2,130 (s, 3H), 3,674 (s, 2H), 6,120 (s, 1H), 6,583 (s, 1H), 6,868 (s, 1H), 10,284 (s, 1H).

7-bromi-6-metyyli-5-nitrokinoksalini-2(1*H*),3(4*H*)-dioni: Sekoitettuun 7-bromi-3,4-dihydro-6-metyylikinoksalini-2(1*H*)-onin (0,0028 g, 0,012 mmol, valmistettu edellä esitetyn mukaisesti) suspensioon CF_3COOH:ssa (0,30 ml), lisättiin ylimäärin savuavaa HNO_3 :a (0,020 ml), ja saatua punaista suspensiota sekoitettiin yön yli 28 C lämpötilassa. Saatu suspensio jäähdytettiin jäähauteessa ja laimennettiin vedellä (2,0 ml). Saostunut kiinteä aine suodatettiin, pestiin vedellä (2,0 ml) ja kuivattiin kuivauspistoolissa (tolueenirefluksi), jolloin saatiin 0,014 g (40%) puhdasta (^{1}H NMR) otsikon mukaista yhdistettä vaalean keltaisena jauheena; sp.> 340 °C; ^{1}H NMR (DMSO-d_6): δ 2,227(s, 3H), 7,440 (s, 1H), 11,980 (s, 1H), 12,143 (s, 1H); alkuaineanalyysi $C_9H_6BrN_3O_4$:lle laskennallisesi: C, 35,07%; H, 1,96%; N, 13,63%, havaittiin C, 35,44%; H, 1,92%; N, 13,23%.

Esimerkki 13

7-kloori-6-fluori-5-nitro-1,4-dihydrokinoksalini-2,3-dioni

1-kloori-2,4-difluori-5-nitrobentseeni: Sekoitettuun 1-kloori-2,4-difluorobentseenin (0,829 g, 5,58 mmol, Aldrich, käytetty sellaisenaan) väkevässä H_2SO_4:ssä 0°C lämpötilassa lisättiin KNO_3 (0,565 g, 5,59 mmol) yhdessä erässä. Saadun liuoksen annettiin lämmetä 28 °C lämpötilaan ja sekoitettiin 28 °C lämpötilassa yli yön. Sen jälkeen liuos kaadettiin jään päälle (80 g) ja uutettiin etyyliasetaatilla (75 ml). Etyyliasetaatti kuivattiin vedettömällä Na_2SO_4:lla, poistettiin tyhjössä, ja saatua öljyä kuivattiin edelleen

tyhjössä, ja tuotteeksi saatiin 1,007 g (93 %) otsikon mukaista puhdasta (^{1}H NMR) yhdistettä punaisena öljynä; ^{1}H NMR ($CDCl_3$); δ 7,168 (dd, 1H, J_1 = 9,9 Hz, J_2 = 8,4 Hz), 8,238 (t, 1H, J = 7,5 Hz).

N-(4'-kloori-5'-fluori-2'-nitrofenyyli)glysiinin ja N-(2'-kloori-5'-fluori-4'-nitrofenyyli)glysiinin natriumsuola: Sekoitettuun 1-kloori-2,4-difluori-5-nitrobentseenin (1,000 g, 5,167 mmol, valmistettu edellä esitetyn mukaisesti) DMF-liuokseen (10,0 ml) lisättiin tipoittain, natriumglysinaatin (0,502 g, 5,17 mmol, Aldrich, käytetty sellaisenaan) vesiliuosta (2,0 ml). Liuosta sekoitetiin 70 °C lämpötilassa 16 h ajan ja jäähdytettiin huoneen lämpötilaan. Saostunut kiinteä aine suodatettiin, pestiin asetonilla (10 ml) ja kuivattiin tyhjössä, jolloin saatiin 0,438 g (38 %) otsikossa esitettyjen yhdisteiden seosta kiinteänä punaisena aineena suhteessa 1,0:0,3 ^{1}H NMR:lla analysoituna; ^{1}H NMR (DMSO-d_6): δ 3,474 (d, 2H, J = 4,5 Hz), 3,523 (d, 2H, J = 3,9 Hz), 6,535 (d, 1H, J = 14,7 Hz), 6,871 (d, 1H, J = 12,3 Hz), 6,976 (s, 1H), 8,068 (d, 1H, J = 7,8 Hz), 8,168 (d, 1H, J = 7,8 Hz), 8,867 (s, 1H). Seoksen erottaminen ei tässä vaiheessa ollut mahdollista, joten sitä käytettiin sellaisenaan seuraavaan reaktioon.

7-kloori-3,4-dihydro-6-fluorikinoksalini-2(1*H*)-oni: Liuosta, joka sisälsi N-(4'-kloori-5'-fluori-2'-nitrofenyyli)glysiinin ja N-(2'-kloori-5'-fluori-4'-nitrofenyyli)glysiinin (0,175 g, 0,704 mmol, valmistettu edellä kuvatun mukaisesti) seosta ja tina(II)kloridididihydraattia (0,475 g, 2,11 mmol, Aldrich, käytetty sellaisenaan) etanolissa (3,0 ml), refluksoitiin 30 min ajan. Tämän jälkeen liuos jäähdytettiin huoneen lämpötilaan, ja liuotin poistettiin tyhjössä. Jäännös laimennettiin vedellä (10 ml) ja tehtiin emäksiseksi kyllästetyllä $NaHCO_3$:lla (3,0 ml) noin pH-arvoon 8. Saatu valkoinen suspensio uutettiin etyyliasetaatilla (30 ml). Etyyliasetaatti kuivattiin vedettömällä Na_2SO_4:lla ja poistettiin tyhjössä, jolloin saatiin 0,041 g (29 %) puhdasta

(^{1}H NMR), otsikon mukaista yhdistettä vaalean keltaisena jauheena, sp. 217-219 °C (hajoaa); ^{1}H NMR (DMSO-d_6): δ 3,745 (s, 2H), 6,37 (s, 1H), 6,587 (d, 1H, J = 10,5 Hz), 6,741 (d,1H, J = 7,2 Hz), 10,331 (s, 1H)).

7-kloori-6-fluori-5-nitrokinoksalini-2(1*H*),3(4*H*)-dioni:

Sekoitettuun 7-kloori-3,4-dihydro-6-fluorikinoksalini-2(1*H*)-onin (0,024 g, 0,12 mmol, valmistettu edellä esitetyn mukaisesti) suspensioon CF_3COOH:ssa (0,40 ml), lisättiin ylimäärin savuavaa HNO_3 :a (0,02 ml), ja saatua punaista suspensiota sekoitettiin yön yli 28 C lämpötilassa. Liuotin poistettiin tyhjössä, ja jäännös laimennettiin vedellä (2,0 ml). Saostunut kiinteä aine suodatettiin, pestiin vedellä (1,0 ml) ja kuivattiin kuivauspistoolissa (tolueenirefluksi), jolloin saatiin 0,023 g (74%) puhdasta (^{1}H NMR) otsikon mukaista yhdistettä vaalean keltaisena jauheena; sp. 308-310 °C; ^{1}H NMR (DMSO-d_6): δ 7,374 (d, 1H, J = 6,9 Hz), 12,022 (br s, 1H), 12,221 (s, 1H); alkuaineanalyysi $C_8H_3ClFN_3O_4$:lle laskennallisesi: C, 37,02%; H, 1,16%; N, 16,19%, havaittiin C, 37,03%; H, 1,19%; N, 15,33%.

Esimerkki 14

6-atsido-7-fluori-5-nitro-1,4-dihydrokinoksalini-2,3-dioni

Kiinteään seokseen, joka sisälsi 23 mg (0,094 mmol) 6,7-difluori-5-nitrokinoksalini-2,3-dionia ja 7 mg (0,10 mmol) natriumatsidia, lisättiin 0,5 ml DMSO-d_6:a, ja seosta sekoitettiin pyörresekoituksena 10 s ajan. Hiukan liukenematonta valkoista materiaalia havaittiin. Lisättiin yksi pisara D_2O:a ja sekoitettiin 10 s ajan. Jälleen havaittiin hiukan valkoista kiinteää ainetta. ^{1}H NMR, 7,109 (1, d, J = 12,0). Liuokseen lisättiin 3 ml jäävettä. Keltainen sakka suodatettiin, pestiin vedellä ja kuivattiin, jolloin saatiin keltainen kiinteä aine (21 mg, 84%); sp. 255-257 °C, ^{1}H NMR (DMSO-d_6): 7,166 (1, d, J = 11,8), 12,2-12,1 (m,2). ^{19}F NMR (C_6F_6 referenssi, -162,9 ppm), 1130,5 (mb). IR (KBr), 2154, 1753, 1540, 1359, 1308 cm^{-1}. MS, 266 (M^+, 1), 238

($M^+ -N_2$, 100), 178 (90), 150 (40).

Esimerkki 15

6-amino-7-fluori-5-nitro-1,4-dihydrokinoksalini-2,3-dioni

Liuokseen, joka sisälsi 20 mg (0,082 mmol) 6,7-difluori-5-nitro-1,4-dihydrokinoksalini-2,3-dionia 0,5 ml:ssa DMSO-d_6:a, lisättiin 2 pisaraa 30 % ammoniumhydroksidia, ja liuos lämmitettiin 80 °C lämpötilaan 100 h ajaksi. Liuos lisättiin 4 ml:aan vettä, ja se tehtiin happameksi 2 N HCl:llä pH-arvoon 1. Sakka suodatettiin, pestiin vedellä ja kuivattiin, jolloin saatiin keltainen kiinteä aine (15 mg, 76 %); sp. 250 °C (haj.); ^{1}H NMR (DMSO-d_6): 7,202 (1, d, J = 11,5), 7,232 (sb, 2), 11,15 (mb, 1), 12,0 (mb, 1). ^{19}F NMR -133.84 (d, J = 11,6). MS,240 (M^+, 100), 212 (10), 177 (10), 166 (20). HRMS, lask. $C_8H_5FN_4O_4$:lle 240,0290, havaittu 240,0294.

Esimerkki 16

7-fluori-6-metoksi-5-nitro-1,4-dihydrokinoksalini-2,3-dioni

Liuokseen, joka sisälsi 21 mg (0,086 mmol) 6,7-difluori-5-nitro-1,4-dihydrokinoksalini-2,3-dionia 0,5 ml:ssa DMSO-d_6:a, lisättiin 16 mg (0,29 mmol). Liuosta sekoitettiin pyörresekoituksena 10 s ajan ja pidettiin huoneen lämpötilassa 3 h ajan. Sen jälkeen liuos lisättiin 3ml:aan vettä ja tehtiin happameksi 2 N HCl:llä pH-arvoon 4.. Sakka suodatettiin, pestiin vedellä ja kuivattiin, jolloin saatiin keltainen kiinteä aine (17 mg, 77 %); sp. 292 °C; ^{1}H NMR (DMSO-d_6), 3,899 (s, 3), 7,163 (1, d, J = 11,6), 11,97 (mb, 1), 12,137 8s,1). ^{19}F NMR -134.48 (mb). MS, 255 (M^+, 100), 243 (15), 179 (16), 151 (40). HRMS, lask. $C_9H_6FN_3O_5$:lle 255,0287, havaittu 255,0308.

Esimerkki 17

7-fluori-6-etoksi-5-nitro-1,4-dihydroksikinoksalini-2,3-dioni

Liuosta, joka sisälsi 24 mg (0,098 mmol) 6,7-difluori-5-

nitro-1,4-dihydrokinoksalini-2,3-dionia ja 19 mg (0,47 mmol) natriumhydrokssidia 0,6 ml:ssa D_2O:a, lämmitettiin 105 °C lämpötilaan 24 h ajan. Sen jälkeen liuos lisättiin 2ml:an vettä ja tehtiin happameksi 2 N HCl:llä pH-arvoon 1. Sakka suodatettiin, pestiin vedellä ja kuivattiin, jolloin saatiin punainen kiinteä aine (19 mg, 80 %); sp.>360 °C; ^{1}H NMR (DMSO-d_6), 7,101 (1, d, J = 10,9), 11,10 (mb, 1), 11,70 (mb, 1), 11,99 (s,1). ^{19}F NMR -137,4 (mb). MS, 242 (M^+ +1, 100), 195 (50), 152 (20), 140 (25). HRMS, lask. $C_8H_4FN_3O_5$:lle 241,0131, havaittu 241,0110.

Esimerkki 19

5-atsido-6,7-dikloori-1,4-dihydrokinoksalini-2,3-dioni

Seosta, joka sisälsi 45 mg (0,18 mmol) 5-amino-6,7-dikloori-1,4-dihydrokinoksalini-2,3-dionia 1 ml:ssa väkevää H_2SO_4:a (97 %) sekoitettiin jäähauteessa 1 h ajan. Saatuun keltaiseen liuokseen lisättiin tipoittain, liuos joka sisälsi 70 mg (1,0 mmol) $NaNO_2$ 0,6 ml:ssa H_2O:a, ja sitä sekoitettiin jäähauteessa 3 h ajan. Saatuun punaiseen liuokseen lisättiin liuos, joka sisälsi 98 mg NaN_3 0,6 ml:ssa H_2O:a, ja seosta sekoitettiin 1 h ajan. Seokseen lisättiin 101 mg NaN_3:a 0,6 ml:ssa H_2O:ta, ja seosta sekoitettiin yön yli. Seos suodatettiin, pestiin vedellä, ja kuivattiin, jolloin saatiin keltainen kiinteä aine 44 mg (88 %); sp. 130 °C (hajoaa); ^{1}H NMR (DMSO-d_6), 7,148 (s, 1), 11,75 (mb, 1), 12,09 (s, 1). IR (KBr), 2120, 1700 cm $^{-1}$.

Esimerkki 20

6-atsido-5,7-dikloori-1,4-dihydrokinoksalini-2,3-dioni

Seosta, joka sisälsi 10 mg (0,040 mmol) 6-amino-5,7-dikloori-1,4-dihydrokinoksalini-2,3-dionia 0,5 ml:ssa väkevää H_2SO_4:a (97 %) sekoitettiin jäähauteessa 1 h ajan. Saatuun keltaiseen liuokseen lisättiin tipoittain liuos, joka sisälsi 30 mg (0,43 mmol) $NaNO_2$ 0,3 ml:ssa H_2O:a, ja sitä sekoitettiin jäähauteessa 2 h ajan. Saatuun punaiseen liuokseen lisättiin

liuos, joka sisälsi 40 mg NaN_3 0,3 ml:ssa H_2O:a, ja seosta sekoitettiin 2 h ajan. Seos laimennettiin 2 ml:lla H_2O:ta, ja seosta sekoitettiin yön yli. Seos suodatettiin, pestiin vedellä, ja kuivattiin, jolloin saatiin lähes väritön kiinteä aine 10 mg (90 %); sp. 150 °C (hajoaa); ^1H NMR (DMSO-d_6), 7,153 (s, 1), 11,602 (s, 1), 12,02 (s, 1). IR (KBr), 2127, 1720 cm^{-1}.

Esimerkki 21
6,7-dimetyyli-1,4-dihydrokinoksalini-2,3-oni

Seosta, joka sisälsi 2,72 g (2,0 mmol) 4,5-dimetyyli-1,2-fenyleenidiamiinia ja 1,92 g 821,3 mmol) oksaalihappoa 30 ml:ssa 2 N HCl:a, refluksoitiin 2,5 h ajan ja annettiin jäähtyä huoneen lämpötilaan. Seos laimennettiin 20 ml:lla H_2O:ta, suodatettiin, pestiin vedellä ja kuivattiin, jolloin saatiin vaalean ruskea kiinteä aine 3,57 g (94 %), sp. > 250 °C; ^1H NMR (DMSO-d_6), 2,161 (s, 6), 6,869 (s, 2), 11,78 (s, 2).

Esimerkki 22
6,7-dimetyyli-5-nitro-1,4-dihydrokinoksalini-2,3-dioni

Jäähauteessa pidettyyn seokseen, joka sisälsi 1,90 g (10,0 mmol) 6,7-dimetyyli-1,4-dihydrokinoksalini-2,3-onia 25 ml.ssa H_2SO_4:a (97 %), lisättiin tipoittain 1,2 ml HNO_3:a (69-70 %), ja liuosta sekoitetttiin huoneen lämpötilassa 48 h ajan. Seos kaadettiin 300 ml:aan jäävettä ja sekoitettiin 10 min ajan. Seos suodatettiin, pestiin vedellä ja kuivattiin, jolloin saatiin keltainen kiinteä aine 1,40 g (60 %). Kiinteä aine puhdistettiin DMSO/ H_2O- saostuksella, jota seurasi NaOH/HCl -saostus, jolloin saatiin 0,85 g keltaista kiinteää ainetta; sp. > 250 °C; ^1H NMR (DMSO-d_6), 2,079 (s, 3), 2,246 (s, 3), 7,048 (s, 1), 11,770 (s, 1), 12,030 (s, 1). HRMS lask. $C_{10}H_9N_3O_4$ 235,0588; havaittiin 235,0584.

Esimerkki 23

7-bromi-5-etyyli-1,4-dihydrokinoksalini-2,3-dioni

1,2-diamino-4-bromi-6-etyylibentseenin (40 mg, 0,14 mmol) ja oksaalihapon dihydraatin (25 mg, 0,20 mmol, käytetty sellaisenaan) seosta 4 N HCl:ssa (1,5 ml) refluksoitiin 120-125 °C lämpötilassa 3 h ajan, jonka jälkeen se jäähdytettiin huoneen lämpötilaan. Seos sentrifugoitiin, ja nestekerros poistettiin. Keltainen kiinteä aine pestiin kylmällä vedellä (2x 1ml), kerättiin suodattamalla ja kuivattiin 60 °C lämpötilassa alipaineessa 2 h ajan, jolloin saatiin 40 mg raakatuotetta (80 %) keltaisena jauheena. Raaka tuote liuotettiin 1N NaOH:in (2 ml) ja suodatetttiin. Suodos tehtiin happameksi pH-arvoon 5, jolloin saatiin 12 mg puhdasta otsikon mukaista yhdistettä; sp. >350 °C (haj. yli 300 °C); IR (KBr, cm-1): 3410, 3164, 2919, 1740, 1705, 1600. ^{1}H NMR (DMSO-d_6): δ 1,099 (t, 3H, J = 6 Hz), 2,741 (q, 2H, J = 7,2 Hz), 7,117 (d, 1H, J = 1,8 Hz), 7,138 (d, 1H, J = 1,8 Hz); 11,343 s, 1H); 11,958 (s, 1H). HRMS: lask. $C_{10}H_9BrN_2O_2$ (M^+) m/z: 297,9846; havaittiin 267,9853.

Esimerkki 24

5,7-dimetyyli-1,4-dihydro-2,3-kinoksalinidioni

1,2-diamino-4,6-dimetyylibentseeni. Seosta, joka sisälsi 4,6-dimetyyli-2-nitroaniliinia (1,66 g, 10,0 mmol) ja 10% Pd/C (200 mg) etanolissa (35 ml), hydrattiin 2 h ajan huoneen lämpötilassa 25 psin H_2-paineessa. Katalyytti poistettiin piimaalla suodattamalla, ja liuotin poistettiin rotavaporissa haihduttamalla, jolloin ssaatiin 1,300 g (96 %) 1,2-diamino-4,5-dimetyylibentseeniä ruskeana kiinteänä aineena. ^{1}H NMR ($CDCl_3$): δ 6,449 (s, 1H), 6,469 (s, 1H), 3,327 (br, 2H), 3,259 (br, 2H), 2,190 (s,3H), 2,159 (s, 3H).

5,7-dimetyyli-1,4-dihydro-2,3-kinoksalinidioni. 1,2--diamino-4,6-dimetyylibentseenin (424 mg, 3,11 mmol) ja oksaalihapon dihydraatin (432 mg, 3,43 mmol, käytetty sellaisenaan) seosta

4 N HCl:ssa (20 ml) refluksoitiin 120-125 °C lämpötilassa 3 h ajan, jonka jälkeen se jäähdytettiin huoneen lämpötilaan. Seos sentrifugoitiin, ja pinnalle nouseva kerros poistettiin. Keltainen kiinteä aine pestiin kylmällä vedellä (2 x 2 ml), kerättiin suodattamalla, ja kuivattiin tyhjössä 2 h ajan, jolloin saatiin 516 mg raakaa 5,7-dimetyyli-1,4-dihydro-2,3-kinoksalinidionia (87 %) keltaisena pulverina. Raaka tuote kerättiin 1 N NaOH:iin (10 ml) ja suodatettiin. Suodos tehtiin happameksi pH-arvoon 3, jolloin saatiin puhdasta otsikon mukaista yhdistettä (490 mg); sp. 345-347 °C (haj.); IR (KBr, cm^{-1}): 3460, 3190, 2986, 1716, 1709, 1630. ^1H NMR (DMSO-d_6): δ 11,858 (s, 1H), 11,173 (s, 1H), 6,766 (s, 1H), 6,745 (s, 1H), 2,280 (s, 3), 2,211 (s, 3). HRMS: lask. $C_{10}H_{10}N_2O_2$ (M^+) m/z: 190,0714; havaittiin 190,0744.

Esimerkki 25

1,4-dihydrobentso[g]kinoksalini-2,3-dioni

Sekoitettuun 2,3-diaminotolueenin (0,498 g, 0,407 mmol, Aldrich) liuokseen 2 N Hcl:ssa (6 ml, 12 mmol), lisättiin yhtenä annoksena oksaalihappoa (0,520 g, 0,412 mmol, Fisher). Saatua purppuranpunaista liuosta refluksoitiin 13 h ajan, kunnes saatiin purppuranpunainen suspensio. Tämä jäähdytettiin 25 °C lämpötilaan, pestiin vedellä (5 ml) ja kuivattiin tyhjössä (0,1 mmHg), jolloin saatiin siniharmaa jauhe. Tämä kerättiin 2 N NaOH-liuokseen (34 ml, 68 mmol), jolloin muodostui ruskea liuos, joka suodatettiin. Ruskea suodos tehtiin happameksi pH-arvoon 1,0 lisäämällä 2 N HCl:a (42 ml, 84 mmol), jolloin saatiin ruskea suspensio. Suodattamalla suspensio ja pesemällä suodatettu kakku vedellä (5 ml), saatiin otsikon mukaista yhdistettä harmaana jauheena (225,5 mg, 43 %); sp. 318 °C (massa esilämmitetttiin 300 °C lämpötilaan); ^1H NMR (DMSO-d_6): δ 2,32 (s, 3H), 6,90-6,99 (m, 3H), 11,22 (s, 1H), 11,90 (s, 1H).

Esimerkki 28

7-metyyli-5-nitro-1,4-dihydro-2,3-kinoksalinidioni. Gillespie

*et al.*in esittämää, *J. Org. Chem.* 25:942 (1960) menettelytapaa noudatettiin seuraavasti. Tumman mustaa 4-metyyli-2,6-dinitroaniliinin (0,100 g, 0,561 mmol, Aldrich, käytetty sellaisenaan) liuosta 6,66 % $(NH_4)_2S$:n (3,3 ml, valmistettu Aldrichin toimittamasta 20% $(NH_4)_2S$:n vesiliuoksesta) vesiliuoksessa ja etanolia (3,5 ml) refluksoitiin 45 min ajan. Sen jälkeen seos jäähdytettiin 28 °C lämpötilaan, ja liuottimet poistettiin mahdollisimman täydellisesti tyhjössä (vetokaapissa ammoniumsulfidin hajuhaittojen välttämiseksi). Saatu liete laimennettiin vedellä (10 ml), ja muodostunut punainen sakka suodatettiin ja kuivattiin vakuumissa, jolloin saatiin 0,072 g (85 %) kiinteää ainetta punaisena jauheena, jota käytettiin sellaisenaan seuraavassa reaktiossa. ^{1}H NMR (asetoni-d_6): 2,205 (s, 3H), 6,342 (br s, 2H), 6,622 (s, 1H), 7,571 (s, 1H).

7-metyyli-5-nitro-1,4-dihydro-2,3-kinoksilanidioni. 5-metyyli-3-nitro-1,2-fenyleenidiamiinin (0,050 g, 0,30 mmol) ja oksaalihapon (0,038 g, 0,30 mmol) suspensiota 2 N HCl:ssa (1,6 ml) refluksoitiin 2,5 h ajan, jonka aikana se ensin muodosti liuoksen ja sitten suspension. Tämän jälkeen suspensio jäähdytettiin 28 °C lämpötilaan, ja saostunut kiinteä aine suodatettiin, pestiin vedellä (5 ml), ja kuivattiin vakuumissa, jolloin saatiin 30 mg (45 %) tuotetta vaalean keltaisena jauheena. Se puhdistettiin seuraavalla emäs-happo-käsittelyllä. Koko raaka tuote koottiin 1N NaOH:in (3,3 ml) ja lämmitettiin 90 °C lämpötilaan kiinteästä aineesta suurimman osan liuottamiseksi. Sen jälkeen liuos suodatettiin kuumana, ja suodosjäähdytettiin jäähauteessa ja tehtiin happameksi pH-arvoon noin 2 väkevällä HCl:lla. Saostunut kiinteä aine suodatettiin ja kuivattiin tyhjössä, jolloin saatiin 0,025 g (38 %) otsikon mukaista puhdasta yhdistettä vaalean keltaisena jauheena; sp. 319-323 °C (hajoaa), 11,044 (s, 1H), 12,299 (s, 1H); alkuaineanalyysin mukaan $C_9H_7N_3O_4$x 0,35 H_2O:lle lask.: C, 47,52 %; H, 3,10 %; N, 18,47 %; havaittiin: C, 47,82 %; H, 3,03 %; N, 18,06 %.

Esimerkki 29

7-fluoro-6-metyyli-5-nitro-1,4-dihydro-2,3-kinoksalinidioni

2,5-difluoro-4-nitrotolueeni. Sekoitettuun 2,5-difluoritolueenin (0,544 g, 4,25 mmol, Aldrich, käytetty sellaisenaan) liuokseen väkevässä H_2SO_4:ssa (5,0 ml) 0 °C lämpötilassa, lisättiin kerralla KNO_3:a (0,430 g, 4,25 mmol). Saadun vaaleankeltaisen liuoksen annettiin lämmetä 28° lämpötilaan, ja sitä sekoitettiin tässä lämpötilassa yön yli. Tämän jälkeen liuos kaadettiin jään (25 g) joukkoon ja uutettiin etyyliasetaatilla (40 ml). Uute kuivattiin Na_2SO_4:llä ja haihdutettiin, jolloin saatiin 0,555 g (91 %) otsikon mukaista yhdistettä punaisena öljynä; ^{1}H NMR ($CDCl_3$); δ 2,369 (d, 3H, J = 1,8 Hz), 7,127 (dd, 1H, J_1 = 8,1 Hz, J_2 = 6,0 Hz), 7,734 (dd, 1H, J_1 = 8,4 Hz, J_2 = 6,3 Hz).

N-(4-fluoro-5-metyyli-2-nitrofenyyli)glysiinin natriumsuola. Sekoitettuun 2,5-difluori-4-nitrotolueeniin (0,550 g, 3,18 mmol) DMF:ssa (5,0 ml) lisättiin tipoittain natriumglysinaatin (0,308 g, 3,18 mmol, Aldrich, käytetty sellaisenaan) vesiliuosta (1,0 ml). Saatua suspensiota sekoitettiin 28 °C lämpötilassa yön yli. Kiinteä aine suodatettiin ja kuivattiin tyhjössä, jolloin saatiin 0,168 g (23 %) puhdasta (^{1}H NMR) otsikon mukaista yhdistettä keltaisena jauheena. ^{1}H NMR (DMSO-d_6):2,213 (s, 3H), 3,428 (d, 2H, J = 3,9 Hx), 6,765 (d, 1H, J = 6,9 Hz), 7,700 (d, 1H, J = 10,5 Hz), 8,728 (s, 1H).

7-fluori-3,4-dihydro-6-metyylikinoksalini-2(1H)-oni. N-(4-fluoro-5-metyyli-2-nitrofenyyli)glysiinin natriumsuolan (0,125 g, 0,548 mmol) ja tina(II)klorididihydraatin (0,370 g, 1,64 mmol, Aldrich, käytetty sellaisenaan) seosta refluksoitiin 30 min ajan. Sen jälkeen seos jäähdytettiin huoneen lämpötilaan, ja liuotin poistettiin tyhjössä. Jäännös laimennettiin vedellä (4,0 ml) ja tehtiin emäksiseksi kylläisellä $NaHCO_3$:lla pH-arvoon noin 8. Saatu suspensio

uutettiin etyyliasetaatilla (30 ml). Uute kuivattiin Na_2SO_4:llä ja haihdutettiin, jolloin saatiin 0,032 g otsikon mukaista yhdistettä keltaisena jauheena, joka käytettiin sellaisenaan seuraavaan reaktioon; ^{1}H NMR (DMSO-d_6):2,024 (s, 3H), 3,607 (s, 2H), 5,751 (s, 1H), 6,453 (d, 1H, J = 9,9 Hz), 6,456 (d, 1H, J = 8,1 Hz), 10,162 (s, 1H).

7-fluori-6-metyyli-5-nitro-1,4-dihydro-2,3-kinoksalinioni. 7-fluori-3,4-dihydro-6-metyylikinoksalini-2(1H)-onin (0,023 g, 0,094 mmol) sekoitettuun liuokseen CF_3COOH:ssa (0,30 ml) lisättiin ylimäärin savuavaa HNO_3:a (0,020 ml), ja saatua punaista suspensiota sekoitettiin yön yli 28 °C lämpötilassa. Saatu punainen liuos jäähdytettiin jäähauteeessa ja laimennettiin vedellä (2,0 ml). Sakka suodatettiin, pestiin vedellä (2,0 ml) ja kuivattiin kuivauspistoolissa (tolueenirefluksi), jolloin saatiin 0,020 g (66 %) otsikon mukaista yhdistettä keltaisena jauheena; sp. 308-311 °C; ^{1}H NMR (DMSO-d_6): 2,106 (s, 3H), 7,058 (d, 1H, J = 9,9 Hz9, 11,769 (bs, 1H), 12,172 8s, 1H).

Esimerkki 30

6-kloori-5-syano-7-nitro-1,4-dihydrokinoksalini-2,3-dioni

2,6-dikloori-3-nitrobentsonitriilin (3,935g, 18,13 mmol, Lancaster, käytetty sellaisenaan) sekoitettuun liuokseen DMF:ssa (25 ml) 70°C lämpötilassa, lisättiin tipoittain natriumglysinaatin (1,760 g, 18,13 mmol, Aldrich, käytetty sellaisenaan) vesiliuosta (25 ml). Saatua liuosta sekoitettiin 70 °C lämpötilassa 48 h ajan. Suspension annettiin jäähtyä huoneen lämpötilaan, ja saostunut keltainen kiinteä aine suodatettiin, pestiin kloroformilla (20 ml) ja kuivattiin tyhjössä, jolloin saatiin 2,020 g (44 %) puhdasta (^{1}H NMR) N-(3'-kloori-2'-syano-6'-nitro)fenyyliglysiiniä keltaisena jauheena. ^{1}H NMR (DMSO-d_6): δ 3,668 (s, 2H, J =3,9 Hz), 6,857 (d, 1H, J = 9,0 Hz), 8,283 (d, 1H, J = 9,3 Hz), 9,572 (s, 1H).

N-(3'-kloori-2'-syano-6'-nitro)fenyyliglysiinin (2,000 g, 7,824 mmol, valmistettu edellä esitetyn mukaisesti) ja tina(II)kloridididihydraatin (6,000 g, 26,59 mmol, Aldrich, käytetty sellaisenaan) suspensiota etanolissa (40 ml) refluksoitiin 30 min ajan. Saatu suspensio jäähdytetttiin huoneen lämpötilaan, ja kiinteä aine suodatettiin, pestiin etanolilla (20 ml) ja kuivattiin tyhjössä, jolloin saatiin 1,261 g (78 5) puhdasta (^{1}H NMR) 6-kloori-5-syano-3,4-dihydrokinoksalini-2-(1H)-onia vaaleankeltaisena kiinteänä aineena. ^{1}H NMR (DMSO-d_6): δ 3,668 (d, 1H, J =8,4 Hz), 6,843 (d, 1H, J = 8,1 Hz), 6,912 (s, 1H), 10,682 (s, 1H).

6-kloori-5-syano-3,4-dihydrokinoksalini-2(1H)-onin (0,096 g, 0,46 mmol, valmistettu edellä esitetyn mukaisesti) suspensioon CH_3COOH:ssa (1,0 ml) lisättiin savuavaa typpihappoa (0,40 ml) siten, että muodostui tummanpunainen liuos. (Pienempi määrä savuavaa typpihappoa sai aikaan sekä osittain hapettuneita että täysin hapettuneita tuotteita sisältävän seoksen).Tämän jälkeen saatua liuosta sekoitettiin yön yli huoneen lämpötilassa. Haihtuvat yhdisteet poistettiin tyhjössä, ja jäännös laimennettiin vedellä (3,0 ml). Keltainen kiinteä aine suodatettiin, pestiin vedellä (2,0 ml) ja kuivattiin tyhjössä, jolloin saatiin 0,090 g (73 %) puhdasta (^{1} H NMR) otsikon mukaista yhdistettä keltaisena jauheena; sp. 327-331 °C, ^{1}H NMR (DMSO-d_6): δ 7,950 (s, 1H), 12,381 (s, 1H); IR (KBr, cm^{-1}): 3501,3452, 3157, 2259, 1740, 1712, 1635, 1607, 1550, 1396, 1340; alkuaineanalyysi $C_9H_3ClN_4O_4$:lle lask.: C, 40,55 %; H, 1,13 %; N, 21,02 %; havaittiin C, 40,57 %, H, 1,11 %; N, 20,84 %.

Esimerkki 31

5-syano-6,7-dikloori-1,4-dihydrokinoksalini-2,3-dioni

6-kloori-5-syano-7-nitrokinoksalin-2(1H),3(4H)-dionin (0,100 g, 0,38 mmol, valmistettu edellä esitetyn mukaisesti) ja tina (II)kloridididihydraatin (0,508 g, 2,25 mmol, Aldrich) suspensiota etanolissa refluksoitiin 24 h ajan. Sen jälkeen

saatu suspensio jäähdytettiin huoneen lämpötilaan, ja keltainen kiinteä aine suodatettiin, pestiin etanolilla (2,0 ml) ja kuivattiin vakuumissa, jolloin saatiin 0,078 g (88 %) 7-amino-6-kloori-5-syanokinoksalini-2(1H),3(4H)-dionia keltaisena jauheena; ^{1}H NMR (DMSO-d_6): ^{1}H NMR (DMSO-d_6): δ 7,950 (s, 1H), 12,381 (s, 1H); IR (Kbr, cm^{-1}):

Sekoitettuun 7-amino-6-kloori-5-syanokinoksalini-2(1H),3(4H)-dionin (0,035 g, 0,15 mmol, valmistettu edellä esitetyn mukaisesti) liuokseen väkevässä HCl:ssä (1,5 ml) 0°C lämpötilassa, lisättiin $NaNO_2$:n (0,060 g, 0,87 mmol) vesiliuosta (0,20 ml), ja saatua sameaa liuosta sekoitettiin jäähauteessa 2 h ajan. CuCl:n (0,100 g, 1,01 mmol) liuos väkevässä HCl:ssa (1,0 ml) lisättiin edellisen liuoksen joukkoon, kun kolvia jäähdytettiin jäähauteessa. Lisäyksestä aiheutui äkillinen N_2:n kehitys, ja saatua tummanvihreää suspensiota sekoitettiin 0 °C lämpötilassa 2 h ajan. Suspensioon lisättiin vettä (1,0 ml), ja sekoitusta jatkettiin yön yli huoneen lämpötilassa. Näin muodostuneeseen vaalean vihreään suspensioon lisättiin vettä (4,0 ml), sekoitusta jatkettiin vielä huoneen lämpötilassa 1 h ajan. Saostunut kiinteä aine suodatettiin, pestiin vedellä (2,0 ml), ja kuivattiin tyhjössä, jolloin saatiin 0,029 g (77 %) otsikon mukaista yhdistettä kerman värisenä kiinteänä aineena; sp. 327-335 °C (hajoaa); ^{1}H NMR (DMSO-d_6): δ 7,463 (d, 1H, J = 1,2 Hz), 12,306 (s, 2H). Aromaattisen signaalin koplaus hävisi lisättäessä 3 pisaraa metanoli d_4:a, viitaten siihen, että aromaattinen protoni on koplattu peri-N-H protonin kanssa; IR (KBr, cm^{-1}); 3574, 3479, 2237, 1737, 1710, 1392, 1271, 1183.

Esimerkki 32

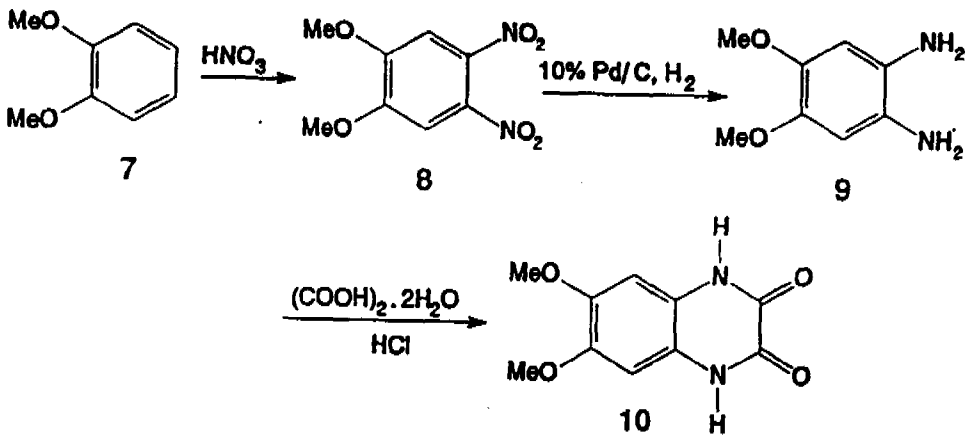
7-kloori-6-metoksi-5-nitro-1,4-dihydrokinoksalini-2,3-dioni

Sekoitettuun 7-kloori-6-fluori-5-nitrokinoksalini-2(1H),3(4H)-dionin (0,100 g, 0,385 mmol, valmistettu edellä esitetyn mukaisesti) liuokseen DMSO:ssa (1,0 ml) huoneen

lämpötilassa lisättiin yhtenä annoksena natriummetoksidia (0,125 g, 2,31 mmol, Mallinckrodt). Saatua tummanpunaista liuosta sekoitettiin yli yön huoneen lämpötilassa. Tämän jälkeen liuos laimennettiin vedellä (5,0 ml) ja tehtiin happameksi väkevällä HCl:lla (6 tippaa) pH-arvoon noin 2. Saostunut kiinteä aine suodatettiin, pestiin vedellä (5 ml) ja kuivattiin vakuumissa, jolloin saatiin 0,116 g (110 %) puhdasta (^{1}H NMR) otsikon mukaista yhdistettä keltaisena jauheena, sp. tummuu 316 °C lämpötilassa; ^{1}H NMR (DMSO-d_6): δ 3,821 (s, 3H), 7,275 (s, 1H), 12,079 (s, 1H), 12,121 (s, 1H). NMR-spektri ilmaisee myös DMSO:n läsnäolon (reaktioliuotin).

Esimerkki 33

6,7-dimetoksi-1,4-dihydrokinoksalini-2,3-dioni (10)

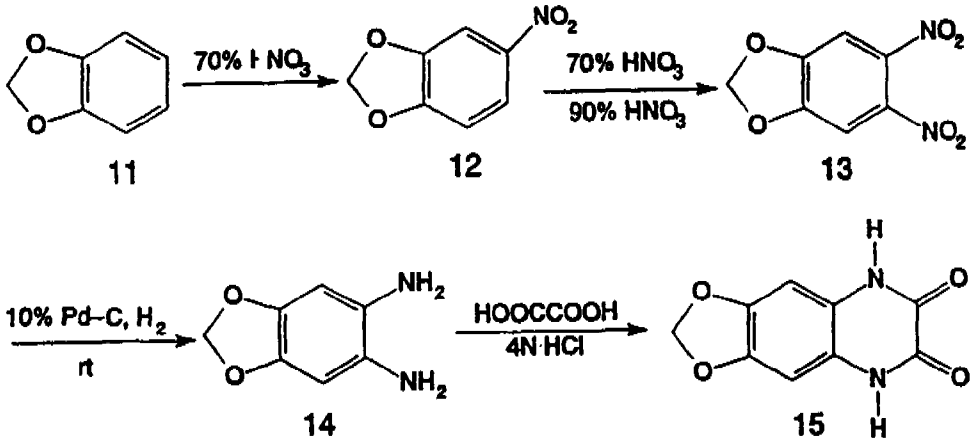


4,5-dimetoksi-1,2-dinitrobentseeni (8). Reaktiossa käytettiin Wulfmanin ja Cooperin, *Synthesis 924* (1978) esittämää menetelmää. 1,2-dimetoksibentseeniä 7 (20,8 g, 0,15 mol; Aldrich), lisättiin tipoittain 30 min. ajan kiivaasti sekoitettuun 70 % typpihappoon (175 ml) typpi-ilmakehässä. Lämpötila pidettiin 50 °C alapuolella lisäyksen aikana. Heti lisäyksen jälkeen, keltainen kiinteä aine saostui. Seos lämmitettiin sen jälkeen 70-80 °C lämpötilaan noin 2 h ajaksi (kunnes NO_2:n kehitys loppui). Seoksen annettiin jäähtyä alle 40 °C lämpötilaan, jonka jälkeen se kaadettiin jää/vesi (1000 ml) seokseen ja suodatettiin imulla. Keltainen kiinteä aine lietettiin kylläiseen natriumbikarbonaattiliuokseen (500 ml) yön yli. Raaka tuote eristettiin imusuodatuksella ja

puhdistettiin uudelleenkiteyttämällä etyylialkoholista (1000 ml). Otsikon mukaista yhdistettä saatiin hienoina keltaisina neulasina (23 g, 67 %). Sp. 128-130 °C (kirj. sp. 127-128 °C, Frisch ja Bogert, *J. Org. Chem. 8*: 331 (1943)). ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300 Mhz) δ 3,677 (s, H), 6,681 (s, 2H), 11,695 (s, 2H). EIMS m/e 222 (100, M+). (HPLC-puhtaus 99 %).

Esimerkki 34

6,7-metyleenidioksi-1,4-dihydrokinoksalini-2,3-dioni (15)



4,5-metyleenidioksinitrobentseeni (12). 1,3-bentsodioksolia (13,33 g, 109 mmol; Aldrich) lisättiin tipoittain sekoitettuun kylmään (-5 -0 °C) väkevään typpihappoon (150 ml), sellaisella nopeudella, että lämpötila ei noussut yli 0°C 90 min aikana jää/suolahauteessa. Lisäyksen jälkeen seosta sekoitettiin 0 °C lämpötilassa 3 h ajan ja kaadettiin sen jälkeen jää/vesiseoksen joukkoon (750 ml). Tuote eristettiin suodattamalla, pestiin kylmällä vedellä kunnes pesuvedet eivät enää olleet happamia (6 x 50 ml), ja sen jälkeen kylläisellä natriumbikarbonaatilla (50 ml), jolloin saatiin 17,23 g (95 %) otsikon mukaista yhdistettä keltaisena kiinteänä aineena, sp. 147-148 °C, Perkin et al. *J. Chem. Soc. 94*: 1979 (1909)) ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300 Mhz) δ 6,142 (s,2H), 6,868 (d, 1H, J = 8,4 Hz), 7,667 (d, 1H, J = 1,5 Hz), 7,894 (d, 1H, J = 6,9 Hz).

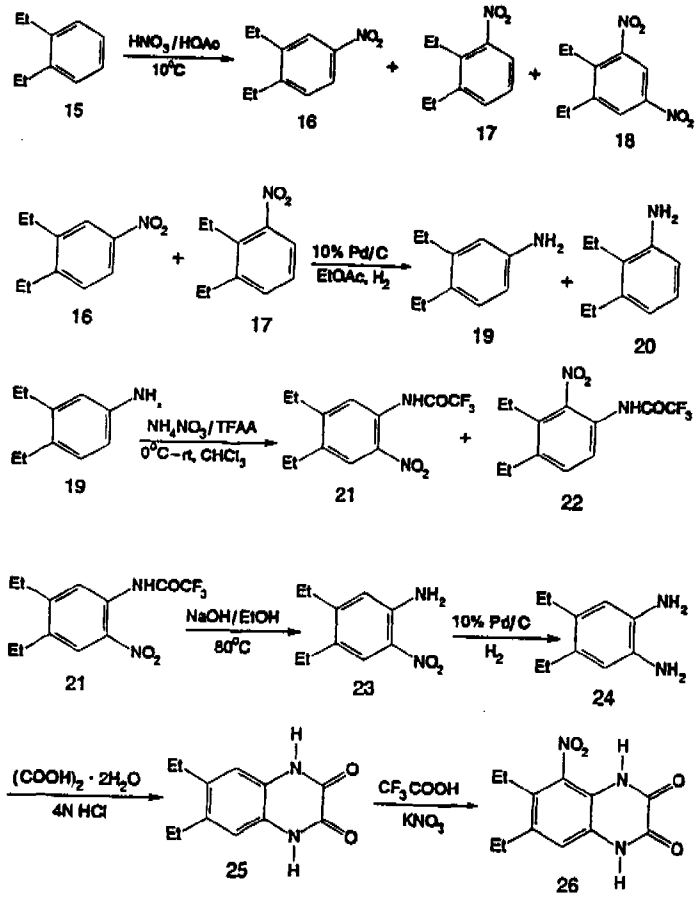
4,5-metyleenidioksi-1,2-dinitrobentseeni (13). 4,5-metyleenidioksinitrobentseeni **12** (17,23 g, 103 mmol)

jauhettiin hienoksi jauheeksi ja lisättiin yhtenä annoksena sekoitettuun 70 % (kons.) typpihapon (125 ml; Baker) ja 90 % (savuavan) typpihapon (125 ml; Baker) seokseen -15 °C lämpötilassa. Sen jälkeen seos kaadettiin jää/vesiseoksen joukkoon (1250 ml). Tuote eristettiin suodattamalla, pestiin kylmällä vedellä kunnes pesuvedet eivät enää olleet happamia (6 x 50 ml), ja sen jälkeen kylläisellä natriumbikarbonaatilla (50 ml), jolloin saatiin 19,1 g (87 %) otsikon mukaista yhdistettä keltaisena kiinteänä aineena. Sp. 99-100 °C 8kirj. sp 101 °C; Hughes ja Ritchie, *Aust. J. Chem.* 7:104 (1954) ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300 Mhz) δ 6,270 (s, 2H), 7,303 (s, 2H).

6,7-metyleenidioksi-1,4-dihydrokinoksalini-2,3-dioni (15). 4,5-metyleenidioksi-1,2-dinitrobentseeniä 13 (1,37 g, 6,47 mmol) liuotettiin etyyliasetaattiin (20 ml). Tähän liuokseen lisättiin 10% Pd/C (343 mg, 20 %; Aldrich). Sen jälkeen seosta sekoitettiin huoneen lämpötilassa 40 psi (H_2) paineessa 14 h ajan. Katalyytti poistettiin Celite (5 g) kolonnilla ja pestiin etyyliasetaatilla (3 x 15 ml) typpi-ilmakehässä. Suodokset yhdistettiin ja liuotin poistettiin, jolloin saatiin diamiinia **14** lähes värittömänä kiinteänä aineena. ^{1}H NMR-spektri oli yhdenmukainen ko. rakenteen kanssa. Diamiini **14** liuotettiin 4 N kloorivetyhappoon (7 ml) ja oksaalihapon dihydraattia (983 mg, 6,47 mmol) lisättiin liuokseen yhtenä annoksena sekoittaen N_2-ilmakehässä. Seosta refluksoitiin 130-135 °C lämpötilassa (öljyhaude) 3 h ajan. Saostunut keltainen kiinteä aine kerättiin imusuodatuksella ja kuivattiin yön yli, jolloin saatiin 1,18 g (88,7 %, laskettuna yhdisteestä **13**) otsikon mukaista yhdistettä ruskeana kiinteänä aineena; sp.> 360 °C; ^{1}H NMR (DMSO-d_6, 300 Mhz) δ 5,998 (s, 2H), 6,775 (s, 2H), 11,695 (s, 2H). EIMS m/e 206 (100, M+). (HPLC-puhtaus 98 %).

Esimerkki 35

6,7-dietyyli-5-nitro-1,4-dihydrokinoksalini-2,3-dioni (26)



1,2-dietyyli-4-nitrobentseeni (16), 1,2-dietyyli-3-nitrobentseeni (17) ja 4,5-dietyyli-1,3-dinitrobentseeni(18).

Reaktiossa käytettiin artikkelissa Lambooy, J.P., *J. Am. Chem. Soc.* *71*:3756 (1949) esitettyä menetelmää. Savuavan typpihapon (8,75 ml; Baker) ja jääetikan (4,5 ml) seos jäähdytettiin 10 °C lämpötilaan. Tähän seokseen lisättiin tipoittain 1,2-dietyylibentseeniä **15** (2,5 g, 18,6 mmol; Aldrich) sellaisella nopeudella, että seoksen lämpötila saatiin pysymään 10-20 °C:ssa kiivaalla sekoituksella yli 30 min ajan. Kun lisäys oli tehty, reaktion annettiin edetä sekoituksessa 15 °C lämpötilassa vielä 1 h ajan. Sen jälkeen reaktioseos kaadettiin jää/vesiseokseen (50 ml). Nitroyhdisteet uutettiin eetterillä (4 x 20 ml). Yhdistetyt eetteriuutteet pestiin vedellä (3 x 75 ml), 10 % natriumhydroksidiliuoksella (2 x 8 ml) ja vedellä (2 x 75

ml). Eetteriuute kuivattiin natriumsulfaatilla. Liuos haihdutettiin, jolloin saatiin jäännös, joka puhdistettiin preparatiivisella TLC:lla (Heksaanit: EtOAc= 8:2), jolloin saatiin mononitroyhdisteet **16** ja **17** (1,90 g, 57 %) keltaisena öljynä (R_f =0,5). ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz): δ (**16**): 1,220 (t, 6H, J = 7 Hz), 2,725 (q, 4H, J = 7 Hz), 7,728 (d, 1H, J = 6 Hz), 7,986 (d, 1H, J =6 Hz), 8,034 (s, 1H). (**17**): 1,220 (t, 6H, J = 7 Hz), 2,725 (q, 4H, J = 7 Hz), 7,242 (m, 1H), 7,378 (d, 1H, J = 7,5 Hz), 7,550 (d, 1H, J=7,5 Hz). (**18**): 1,231 (t, 6H, J = 7 Hz), 2,655 (q, 4H, J = 7 Hz), 8,044 (s, 1H9, 10,636 (s, 1H).

3,4-dietyylianiliini (19) ja 2,3-dietyylianiliini (20). 1,2-dietyyli-4-nitrobentseenin (**16**) ja 1,2-dietyyli-3-nitrobentseenin (**17**) seosta (1,4 g, 7,82 mmol) liuotettiin etyyliasetaattiin (20 ml). Tähän liuokseen lisättiin 10% Pd-C (350 mg, 20%; Aldrich). Seosta sekoitettiin huoneen lämpötilassa 35 psi (H_2) paineessa 10 h ajan. Katalyytti poistettiin Celite (5g) kolonnilla ja pestiin etyyliasetaatilla (3 x 15 ml). Suodokset yhdistettiin ja haihdutettiin tyhjössä, jolloin saatiin jäännös, joka erotettiin preparatiivisella TLC.llä (Heksaanit:EtOAc = 8:2), jolloin saatiin 3,4-dietyylianiliinia (**19**) (0,822 g, 71 %) vaalean keltaisen aöljynä (R_f =0,7) ja 2,3-dietyylianiliinia (**20**) (0,219 g, 19 %) ruskeana öljynä (R_f = 0,6). ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300 Mhz): δ (**19**): 1,184 (t, 6H, J = 7 Hz), 2,573 (q, 4h, J = 7 Hz), 3,456 (br, s, 2H) 6,513 (m,2H), 6,970 (d,1H, J = 7,8 Hz). (**20**): 1,215 (t, 6H, J = 7 Hz), 2,617 (q, 4H, J = 7 Hz), 6,570 (d, 1H, J = 7,5 Hz), 6,650 (d, 1H, J = 7,5 Hz), 6,973 (m, 1H).

4,5-dietyyli-2-nitrofluoriasetyylianilidi (21) ja 3,4-dietyyli-2-nitrotrifluoriasetyylianilidi (22). 15 ml suuruiseen, yksikaulaiseen, pyöreäpohjaiseen, magneettisekoittimella varustettuun pulloon, jossa oli palautusjäähdytin ja kuivausputki, lisättiin 3,4-dietyylianiliinia **19** (0,822 g, 5,52 mmol), ammoniumnitraattia

80,456 g, 5,70 mmol; Baker) ja trifluorietikkahappoanhydridiä (5 ml, 35,0 mmol; Sigma). Tähän seokseen lisättiin kloroformia (10 ml) 0 °C lämpötilassa N_2 -ilmakehässä sekoittaen. Seoksen annettiin sekoittua huoneen lämpötilassa 2,5 h ajan. Seos kaadettiin jään joukkoon (20 g), uutettiin kloroformilla (3 x 20 ml), ja kuivattiin natriumsulfaatilla. Liuotin poistettiin imurilla, jolloin saatiin jäännös, joka erotettiin preparatiivisellä TLC:lla (heksaanit: EtOAc = 8:2), tuotteiksi saatiin 4,5-dietyyli-2-nitrofluoriasetyylianilidia (**21**) (0,898 g, 56 %) keltaisena kiinteänä aineena; sp. 58-60 °C; ja 3,4-dietyyli-2-nitrotrifluoriasetyylianilidia (**22**) (0,30 g, 18 %) ruskeana kiinteänä aineena, sp. 70-72 °C. ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300 Mhz): δ (**21**): 1,275 (m, 6H), 2,742 (m, 4H), 8,099 (s, 1H), 8,539 (s, 1H), 11,375 (s, 1H); (22): 1,262 (m, 6H), 2,661 (m, 4H), 7,420 (d, 1H, J = 8,7 Hz), 7,915 (d, 1H, J = 8,7 Hz), 8,742 (s, 1H).

4,5-dietyyli-2-nitroaniliini (23). 4,5-dietyyli-2-nitrofluoroasetyylianilidin (**21**) (0,898 g, 3,1 mmol) liuokseen absoluuttisessa alkoholissa (30 ml) lisättiin 10 % natriumhydroksidin vesiliuosta (10 ml). Liuosta sekoitettiin 80 °C lämpötilassa (öljyhauteessa) 4 h ajan. Etanoli haihdutettiin tyhjössä, jolloin saatiin oranssi kiinteä aine, joka kerättiin imusuodatuksella, pestiin vedellä (3 x 15 ml) ja kuivattiin tyhjössä, jolloin saatiin 567 mg (95 %) otsikon mukaista yhdistettä **23** oranssina kiinteänä aineena; sp. 63-65 °C (kirj. 64-65 °C; Lambooy, J.P., *J. Am. Chem. Soc* 71:3756 (1949)); ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300 Mhz): δ 1,242 (m, 6H), 2,568 (m, 4H), 5,846 (br, s, 2H), 6,593 (s, 1H), 7,899 (s, 1H).

4,5-dietyyli-1,2-diaminobentseeni (24). 4,5-dietyyli-2-nitroaniliinia (**23**) (567 mg, 2,92 mmol) liuotettiin etyyliasetaattiin (20 ml). Tähän liuokseen lisättiin 10% Pd-C (142 mg, 20%; Aldrich). Seosta sekoitettiin huoneen lämpötilassa 35 psi (H_2) paineessa 10 h ajan. Katalyytti poistettiin Celite (5g) kolonnilla ja pestiin

etyyliasetaatilla (3 x 20 ml). Suodokset yhdistettiin ja haihdutettiin tyhjössä, jolloin saatiin 4,5-dietyyli-1,2-diaminobentseeniä **24** (459 mg, 96 %) värittömänä kiinteänä aineena; sp. 114-116 °C (kirj. 114-115 °C ; Lambooy, J.P., *J. Am. Chem. Soc* 71:3756 (1949)); ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300 Mhz): δ 1,158 (t, 6H, J = 7,5 Hz), 2,498 (q, 4H, J = 7,5 Hz), 2,908 (br, s, 4H), 6,555 (s, 2H).

6,7-dietyyli-1,4-dihydrokinoksalini-2,3-dioni (25). 4,5-dietyylidiaminobentseeni **24** (459 mg, 2,80 mmol) liuotettiin 4 N kloorivetyhappoon (12 ml) 90°C lämpötilassa. Oksaalihapon dihydraattia (983 mg, 6,47 mmol) lisättiin liuokseen yhtenä annoksena sekoittaen N_2-ilmakehässä. Seosta refluksoitiin 130-135 °C lämpötilassa (öljyhaude) 3 h ajan. Saostunut keltainen kiinteä aine kerättiin imusuodatuksella ja kuivattiin yön yli, jolloin saatiin 538 mg (88 %) otsikon mukaista yhdistettä **25** ruskeana kiinteänä aineena; sp.> 360 °C; ^{1}H NMR (DMSO-d_6, 300 MHz) δ 1,092 (t, 6H, J = 7,5 Hz), 2,510 (q, 4H, J = 7,5 Hz), 6,867 (s, 2H), 11,742 (s, 2H). EIMS m/e 218 (95, M^+), 203 (100, M^+-CH_3). (HPLC- puhtaus 100%).

5-nitro-6,7-dietyyli-dihydrokinoksalini-2,3-dioni (26). 6,7-dietyyli-2,3-kinoksalinidionia **25** (218 mg, 1,0 mmol) lisättiin trifluorietikkahappoon (8 ml, Sigma). Tähän seokseen lisättiin kaliumnitraattia (121,2 mg, 1,2 mmol; Baker) kerta-annoksena N_2 -ilmakehässä sekoittaen. Seosta sekoitettiin huoneen lämpötilassa 48 h ajan. Trifluorietikkahappo haihdutettiin tyhjössä eroon jäännöksestä. Jäännökseen lisättiin vettä (10 ml) kiivaasti sekoittaen. Keltainen kiinteä aine saostui, ja se kerättiin imusuodatuksella ja kuivattiin tyhjössä, jolloin saatiin 182 mg (69 %) otsikon mukaista yhdistettä **26** keltaisena kiinteänä aineena; sp. 270-272(haj.) °C. ^{1}H NMR (DMSO-d_6, 300 MHz) δ 1,137 (m, 6H), 2,622 (m, 4H), 7,088 (s, 1H), 11,762 (s, 1H), 12,028 (s, 1H). EIMS m/e 263 (100, M^+). (HPLC- puhtaus 100%).

Esimerkki 36

5-nitrosyklopento[g]-1,4-dihydrokinoksalini-2,3-dioni

5-asetamidoindaani. Liuokseen, joka sisälsi 5,2 g (39 mmol)5-aminoindaania 15 ml:ssa dioksaania jäähauteessa lisättiin tipoittain 8 ml (8,6 g, 84 mmol) etikkahapon anhydridiä. Liuosta sekoitettiin huoneen lämpötilassa 16 tunnin ajan. Liuos laimennettiin 70 ml:lla vettä. Seos suodatettiin, pestiin vedellä ja kuivattiin, jolloin saatiin harmaata kiinteä ainetta 6,21 g (91 %). ^{1}H NMR ($CDCl_3$), 2,069 (m, 2), 2,165 (s, 3), 2,879 (m,4), 7,20 (mb, 1), 7,145 (s,2), 7,441 (s,1).

5-asetamido-6-nitroindaani. Liuokseen, joka sisälsi 5,59 g (31,9 mmol) 5-asetamidoindaania 55 ml:ssa H_2SO_4:a jäähauteessa lisättiin kerta-annoksena 3,62 g KNO_3 (35,8 mmol). Liuosta sekoitettiin jäähauteessa 2 h ajan ja huoneen lämpötilassa yön yli. Liuos lisättiin 500 ml:an jäävettä, ja sitä sekoitettiin 1 h ajan. Sakka suodatettiin, pestiin vedellä ja annettiin kuivua, jolloin saatiin musta kiinteä aine, joka erotettiin kromatografisesti (silikageeli, eluoitu heksaani/etyyliasetaatilla = 10:1), jolloin saatiin 1,06 g (15 %) keltaista kiinteää ainetta. ^{1}H NMR ($CDCl_3$),2,142 (m, 2), 2,279 (s, 3), 3,00 (m, 4), 8,44 (s, 1), 8,575 (s, 1), 10,389 (s, 1).

5-amino-6-nitroindaani. Seosta, joka sisälsi 259 mg (1,16 mmol) 5-asetamido-6-nitroindaania 4 ml:ssa 2N HCl:a lämmitettiin 85 °C lämpötilassa 9 h ajan ja jäähdytettiin huoneen lämpötilaan. Kiinteä sakka suodatettiin, pestiin vedellä ja kuivattiin, jolloin saatiin 210 mg (97 %) kiteistä keltaista kiinteää ainetta. ^{1}H NMR ($CDCl_3$), 2,068 (m, 2), 2,843 (m, 4), 6,00 (sb, 2), 6,650 (s, 1), 7,942 (s, 1).

5,6-diaminoindaani. Liuosta, joka sisälsi 200 mg (1,12 mmol) 5-amino-6-nitroindaania ja 1,14 g (6,01 mmol) $SnCl_2$ 8 ml:ssa etanolia lämmitettiin 70 °C lämpötilassa 2 h ajan. Liuos

haihdutettiin etanolin poistamiseksi. Jäännös käsiteltiin 40% NaOH:n vesiliuoksella pH-arvoon 12. Seos laimennettiin 4 ml:lla vettä ja uutettiin $CHCl_3$:lla (3 x 10 ml). Uute kuivattiin ($MgSO_4$) ja haihduttettiin, jolloin saatiin keltainen kiteinen kiinteä aine (162 mg, 97 %). ^1H NMR ($CDCl_3$), 2,012 (m, 2), 2,773 (t, 4, J = 7,25), 3,301 (sb, 4), 6,614 (s, 2).

Syklopento[g]-1,4-dihydrokinoksalini-2,3-dioni. Seosta, joka sisälsi 162 mg (1,09 mmol) 5,6-diaminoindaania ja 108 mg (1,20 mmol) oksaalihappoa 3 ml:ssa 2N HCl:a refluksoitiin 3 h ajan ja jäähdytettiin huoneen lämpötilaan. Seos suodatettiin, pestiin vedellä, ja kuivattiin, jolloin saatiin lähes väritön kiinteä aine (187 mg, 85 %); sp. >360 °C; ^1H NMR (DMSO-d_6), 1,985 (m, 2), 2,808 (t, 4, J = 7,28), 6,957 (s, 2), 11,833 (s, 2). MS, 202 (M^+, 100), 173 (90), 145 (10), 130 (20). HRMS, lask. $C_{11}H_{10}N_2O_2$ 202,0738, havaittiin 202,0747.

5-nitro-syklopento[g]-1,4-dihydrokinoksalini-2,3-dioni. Sekoitettuun seokseen, joka sisälsi 84 mg (0,41 mmol) syklopento[g]-1,4-dihydrokinoksalini-2,3-dionia 3 ml:ssa CF_3CO_2H:a lisättiin kerta-annoksena 44 mg (0,43 mmol) KNO_3:a. Seosta sekoitettiin huoneen lämpötilassa 14 h ajan, ja saatu punainen liuos haihdutettiin. Jäännös laimennettiin vedellä (4 ml). Seos suodatettiin, pestiin vedellä ja kuivattiin, jolloin saatiin keltainen kiinteä aine (74 mg, 73 %).^1H NMR (DMSO-d_6), 2,040 (m, 2), 2,926 (t, 2, J = 7,5), 3,085 (t, 2, J = 7,5), 7,259 (s,1), 11,175 (s,1), 12,233 (s,1).

Esimerkki 37

7-fluori-6-(n-butoksi)-5-nitro-1,4-dihydrokinoksalini-2,3-dioni (28)

Seokseen, joka sisälsi 25 mg (1,0 mmol) NaH:a ja 50 mg (0,67 mmol) n-butanolia, lisättiin 1,5 ml DMSO:a, ja seosta sekoitettiin 1 h ajan. Saatuun liuokseen lisättiin 27 mg (0,11 mmol) 6,7-difluoro-5-nitrokinoksalini-2,3-dionia (27),

ja liuosta sekoitettiin huoneen lämpötilassa 5 päivän ajan. Liuos laimennettiin 3 ml:lla vettä ja tehtiin happameksi 2 N HCl:lla pH-arvoon 1. Sakka suodatettiin, pestiin vedellä ja kuivattiin, jolloin saatiin 11 mg (33 %) keltaista kiinteää ainetta; sp. 290-292 °C; ^{1}H NMR (DMSO-d_6), 0,882 (t, 3, J = 7,4), 1,360 (m, 2), 1,595 (m, 2), 4,084 (t, 2, J = 6,3), 7,151 (1, d, J = 11,54), 11,98 (m, 1), 12,12 (m, 1), MS, 297 (M+, 20), 241 (100), 195 (20). HRMS, lask. $C_{12}H_{12}FN_3O_5$ 297,0755; havaittiin 297,0757.

Esimerkki 38

7-fluori-6-(3-fenyylipropoksi)-5-nitro-1,4-dihydro-kinoksalini-2,3-dioni (29)

Yhdiste **29** valmistettiin samalla tavalla kuin yhdiste **28**. 25 mg:sta (1,0 mmol) NaH:a ja 61 mg (0,44 mmol) 3-fenyylipropanolia ja 28 mg:sta (0,11 mmol) 6,7-difluoro-5-nitrokinoksalini-2,3-dionia (**27**) 2ml:ssa DMSO:a saatiin 25 mg (63 %) keltaista kiinteää ainetta; sp. 280-282 °C; ^{1}H NMR (DMSO-d_6), 1,923 (m, 2), 2,653 (t, 2, J = 7,8), 4,103 (t, 2, J = 6,1), 7,135-7,306 (m, 6), 11,98 (m, 1), 12,131 (s, 1). ^{19}F NMR, -133,87 (mb). MS, 359 (M+, 20),243 (15), 119 (40), 91 (100). NRMS, lask. $C_{17}H_{14}FN_3O_5$ 359,0911; havaittiin 359,0927.

Esimerkki 39

6-kloori-7-etyyli-5-nitro-1,4- dihydrokinoksalini-2,3-dioni (37)

3-etyyli-5-nitroaniliini (30). 160 ml:aan huoneen lämpötilassa sekoitettua väkevää H_2SO_4:a lisättiin 24,5 g (0,20 mmol) 2-etyylianiliinia. Saatua liuosta pidettiin asetoni-jäähauteessa (-10 - -5 °C), ja 10,5 ml (15,75 g, 0225 mol) savuavaa HNO_3:a (d=150, > 90 % HNO_3) 20 ml:ssa väkevää H_2SO_4:a lisättiin tipoittain. Liuosta sekoitettiin asetoni-jäähauteessa 30 min ajan HNO_3:n lisäyksen jälkeen, jonka jälkeen liuoksen annettiin lämmetä huoneen lämpötilaan. Liuos

kaadettiin 1000 ml:an jäätä, jonka jälkeen seos neutraloitiin ammoniumhydroksidilla (30 %) pH-arvoon 8. Seosta sekoitettiin 1 h ajan, suodatettiin, pestiin vedellä ja kuivattiin, jolloin saatiin 32,2 g (97 %) punaista kiinteää ainetta. Uudelleen kiteyttämällä 100 ml:sta absoluuttista alkoholia saatiin 25,8 g keltaista kiinteää ainetta; sp. 60-61 °C (Lambooy & Lambooy, *J. Med. Chem. 16*:765-770 (1973): 63-64 ° C); ^{1}H NMR ($CDCl_3$), 1,128 (t, 3, J = 7,5), 2,565 (q, 2, J = 7,6), 3,915 (sb, 2), 7,177 (d, 1, J = 8,2), 7,502 (d, 1, J = 2,2), 7, 582 (dd, 1, J = 2,2, 8,3).

3-kloori-4-etyylinitrobentseeni (31). Seosta, joka sisälsi 8,3 g (50 mmol) yhdistettä **30** 40 ml:ssa väkevää HCl:a ja 40 ml H_2O:a lämmitettiin 80 °C lämpötilassa 1 h ajan. Seos jäähdytettiin jäähauteessa ja 3,6 g (52 mmol) $NaNO_2$:a 6 ml:ssa H_2O:a lisättiin tipoittain. Liuos lisättiin tipoittain sekoitettuun liuokseen, joka sisälsi 10 g (102 mmol) CuCl:a 40 ml:ssa väkevää HCl:a, ja jota pidettiin jäähauteessa. Seosta sekoitettiin jäähauteessa 1 h ajan diatsoniliuoksen lisäyksen jälkeen ja uutettiin $CHCl_3$:lla (3 x 40 ml). Uute kuivattiin ($MgSO_4$) ja haihdutettiin, jolloin saatiin 9,2 g (99 %) vaalen punertavaa öljyä. ^{1}H NMR ($CDCl_3$), 1,276 (t, 3, J = 7,5), 2,851 (q, 2, J 0 7,5), 7,408 (d, 1, J = 8,5), 8, 064 (dd, 1, J = 2,0, 8,4), 8,227 8d, 1, J = 2,0).

3-kloori-4-etyylianiliini (32). Liuosta, joka sisälsi 8,9 g (48 mmol) yhdistettä **31** ja 54,6 g (241 mmol) $SnCl_2x2H_2O$ 100 ml:ssa absoluuttista alkoholia, refluksoitiin 1 h ajan. Liuos haihdutettiin suurimman osan liuottimesta poistamiseksi, ja jäännös käsiteltiin 2N NaOH:lla pH-arvoon 9. Seos suodatettiin, ja kiinteä aine pestiin metanolilla (10 ml) ja etyyliasetaatilla (200 ml). Suodos erotettiin ja vesifaasi uutettiin etyyliasetaatilla (2 x 50 ml). Yhdistetyt orgaaniset liuokset kuivattiin ($MgSO_4$) ja haihdutettiin, jolloin saatiin 7,31 g (98 %) nestettä. ^{1}H NMR ($CDCl_3$), 1,293 (t, 3, J = 7,5), 2,825 (q, 2, J = 7,7), 8,197 (s, 1), 8,805 (s, 1), 11,35 (mb, 1).

4-kloori-5-etyyli-2-trifluoriasetamidonitrobentseeni (33). 22 ml:an jäähauteessa pidettyä $(CF_3CO)_2O$:a lisättiin tipoittain 2,56 g (16,4 ml) yhdistettä **32** , ja saatua seosta sekoitettiin huoneen lämpötilassa 1 h ajan. Jäähauteessa olevaan seokseen lisättiin kerta-annoksena 1,72 g (17,0 mmol) KNO_3:a, ja saatua liuosta sekoitettiin 1 h ajan jäähauteessa ja huoneen lämpötilassa yön yli. Liuos lisättiin 100 ml:an jäävettä, muodostunut sakka, suodatettiin, pestiin vedellä ja kuivattiin, jolloin saatiin vaalean keltaista kiinteää ainetta. Aine kiteytetttiin uudelleen absoluuttisesta alkoholista (30 ml), jolloin saatiin 2,55 g 852 %) väritöntä kiinteää ainetta; sp. 82-83 °C; ^{1}H NMR ($CDCl_3$),1,293 (t, 3, J = 7,5), 2,825 (q, 2, J =7,7), 8,197 (s, 1), 11,35 (mb, 1).

3-kloori-4-etyyli-6-nitroaniliini (34). Seosta, joka sisälsi 1,4 g (4,7 mmol) yhdistettä **33** ja 10 ml 7 % K_2CO_3 metanoli/H_2O-liuoksena (3:2), sekoitettiin huoneen lämpötilassa 2 h ajan. Liuos laimennettiin 15 ml:lla vettä, suodatettiin, pestiin vedellä ja kuivattiin, jolloin saatiin 691 mg (73 %) keltaista kiinteää ainetta; sp. 100-101 °C; (Kirj. 104-106 °C Lambooy & Lambooy, *supra*). ^{1}H NMR ($CDCl_3$), 1,228 (t, 3, J = 7,5), 2,665 (q, 2, J = 7,5), 5,957 (sb, 2), 6,859 (s, 1), 7,995 (s, 1).

Etyyli-N-(3-kloori-4-etyyli-6-nitrofenyyli)glysinaatti (35). Seosta, joka sisälsi 200 mg (1,0 mmol) yhdistettä **34**, 140 mg K_2CO_3:a ja 2 ml etyylibromiasetaattia lämmitettiin 130 °C 3 vuorokauden ajan. Seos jäähdytettiin huoneen lämpötilaan, laimennettiin 10 ml:lla 1N NaOH:a, ja sekoitettiin huoneen lämpötilassa 4 h ajan. Seos tehtiin happameksi 2N HCl:lla pH-arvoon 1, suodatettiin, pestiin vedellä ja kuivatttiin, jolloin saatiin 280 mg (97 %) keltaista kiinteää ainetta. ^{1}H NMR (DMSO-d_6), 1,144 (t, 3, J = 7,4), 1,213 (t, 3, J = 7,1), 2,620 8q, 2, J = 7,4), 4,165 (q, 2, J = 7,1), 4,271 (d, 2, J = 5,8), 7,042 (s, 1), 8,034 (s, 1), 8,281 (s, 1).

6-kloori-7-etyyli-3,4-dihydrokinoksalini-2-oni (36). Liuosta,

joka sisälsi 280 mg (0,977 mmol) yhdistettä **35**, 950 mg (4,21 mmol) $SnCl_2x2H_2O$ ja 8 ml absoluuttista alkoholia, refluksoitiin 4 h ajan ja jäähdytettiin huoneen lämpötilaan. Liuos haihdutettiin, ja haihdutusjäännös käsiteltiin 1N NaOH:lla pH-arvoon 10. Seos suodatettiin, pestiin vedellä ja kuivattiin, jolloin saatiin kiinteä sakka. Sakkaa sekoitettiin 15 ml:ssa etyyliasetaattia ja suodatettiin. Suodos haihdutettiin, jolloin saatiin 137 mg (66 %) kiinteää ainetta. ^1H NMR (DMSO-d_6), 1,161 (t, 3, J = 7,4), 2,712 (q, 2, J = 7,6), 7,192 (s, 1), 12,209 (mb, 2). MS, 269 (M^+, 100), 254 (12), 226 (15), 160 (20). HRMS, lask. $C_{10}H_8ClN_3O_4$ 269,0198; havaittiin 269,0196.

6-kloori-7-etyyli-5-nitro 3,4-dihydrokinoksalini-2,3-dioni (37). Liuokseen, joka sisälsi 137 mg (0,65 mmol) yhdistettä **36** 4 ml:ssa CF_3CO_2H:a jäähauteessa, lisättiin tipoittain 0,4 ml savuavaa HNO_3:a. Liuosta sekoitettiin jäähauteessa 1 h ajan ja huoneen lämpötilassa yön yli. Liuos haihdutettiin, ja jäännös käsiteltiin 6 ml:lla vettä ja sekoitettiin 10 min ajan. Seos suodatettiin, pestiin vedellä ja kuivattiin, jollon saatiin keltainen kiinteä aine, 140 mg (80 %); sp. > 330 °C, ^1H NMR (DMSO-d_6), 1,161 (t, 3, J = 7,4), 2,712 (q, 2, J = 7,6); 7,192 (s, 1), 12,209 (mb, 2). MS, 269 (M^+, 100), 254 (12), 226 (15), 160 (20). HRMS, lask. $C_{10}H_8ClN_3O_4$:lle 269,0198; havaittiin 269,0196.

Esimerkki 40

6-kloori-7-etyyli-1,4-dihydrokinoksalini-2,3-dioni (39).

1,2-diamino-4-kloori-5-etyylibentseeni (38). Liuosta, joka sisälsi 271 mg (1,35 mmol) yhdistettä **34** ja 1,24 g (5,49 mmol) $SnCl_2x2H_2O$:a 5 ml:ssa absoluuttista alkoholia, refluksoitiin 2 h ajan. Liuos haihdutettiin, ja jäännös käsiteltiin 1N NaOH:lla pH-arvoon 10. Seosta uutettiin CH_2CL_2:lla (3 x 10 ml). Uute kuivattiin ($MgSO_4$) ja haihdutettiin, jolloin saatiin 229 mg (99 %) keltaista kiinteää ainetta. ^1H NMR ($CDCl_3$), 1,165 (t, 3, J = 7,5),

2,594 (q, 2, J = 7,2), 6,560 (s, 1), 6,696 (s, 1).

6-kloori-7-etyyli-1,4-dihydrokinoksalini-2,3-dioni (39). Seosta, joka sisälsi 228 mg (1,33 mmol) yhdistettä **38** ja 124 mg (1,38 mmol) oksaalihappoa 4 ml:ssa 2N HCl:a, refluksoitiin 4 h ajan. Liuos jäähdytettiin huoneen lämpötilaan, suodatettiin ja kuivattiin, jolloin saatiin 275 mg (92 %) ruskeaa kiinteää ainetta; sp. > 400 °C; ^{1}H NMR (DMSO-d_6), 1,134 (t, 3, J = 7,4), 2,635 (q, 2, J = 7,4), 7,026 (s, 1), 7,107 (s, 1), 11,890 (s, 1), 11,927 (s, 1). MS, 224 (M+, 100), 209 (45), 181 (80). HRMS, lask. $C_{10}H_9ClN_2O_2$:lle 224,0348, havaittiin 224,0359.

Esimerkki 41

6-kloori-7-etyyli-5-nitro-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dionin (37) ja 7-kloori-6-etyyli-5-nitro-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dionin (40) valmistus

Seokseen, jossa oli 232 mg (103 mmol) yhdistettä **39** 6 millilitrassa CF_3CO_2H:ssa, jäähauteessa, lisättiin 113 mg KNO_3:a annoksittain. Seosta sekoitettiin jäähauteessa 1 h ja huoneenlämpötilassa yön yli. Liuokseen lisättiin 28 mg KNO_3:a ja sitä sekoitettiin yön yli. Liuosta haihdutettiin ja jäännös käsiteltiin 10 millilitralla vettä, suodatettiin, pestiin vedellä ja kuivattiin, jolloin saatiin 227 mg (81 %) keltaista kiintoainetta. ^{1}H-NMR (DMSO-d_6), (**37**): 1,14 (m, 3), 2,712 (q, 2, J = 7,4), 7,193 (s, 1), 12,209 (mb, 2) ja (**40**): 1,14 (m, 3), 2,582 (q, 2, J = 7,4), 7,303 (s, 1), 12,0 (mb, 1), 12,17 (mb, 1). **37:40** = 1:1.

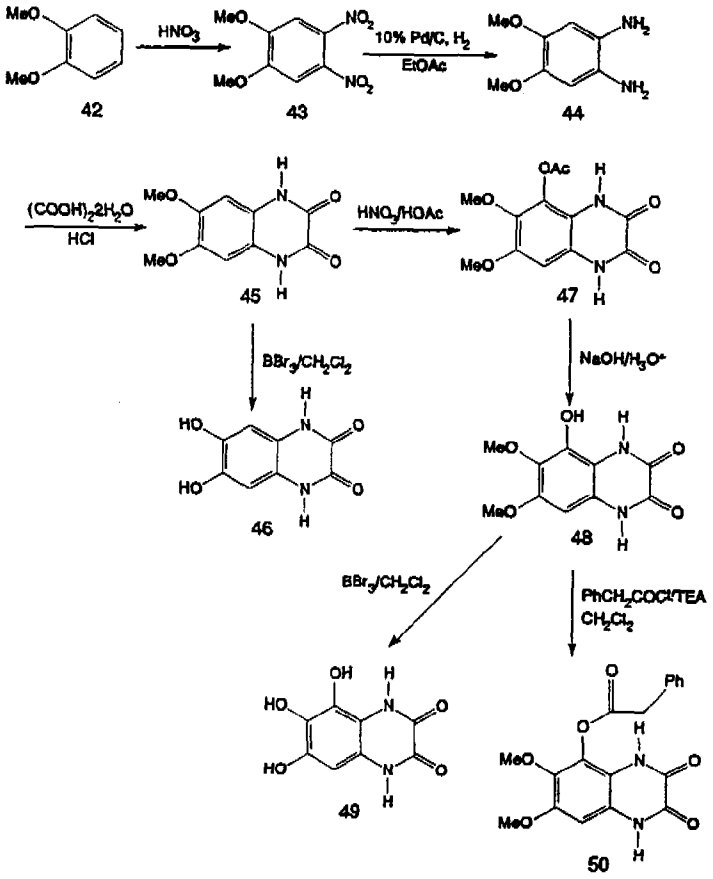
Esimerkki 42

6-kloori-7-fluori-5-trifluorimetyyli-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dionin (41) valmistus

Seosta, jossa oli 25 mg (0,095 mmol) 6-amino-7-fluori-5-trifluorimetyyli-kinoksaliini-2,3-dionia **29** 1,0 millilitrassa väkevää HCl:a, sekoitettiin jäähauteessa 1 tunti. Tuloksena

saatuun liuokseen lisättiin tipoittain 40 mg (0,58 mmol) $NaNO_2$:n liuosta 0,1 millilitrassa H_2O:a ja liuosta sekoitettiin jäähauteessa 4 tuntia. Liuokseen lisättiin tipoittain liuos, jossa oli 60 mg CuCl 0,3 millilitrassa 6 M HCl:a. Tuloksensa saatua seosta sekoitettiin jäähauteessa 4 tuntia ja huoneenlämpötilassa yön yli. Seos laimennettiin 1 millilitralla H_2O:a ja sekoitettiin 10 min, jonka jälkeen lisättiin vielä 1 ml H_2O:a sekoittaen toiset 10 minuuttia. Seos suodatettiin, pestiin vedellä ja kuivattiin, jolloin saatiin 21 mg (78 %) vaalean keltaista kiintoainetta; s.p. 323 - 325 °C; ^{1}H-NMR (DMSO-d_6), 7,337 (d, 1, J = 9,34), 10,95 (mb, 1), 12,309 (s, 1). MS, 282 (M^+, 100), 254 (20), 234 880), 207 (40). HRMS, laskettu: $C_9H_3ClF_4N_2O_2$ 281,9816; havaittu: 281,9833.

Esimerkki 43



4,5-dimetoksi-1,2-dinitrobentseeni (43). Tähän reaktioon käytettiin Wulfmanin ja Cooperin menettelytapaa, *Synthesis*

1978: 924. 1,2-dimetoksibentseeniä **42** (20,8 g, 0,15 mol Aldrich) lisättiin tipoittain, 30 minuutin aikana, voimakkaasti sekoitettuun 70 % typpihappoon (175 ml) typpikehässä. Lämpötilaa pidettiin alle 50 °C:ssa lisäyksen aikana. Pian lisäyksen päätyttyä saostui keltainen kiinteä aine. Seosta kuumennettiin sitten 70 - 80 °C:een noin 2 tuntia (kunnes NO_2:n kehittyminen päättyi). Seoksen annettiin jäähtyä alle 40 °C:een ja kaadettiin sitten jää/vesi-seokseen (1,000 ml) ja suodatettiin imusuodatuksella. Keltaista kiintoainetta lietettiin kylläisessä natriumbikarbonaatissa (500 ml) yön yli. Raakatuote erotettiin imusuodatuksella ja puhdistettiin sitten uudelleenkiteyttämällä etyylialkoholista (1,000 ml). Otsikon yhdistettä saatiin ohuina keltaisina neuloina (23 g, 67 %); s.p. 128 - 130 °C (kirj. s.p. 127 - 128 °C); ^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 300 MHz), δ 4,016 (s, 6H), 7,337 (s, 2H).

6,7-dimetoksi-2,3-kinoksaliinidioni (45) (43:sta, kaksi vaihetta). 4,5-dimetoksi-1,2-dinitrobentseeni (**43**) (912 mg, 4,00 mmol) liuotettiin etyyliasetaattiin (30 ml). Tähän liuokseen lisättiin 10 % Pd/C (228 mg, 20 %; Aldrich). Seosta sekoitettiin huoneenlämpötilassa 2,812 kg/cm^2 (40 psi) paineessa (H_2) 14 tunnin ajan. Katalyytti poistettiin Celite-kolonnissa (5 g) ja pestiin etyyliasetaatilla (3 x 15 cm) typessä. uutteet yhdistettiin ja liuotin poistettiin, jotta saatiin diamiinia (**44**) lähes värittömänä kiintoaineena. ^{1}H-NMR-spektri oli yhdenmukainen määritetyn rakenteen kanssa. Diamiinia (**44**) liuotettiin 4 M vetykloridihappoon (7 ml) ja oksaalihapodihydraatti 8504 mg, 4,00 mmol; Fisher) lisättiin tähän liuokseen yhtenä annoksena sekoittaen N_2-kehässä. Seosta refluksoitiin 130 - 135 °C:ssa (öljyhaude) 3 tunnin ajan. Keltainen kiintoaine saostui, ja se kerättiin imusuodatuksella ja kuivattiin tyhjössä yön yli, jolloin saatiin 725 mg (82 % yhdisteestä **43** laskettuna) otsikon yhdistettä vaalean keltaisena kiintoaineena; s.p. 345 - 346 °C; ^{1}H-NMR (MDSO-d_6, 300 Mhz) δ 3,677 (s, 3H), 6,681 (s, 2H), 11,695 (s, 2H). EIMS m/e 222 (100, M$^+$). (HPLC-puhtaus 99 %).

6,7-dihydroksi-2,3-kinoksaliinidioni (46). 6,7-dimetoksi-2,3-kinoksaliinidionin (**45**) (222 mg, 1,0 mmol) suspensioon 2 millilitrassa metyleenidikloridia lisättiin 5 ml booritribromidiliuosta metyleenidikloridissa (1 M, Aldrich). Tuloksena saatua seosta sekoitettiin huoneenlämpötilassa 24 tuntia. Seos kaadettiin sitten jääveteen (10 g) suspension muodostamiseksi. Suspensioon lisättiin natriumhydroksidin vesiliuosta (20 %, 10 ml), jolloin muodostui punainen liuos. Liuos tehtiin happamaksi 6 N HCl:lla (10 ml) pH-arvoon 1. Suspensio sentrifugoitiin, pestiin metanolilla ja kuivattiin tyhjössä, jolloin saatiin 170 mg (88 %) tuotetta ruskeana kiintoaineena; s.p. > 350 °C; ^{1}H-NMR (DMSO-d_6, 300 MHz) δ 6,541 (s, 2H), 8,989 (s, 2H), 11,543 (s, 2H). EIMS m/e 194 (100, M^+). (HPLC > 99 %).

5-asetoksi-6,7-dimetoksi-2,3-kinoksaliinidioni (47). 6,7-dimetoksi-2,3-kinoksaliinidioni (**45**) (222 mg, 1,0 mmol) liuotettiin jääetikkahappoon (10 ml) 100 °C.ssa (öljyhaude). Öljyhaude poistettiin ja liuokseen lisättiin tipoittain savuavaa typpihappoa (53 µl, 1,2 mmol; Baker). Sitten reaktioseosta sekoitettiin huoneenlämpötilassa 24 tuntia. Seos suodatettiin ja pestiin vedellä, jolloin saatiin valkoisen kiintoaineen muodossa 150 mg (54 %) otsikon yhdistettä; s.p. 321 - 322 °C; ^{1}H NMR (DMSO-d_6, 300 Mhz) δ 2,300 (s, 3H), 3,619 (s, 3H), 3,746 (s, 3H), 6,61 (s, 1H), 11,700 (s, 1 H), 11,832 (s, 1H). EIMS m/e 280 (M^+, 30), 238 (100). $C_{12}H_{12}N_2O_6$:n analyysi, laskettu: C 51,43; H 4,32; N 10,00. Havaittu: C 51,29; H 4,04; N 9,90. (HPLC-puhtaus > 99 %).

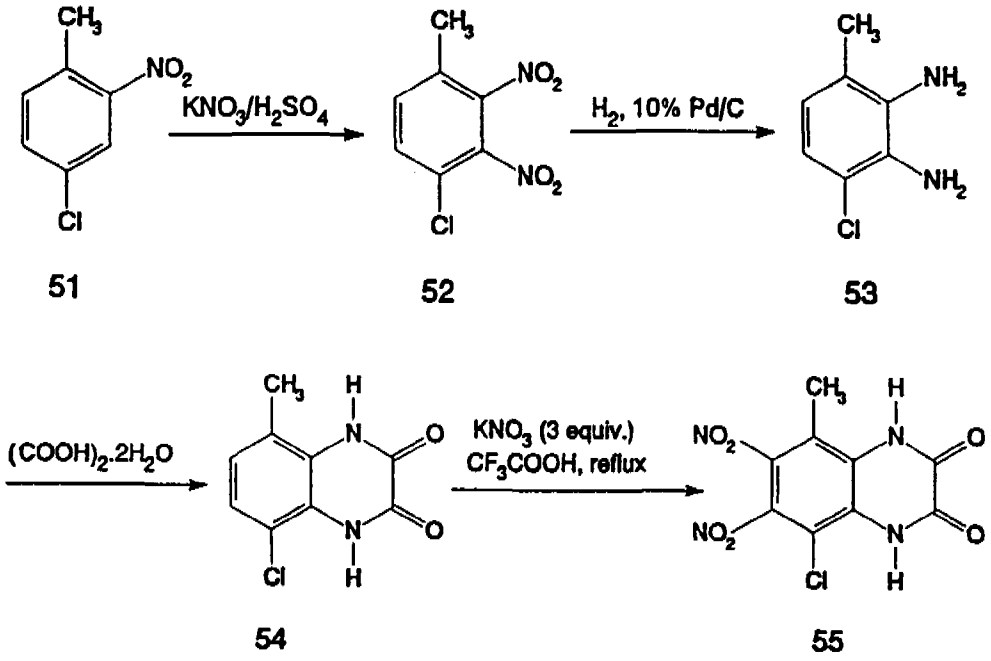
5-hydroksi-6,7-dimetoksi-2,3-kinoksaliinidioni (48). 5-asetyloksi-6,7-dimetoksi-2,3-kinoksaliinidioni (**47**) (30 mg, 0,107 mmol) lisättiin yksikaulaiseen 15 ml kolviin. Kolviin lisättiin typen alla sekoittaen natriumhydroksidin vesiliuosta (2 M, 1 ml). Sitten liuosta sekoitettiin huoneenlämpötilassa 24 tuntia. Liuos laimennettiin vedellä (3 ml) ja tehtiin sitten happamaksi Hcl:lla (4 M, 1 ml) pH-

arvoon 2, jolloin saatiin ruskea kiinteä aine, joka kerättiin suodattamalla ja kuivattiin tyhjössä, jolloin saatiin 23 mg (86 %) otsikon yhdistettä; s.p. 285 - 286 °C (haj.); ^{1}H NMR (DMSO-d_6, 300 Mhz)δ 3,688 (s, 3H), 3,694 (s, 3H), 6,227 (s, 1H), 9,769 (s, 1H), 11,016 (s, 1H), 11,658 (s, 1H). EIMS m/e 238 (100, M^+), HPLC-puhtaus > 96 %.

5,6,7-trihydroksi-2,3-kinoksaliinidioni (49). 5-hydroksi-6,7-dimetoksi-2,3-kinoksaliinidioni (**48**) (50 mg, 0,22 mmol) 2 millilitrassa metyleenidikloridia lisättiin 2 ml booritribromidin metyleenidikloridiliuosta (1M, Aldrich). Tuloksena saatua seosta sekoitettiin huoneenlämpötilassa 12 tuntia. Seos kaadettiin jää-vesi-seokseen (5 g) suspension muodostamiseksi. Lietteeseen lisättiin natriumhydroksidin vesiliuosta (20 %, 2 ml), jolloin muodostui punainen liuos. Sitten liuos tehtiin happamaksi 6 M Hcl:lla (5 ml) pH-arvoon 1. Liete sentrifugoitiin, pestiin metanolilla ja kuivattiin tyhjössä, jolloin saatiin 37 mg (80 %) tuotetta ruskeana kiintoaineena; s.p. > 350 °C; ^{1}H NMR (DMSO-d_6, 300 Mhz) δ 6,149 8s, 1H), 9,113 (s, 1H), 9,190 (s, 2H), 10,713 (s, 1H), 11,501 (s, 1H) (HPLC > 98 %).

5-(2-fenyyliasetyloksi)-6,7-dimetoksi-2,3-kinoksaliinidioni (50). 5-hydroksi-6,7-dimetoksi-2,3-kinoksaliinidionin (**48**) (50 mg, 0,22 mmol) lietteeseen 3 millilitrassa metyleenidikloridia lisättiin 0,14 ml trietyyliaminia ja fenyyliasetyylikloridia (77,5 mg, 0,5 mmol, Aldrich) 0 °C:ssa. Tuloksena saatua seosta sekoitettiin huoneenlämpötilassa 12 tuntia. Reaktioseos kaadettiin sitten jää-vesi-seokseen (5 g). Valkoinen, kiinteä aine saostui ja kerättiin imusuodatuksella, pestiin vedellä (3 x 5 ml) ja etyyliasetaatilla (3 x 2ml) ja kuivattiin tyhjössä, jolloin saatiin 60 mg (77 %) tuotetta valkoisena, kiinteänä aineena; s.p. 298 - 300 °C; ^{1}H NMR (DMSO-d_6, 300 Mhz) δ 3,405 8s, 3H), 3,728 (s, 3H), 4,024 (s, 2H), 6,653 (s, 1H), 7,359 (m, 5H), 11,773 (s, 1H), 11,846 (s, 1H). EIMS m/e 356 (25, M^+), 238 (100). (HPLC 100 %).

Esimerkki 44



4-kloori-2,3-dinitrotolueeni (52). 4-Kloori-2-nitrotolueeni **51** (1,716 g, 10mmol; Aldrich) liuotettiin 10 millilitraan väkevää rikkihappoa. Tähän liuokseen lisättiin kaliumnitraattia (1,212 g, 12 mmol; Baker). Tuloksena saatua seosta sekoitettiin 80 °C:ssa 12 tunnin ajan. Seos kaadettiin jääveteen (20 g). Saostuma kerättiin imusuodatuksella ja kuivattiin tyhjössä, jolloin saatiin 2 g kolmen isomeerin seosta. Flash-kromatografian jälkeen saatiin 0,519 g haluttua 4-kloori-2,3-dinitrotolueenia (**52**) (R_f = 0,36 heksaani:etyyliasetaatti = 7:3) 24 % saannolla; s.p. 78 - 80 °C; ^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 300 Mhz) δ 2,475 (s, 3H), 7,445 (d, 1H, J = 8,4 Hz), 7,610 (d, 1H, J = 8,4 Hz).

5-kloori-8-metyyli-2,3-kinoksaliinidioni (54) (kaksi vaihetta 52:sta). 4-kloori-2,3-dinitrotolueeni (**52**) (519 mg, 2,4 mmol) liuotettiin etyyliasetaattiin (6 ml). Tähän liuokseen lisättiin 10 % Pd/C (130 mg, 20 %; Aldrich). Seosta sekoitettiin sitten huoneenlämpötilassa 4,218 kg/cm^2 (60 psi) paineessa (H_2) 8 tunnin ajan. Katalyytti poistettiin Celite-kolonnissa (5 g) ja pestiin etyyliasetaatilla (3 x 15 ml) typessä. Uutteet yhdistettiin ja liuotin poistettiin, jolloin saatiin

diamiinia **53** ruskeana öljynä. ^{1}H-NMR-spektri vastasi määritettyä rakennetta. Diamiini **53** liuotettiin 4 M vetykloridihappoon (8 ml) ja oksaalihappodihydraattia (260 mg, 2,05 mmol; Fisher) lisättiin tähän liuokseen yhtenä annoksena, sekoittaen, N_2-kehässä. Seosta refluksoitiin 130 - 5 °C:ssa (öljyhaude) 6 tunnin ajan. Muodostui ruskea kiintoaine, joka kerättiin imusuodatuksella ja kuivattiin tyhjössä yön yli, jolloin saatiin 320 mg (63 % yhdisteestä **53** laskettuna) otsikon yhdistettä ruskeana kiintoainetta; s.p. > 350 °C; ^{1}H-NMR (DMSO-d_6, 300 MHz) δ 2,288 (s, 3H), 6,915 (d, 1H, J = 8,4 Hz), 7,080 (d, 1 H, J = 8, Hz), 11,230 (s, 1H), 11,277 (s, 1H). EIMS M/e 210 (100, M^+, ^{35}Cl), 149 (100). (HPLC > 97 %).

Esimerkki 45

6-kloori-1,4-dihydro-7-fluori-5-nitrokinoksaliini-2,3-dioni

1-kloori-2,5-difluori-4-nitrobentseeni. 1-Kloori-2,5-difluoribentseenin (0,770 g, 5,18 mmol) sekoitettuun liuokseen väkevässä H_2SO_4:ssa 8 8 ml) 0 °C.ssa, lisättiin yhtenä eränä KNO_3:a (0,525 g, 5,19 mmol). Tuloksena saadun keltaisen liuoksen annettiin lämmetä huoneenlämpötilaan ja sekoitettiin yön yli huoneenlämpötilassa. Sitten liuos kaadettiin jäähän (80 g) ja uutettiin etyyliasetaatilla (75 ml). Etyyliasetaatti kuivattiin vedettömän Na_2SO_4:n yläpuolella, poistettiin tyhjössä ja jäännös kuivattiin vielä tyhjössä, jolloin saatiin 0,845 g (85 %) otsikon yhdistettä keltaisena liuoksena; ^{1}H-NMR ($CDCk_3$) δ 7,43 (dd, 1 h, J_1 = 9,6 Hz, J_2 = 6,0 Hz), 7,93 (t, 1 H, J = 7,2 Hz).

N-(5'-kloori-4'-fluori-2'-nitrofenyyli)glysiinin natriumsuola. 1-Kloori-2,5-difluori-4-nitrobentseenin (0,825 g, 4,26 mmol) sekoitettuun liuokseen etanolissa (8,0 ml) lisättiin natriumglysinaatin (0,415 g, 4,27 mmol) liuos vedessä (1,5 ml). Tuloksena saatua suspensiota refluksoitiin 60 tuntia. Liuos jäähdytettiin huoneenlämpötilaan ja sasotunut kirkkaan oranssi kiintoaine suodatettiin, pestiin

kylmällä etanolilla ja kuivattiin tyhjössä, jolloin saatiin 0,673 g (64 %) otsikon yhdistettä kirkkaan oranssina jauheena; ^{1}H-NMR (DMSO-d_6) δ 3,50 (d, 2H, J = 3,6 Hz9, 7,04 (d, 1H, J = 6,6 Hz), 8,01 (d, 1H, J = 9,9 Hz), 8,74 (s, 1H). Reagoimaton 1-kloori-2,5-difluori-4-nitrobentseeni poistettiin lähes kvantitatiivisesti suodoksesta.

6-kloori-3,4-dihydro-7-fluori-kinoksaliini-2(1H)-oni. N-(5'-kloori-4'-fluori-2'-nitrofenyyli)glysiinin natriumsuolaa (0,650 g, 2,61 mmol) ja tina(II)klorididihydraatin (1,770 g, 7,845 mmol) suspensiota etanolissa (10,5 ml) refluksoitiin 1 tunti. Sitten suspensio jäähdytettiin huoneenlämpötilaan ja ~ 5 ml etanolia poistettiin tyhjössä. Saostunut kiintoaine kerättiin suodattamalla tyhjössä, pestiin etanolilla (3 ml) ja kuivattiin, jolloin saatiin 0,311 g (59 %) otsikon yhdistettä taitetun valkoisena jauheena; ^{1}H-NMR (DMSO-d_6) δ 3,69 (s, 2H), 6,08 (s, 1H), 6,55 (d, 1H, J = 9,9 Hz), 6,71 (d, 1H, J = 7,2 Hz), 10,39 (s, 1H). Liuotin poistettiin suodoksesta tyhjössä. Jäännös laimennettiin vedellä (15,0 ml) ja pH säädettiin 10 % Na_2CO_3:lla ~ 9. Tuloksena saatu suspensio uutettiin etyyliasetaatilla (50 ml). Etyyliasetaatti kuivattiin vedettömän Na_2SO_4:n yllä ja poistettiin tyhjössä, jolloin saatiin vielä 0,118 g (22 %) puhdasta (^{1}H-NMR) otsikon yhdistettä yhdistetyn saannon ollessa 81 %.

6-kloori-1,4-dihydro-7-fluori-5-nitrokinoksaliini-2,3-dioni. 6-kloori-3,4-dihydro-7-fluori-kinoksaliini-2-(1H)-onin (0,140 g, 0,698 mmol) sekoitettuun suspensioon TFA:ssa (3,0 ml) lisättiin savuavaa HNO_3:a (0,20 ml) ja tuloksena saatua punaista liuosta sekoitettiin yön yli huoneenlämpötilassa. Tuloksena saatu keltainen suspensio kaadettiin jääveteen (15,0 ml). Saostunut kiintoaine kerättiin tyhjösuodatuksella, pestiin vedellä (5,0 ml) ja kuivattiin kuivauspistoolissa (tolueenirefluksointi), jolloin saatiin 0,124 g (69 %) puhdasta (HPLC) otsikon yhdistettä keltaisena jauheena; ^{1}H-NMR (DMSO-d_6) δ 7,21 (d, 1H, J = 9,3 Hz), 12,20 (s, 1H),

12,30 (s, 1H).

Esimerkki 46

7-kloori-1,4-dihydro-6-etyyli-5-nitrokinoksaliini-2,3-dioni

2,5-dikloori-1-etyylibentseeni. Huokoisen sinkin (10 g) ja elohopeakloridin (0,5 g) suspensiota väkevässä HCl:ssa (0,5 ml) ja vedessä (5 ml) ravisteltiin noin 5 min. Sitten vesikerros dekantoitiin. Jäännökseen lisättiin väkevää HCl (7,5 ml) ja vettä (7,5 ml) ja sen jälkeen 2'-5'-diklooriasetofenonia (3,106 g, 16,43 mmol) ja suspensiota refluksoitiin 4 tunnin ajan, jona aikana lisättiin tunneittain väkevää HCl:a (90,5 ml). Tuloksena saatu suspensio jäähdytettiin huoneenlämpötilaan ja vesikerros dekantoitiin. Jäljellä jäänyt kiintoaine pestiin eetterillä (3 x 30 ml). Vesikerro uutettiin eetterillä (3 x 50 ml). Yhdistetty eetterikerros pestiin suolaliuoksella, kuivattiin vedettömän Na_2SO_4:n yläpuolella, ja poistettiin tyhjössä. Jäännös kuivattiin vielä tyhjössä, jolloin saatiin 2,664 g raakatuotetta, joka puhdistettiin silikageelillä (heksaani), jolloin saatiin 0,813 g (28 %) puhdasta (^{1}H-NMR) otsikon yhdistettä värittömänä nesteenä; ^{1}H-NMR (DMSO-d_6) δ 1,23 (t, 3H, J = 7,5 Hz), 2,73 (q, 2H, J = 7,5 Hz), 7,09 - 7,27 (m, 3H).

2,5-dikloori-4-etyyli-1-nitrobentseeni. 2,5-dikloori-1-etyylibentseenin (0,795 g, 4,68 mmol) jähmettyneeseen liuokseen väkevässä H_2SO_4:ssa (4,5 ml) 0 °C:ssa lisättiinKNO_3 (0,473 g, 4,68 mmol) yhtenä annoksena. Tuloksena saadun keltaisen liuoksen annettiin lämmetä huoneenlämpötilaan ja sekoitettiin yön yli huoneenlämpötilassa. Sitten liuos kaadettiin jäähän (80 g) ja uutettiin eetterillä (3 x 30 ml). Eetteri kuivattiin vedettömän Na_2SO_4:n yllä, poistettiin tyhjössä ja tuloksena saatua öljyä kuivattiin lisää tyhjössä, jolloin saatiin 0,943 g (92 %) otsikon yhdistettä öljynä; ^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ 1,27 (t, 3H, J = 7,5 Hz), 2, 80 (q, 2H, J = 7,5 Hz), 7,42 (2, 1H), 7,94 (s, 1H).

N-(4'-kloori-5'-etyyli-2'-nitrofenyyli)glysiinin natrium-suola. 2,5-dikloori-1-etyylibentseenin (0,585 g, 2,66 mmol) liuokseen etanolissa (10,0 ml) huoneenlämpötilassa lisättiin natriumglysinaatin (0,260 g, 2,68 mmol) liuosta vedessä (2,5 ml) ja tuloksena saatua suspensiota refluksoitiin 2 päivän ajan. Sitten liuos jäähdytettiin huoneenlämpötilaan ja saostunut punainen kiintoaine suodatettiin, pestiin etanolilla (4 ml) ja kuivattiin tyhjössä, jolloin saatiin 0,086 g (13 %) puhdasta (^{1}H-NMR) otsikon yhdistettä punaisena jauheena; ^{1}H-NMR (MDSO-d_6) δ 1,15 (t, 3H, J = 7,2 Hz), 2,63 (q, 2H, J = 7,2 Hz), 3,47 (d, 2H, J = 3,0 Hz), 6,77 (s, 1H), 8,77 (s, 1H). Reagoimaton 2,5-dikloori-4-etyyli-1-nitrobentseeni otettiin talteen suodoksesta lähes kvantitatiivisesti.

7-kloori-3,4-dihydro-6-etyylikinoksaliini-2(1H)-oni. N-(4'-kloori-5'-etyyli-2'-nitrofenyyli)glysiinin natriumsuolan (0,082 g, 0,31 mmol) ja tina(II)kloridididihydraatin (0,215 g, 0,953 mmol) etanolissa (1,0 ml) refluksoitiin 45 minuuttia. Sitten suspensio jäähdytettiin huoneenlämpötilaan ja saostunut kiintoaine suodatettiin, pestiin etanolilla (1,0 ml) ja kuivattiin tyhjössä, jolloin saatiin 0,048 g (72 %) puhdasta (^{1}H-NMR) otsikon yhdistettä vaalean keltaisena jauheena; ^{1}H-NMR (DMSO-d_6) δ 1,05 (t, 3H, J = 7,2 Hz), 2,52 (d, 2, J = 7,2), 3,67 (s, 2H), 6,04 (s, 1H), 6,67 (s, 1H), 10,25 (s, 1H).

7-kloori-1,4-dihydro-6-etyyli-5-nitrokinoksaliini-2,3-dioni. 7-kloori-3,4-dihydro-6-etyylikinoksaliini-2(1H)-onin (0,020 g, 0,095 mmol) sekoitettuun suspensioon TFA:ssa (0,4 ml) lisättiin ylimäärä savuavaa HNO_3:a (0,04 ml) ja tuloksena saatua punaista liuosta sekoitettiin yön yli huoneenlämpötilassa. Tuloksena saatu suspensio laimennettiin vedellä (4 ml) ja saostunut kiintoaine suodatettiin, pestiin vedellä (2 ml) ja kuivattiin tyhjössä, jolloin saatiin 0,024 g (94 %) puhdasta (HPLC) otsikon yhdistettä vaalean

keltaisena jauheena; ^{1}H-NMR (DMSO-d_6) δ 1,09 (t, 3H, J = 7,2 Hz), 2,52 (q, 2H, J = 7,2 Hz), 7,27 (s, 1H), 11,99 (s, 1H), 12,15 (s, 1H).

Esimerkki 47

5-amino-7-kloori-1,4-dihydro-6-metyylikinoksaliini-2,3-dionin valmistus

7-kloori-1,4-dihydro-6-metyyli-5-nitrokinoksaliini-2,3-dioni. Esimerkin 8 mukaan valmistetun 7-kloori-3,4-dihydro-6-metyyli-kinoksaliini-2(1H)-onin (0,100 g, 0,51 mmol) sekoitettuun suspensioon TFA:ssa (3,0 ml) lisätiin ylimäärä savuavaa HNO_3:a (0,30 ml) ja tuloksena saatua punaista liuosta sekoitettiin yön yli huoneenlämpötilassa. Liuotin poistettiin tyhjössä ja jäännös laimennettiin vedellä (4,0 ml). Saostunut kiintoaine suodatettiin ja kuivattiin tyhjössä, jolloin saatiin 0,067 g (52 %) puhdasta (HPLC) otsikon yhdistettä vaalean keltaisena jauheena; s.p. - tummenee 340 °C:ssa; ^{1}H-NMR (DMSO-d_6) δ2,184 (s, 3H), 7,263 (s, 1H), 11,948 (s, 1H), 12,144 (s, 1H); $C_9H_6ClN_3O_4 \cdot H_2O$:n analyysi, laskettu: C 40,85; H 2,28; N 15,87, havaittu: C 40,63; H 2,05; N 15,75.

5-amino-7-kloori-1,4-dihydro-6-metyylikinoksaliini-2,3-dioni. 7-kloori-1,4-dihydro-6-metyyli-5-nitrokinoksaliini-2,3-dionin (0,050 g, 0,20 mmol) ja tina(II)kloridididihydraatin (0,133 g, 0,60 mmol) suspensiota etanolissa (1,0 ml) refluksoitiin 6 tunnin ajan. Sitten suspensio jäähdytettiin huoneenlämpötilaan ja kiintoaine kerättiin tyhjösuodatuksella, pestiin etanolilla (1 ml) ja kuivattiin vielä tyhjössä, jolloin saatiin 0,036 g (82 %) puhdasta (HPLC) otsikon yhdistettä taitetun valkoisena kiintoaineena; s.p. - tummenee 323 °C:ssa; ^{1}H-NMR (DMSO-d_6) δ 2,09 (s, 3H), 5,47 (s, 2H), 6,46 (s, 1H), 11,15 (s, 1H), 11,72 (s, 1H).

Esimerkki 48

7-kloori-1,4-dihydro-6-etyylitio-5-nitrokinoksaliini-2,3-dionin valmistus

1-kloori-2,4-difluori-5-nitrobentseeni. 1-kloori-2,4-difluoribentseenin (0,829 g, 5,58 mmol) sekoitettuun liuokseen väkevässä H_2SO_4:ssa (8,0 ml) 0 °C:ssa, lisättiin KNO_3:a (0,565 g, 5,59 mmol) yhtenä eränä. Tuloksena saadun liuoksen annettiin lämmetä huoneenlämpötilaan ja sekoitettiin yön yli huoneenlämpötilassa. Sitten liuos kaadettiin jäähän (80 g) ja uutettiin etyyliasetaatilla (75 ml). Etyyliasetaatti kuivattiin vedettömän Na_2SO_4:n yllä, poistettiintyhjössä ja tuloksena saatua öljyä kuivattiin vielä tyhjössä, jolloin saatiin 1,007 g (93 %) puhdasta (^{1}H-NMR) otsikon yhdistettä vaalean punaisena öljynä; ^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ 7,17 (dd, 1H, J_1 = 9,9 Hz, J_2 = 8,4 Hz), 8,24 (t, 1H, J = 7,5 Hz).

N-(4'-kloori-5'-fluori-2'-nitrofenyyli)glysiini ja N-(2'-kloori-5'-fluori-4'-nitrofenyyli)glysiinin natriumsuola. 1-kloori-2,4-difluori-5-nitrobentseenin (1,000, 5,167 mmol) sekoitettuun liuokseen DMF:ssa (10,0 ml) lisättiin tipoittain natriumglysinaatin liuosta (0,502 g, 5,17 mmol) vedessä (2,0 ml). Liuosta sekoitettiin 70 °C:ssa 16 tunnin ajan. Tuloksena saatu suspensio jäähdytettiin huoneenlämpötilaan ja saostunut kiintoaine suodatettiin, pestiin asetonilla (10 ml) ja kuivattiin tyhjössä, jolloin saatiin 0,438 g (38 %) punaista kiintoainetta otsikon yhdisteiden seoksena suhteessa 3:1 (^{1}H-NMR); ^{1}H-NMR (DMSO-d_6) δ3,474 (d, 2H, J = 4,5 Hz), 3,523 (d, 2H, J = 3,9 Hz), 6,535 (d, 1H, J = 14,7 Hz), 6,871 (d, 1H, J = 12,3 Hz), 6,976 (s, 1H), 8,068 (d, 1H, J = 7,8 Hz), 8,168 (d, 1H, J = 7,8 Hz), 8,867 (s, 1H). Seoksen erottaminen ei ollut toteutettavissa tässä vaiheessa; siten seosta käytettiin sellaisenaan seuraavaa reaktiota varten.

7-kloori-3,4-dihydro-6-fluori-kinoksaliini-2(1H)-oni. N-(4'-kloori-5'-fluori-2'-nitrofenyyli)glysiinin natriumsuolan ja N-(2'-kloori-5'-fluori-4'-nitrofenyyli)glysiinin natrium-

suolan (0,175 g, 0,704 mmol) ja tina(II)kloridididihydraattia (0,475 g, 2,11 mmol) suspensiota etanolissa (3,5 ml) refluksoitiin 30 minuutin ajan. Sitten suspensio jäähdytettiin huoneenlämpötilaan ja liuotin poistettiin tyhjössä. Jäännös laimennettiin vedellä (10 ml) ja pH säädettiin kylläisellä $NaHCO_3$:lla (3,0 ml) pH-arvoon ~ 8. Tuloksena saatu valkoinen suspensio uutettiin etyyliasetaatilla (30 ml). Etyyliasetaatti kuivattiin vedettömän Na_2SO_{14}:n yllä ja poistettiin tyhjössä, jolloin saatiin 0,041 g (29 %) puhdasta (^{1}H-NMR) otsikon yhdistettä vaalean keltaisena jauheena; s.p. 217 - 219 °C (haj.); ^{1}H-NMR (DMSO-d_6) δ 3,75 (s, 2H), 6,37 (s, 1H), 6,59 (d, 1H, J = 10,5 Hz), 6,74 (d, 1H, J = 7,2 Hz), 10,33 (s, 1H).

7-kloori-1,4-dihydro-6-fluori-5-nitrokinoksaliini-2,3-dionia. 7-kloori-3,4-dihydro-6-fluori-kinoksaliini-2(1H)-onin (0,024 g, 0,12 mmol) sekoitettuun liuokseen TFA:ssa (0,40 ml) lisättiin savuavaa HNO_3:a (0,20 ml) ja tuloksena saatua punaista liuosta sekoitettiin yön yli huoneenlämpötilassa. Liuotin poistettiin tyhjössä ja jäännös laimennettiin vedellä (2,0 ml). Saostunut kiintoaine suodatettiin, pestiin vedellä (1,0 ml) ja kuivattiin kuivauspistoolissa (tolueenirefluksointi), jolloin saatiin 0,23 g (74 %) puhdasta (^{1}H-NMR) otsikon yhdistettä vaalean keltaisena jauheena; s.p. 308 - 310 °C; ^{1}H-NMR (DMSO-d_6) δ 7,37 (d, 1H, J = 6,9 Hz), 12,02 (br s, 1H), 12,22 (s, 1H); $C_8H_3ClFN_3O_4$:n analyysi, laskettu: C 34,61; H 10,09; N 15,1, havaittu: C 34,66; H 1,09; N 15,16 %.

7-kloori-1,4-dihydro-6-etyylitio-5-nitrokinoksaliini-2,3-dioni. 7-kloori-1,4-dihydro-6-fluori-5-nitrokinoksaliini-2,3-dionin (0,100 g, 0,385 mmol) ja etaanitiolin natriumsuolan (0,130 g, 1,55 mmol) liuosta DMSO:ssa (1,0 ml) sekoitettiin huoneenlämpötilassa 24 tunnin ajan. Tuloksena saatu liuos laimennettiin vedellä (5 ml9 ja tehtiin happamaksi väkevällä HCl:lla (4 - 5 tippaa) pH-arvoon ~ 5. Saostunut kiintoaine kerättiin suodattamalla tyhjössä, pestiin vedellä (10 ml) ja kuivattiin tyhjössä, jolloin saatiin 0,098 g (84 %) puhdasta

(HPLC) otsikon yhdistettä keltaisena jauheena; s.p. - tummentuu 323 °C:ssa; ^{1}H-NMR (DMSO-d_6) δ 1,04 (t, 3H, J = 7,2 Hz), 2,82 (q, 2H, J = 7,5 Hz), 7,34 (s, 1H), 12,20 (s, 1H), 12,25 (s, 1H).

Esimerkki 49

7-kloori-6-metyyli-5-nitrokinoksaliini-2(1H),3(4H)-dionin valmistus

2-kloori-5-fluori-4-nitrotolueeni. 2-kloori-45-fluoritolueenin (10,356 g, 71,628 mmol, Lancaster, käytettiin sellaisenaan) sekoitettuun liuokseen väkevässä H_2SO_4:ssa (70 ml) 0 °C:ssa, lisättiin KNO_3:a (7,252 g, 71,72 mmol) neljänä yhtä suurena eränä. Tuloksena saadun vaaleankeltaisen liuoksen annettiin lämmetä huoneenlämpötilaan ja sekoitettiin yön yli. Sitten se kaadettiin jääveteen (350 g) ja uutettiin eetterillä (3 x 100 ml). Eetteri kuivattiin vedettömän Na_2SO_4:n yllä, poistettiin tyhjössä, ja tuloksena saatu öljy kuivattiin vielä tyhjössä, jolloin saatiin 12,277 g (90 %) otsikon yhdistettä öljynä, jota käytettiin sellaisenaan seuraavaan reaktioon; ^{1}H-NMR ($CDCl_3$); δ 2,459 (s, 2H), 7,193 (d, 1H, J_1 = 11,1 Hz), 8,083 (d, 1H, J_1 = 6,6 Hz).

N-4(4'-kloori-5'-metyyli-2'-nitrofenyyli)glysiinin kaliumsuola. 2-kloori-5-fluori-4-nitrotolueenin (11,200 g, 59,078 mmol), glysiinin (4,500 g, 59,94 mmol) ja K_2CO_3:n (8,300 g, 60,05 mmol) suspensiota etanolissa (55 ml) ja vedessä (30 ml) refluksoitiin 7 tuntia. Tuloksena saatu kirkkaan oranssi kiintoaine jäähdytettiin huoneenlämpötilaan. Kiintoaine kerättiin tyhjösuodatuksella, pestiin vedellä (50 ml) ja kuivattiin tyhjössä. Sitten se pantiin asetaattiin (150 ml), refluksoitiin 1 tunti ja jäähdytettiin huoneenlämpötilaan. Oranssi kiintoaine tyhjösuodatettiin ja kuivattiin tyhjössä, jolloin saatiin 11,37 g (72 %) puhdasta (^{1}H-NMR) otsikon yhdistettä punaisena jauheena; ^{1}H-NMR (DMSO-d_6): δ 2,276 (s, 3H), 3,341 (d, 2H, J = 4,2 Hz), 6,848 (s, 1H), 7,963 (s, 1H), 8,773 (s, 1H).

7-kloori-3,4-dihydro-6-metyylikinoksaliini-2(1H)-oni. Sekoitettuun, kirkkaan oranssiin N-(4'-kloori-5'-metyyli-2'-nitrofenyyli)glysiinin kaliumsuolan (0,097 g, 0,36 mmol) liuokseen vedessä (5,0 ml) 80 °C:ssa lisättiin natriumditioniittia (0,500 g, 2,87 mmol) kahtena yhtä suurena annoksena. Muodostui välittömästi valkea suspensio, jota skeoitettiin 80 °C:ssa 1 tunti. Sitten suspensio jäähdytettiin huoneenlämpötilaan ja kiintoaine tyhjösuodatettiin, pestiin vedellä (5,0 ml) ja kuivattiin tyhjössä, jolloin saatiin 0,062 g (86 %) otsikon yhdistettä valkoisena jauheena; ^{1}H-NMR (DMSO-d_6): δ 2,10 (s, 3H), 3,66 (s, 2H, J = 1,2 Hz), 5,98 (s, 1H), 6,53 (s, 1H), 6,67 (s, 1H), 10,20 (s, 1H).

7-kloori-6-metyyli-5-nitrokinoksaliini-2(1),3(4H)-dioni. 7-kloori-3,4-dihydro-6-metyyli-kinoksaliini-2(1H)-onin (0,040 g, 0,20 mmol) sekoitettuun suspensioon TFA:ssa (0,50 ml) lisättiin savuavaa H_2SO3:a (0,040 ml) ja tuloksena saatua keltaista suspensiota sekoitettiin yön yli huoneenlämpötilassa. Suspensio kaadettiin jääveteen (3 ml) ja saostunut kiintoaine tyhjösuodatettiin, pestiin vedellä (5 ml) ja kuivattiin tyhjössä, jolloin saatiin 0,048 g (92 %) puhdasta (^{1}H-NMR) otsikon yhdistettä vaaleankeltaisena jauheena; ^{1}H-NMR (DMSO-d_6): δ 2,184 (s, 3H), 7,263 (s, 1H), 11,948 (s, 1H), 12,144 (s, 1H).

Esimerkki 50

5-nitro-6,7-dimetyylikinoksaliinidionin (NDMQX) antinosiseptisen vaikutuksen arviointi Swiss-Webster-hiirien formaliinikokeessa

Johdanto

Glutamaatin samanaikainen läsnäolo P-aineen (P substance) kanssa selkäytimen ganglioneuroneissa (Battaglia & Rustioni, *J. Comp. Neurol.* 277: 302 - 312 (1988) ja N-metyyli-D-astartaattireseptorin (NMDA) osallisuus selkätuntoaistin kipuneuronien "kiristymisilmiöön"(engl. *"wind up" phenome-*

non) (Davies & Lodge, *Brain Res. 424*:402 - 406 (1987); Dickenson & Sullivan, *Brain Res. 506*: 31 - 39 (1990); Haley, J.E., *et al., Brain Res. 518:* 218 - 226 (1990)) viittaavat siihen, että eksitoivat aminohapot osallistuvat kivun välittämiseen. On olemassa paljon osoituksia NMDA-reseptorin antagonistien kipua lievittävästä vaikutuksesta erilaisisssa eläinkipumalleissa (Cahusac, P.M. *et al. Neuropharmacol. 212:* 21-29 (1992); Murray, C.W., *et al., Pain 44:* 179 - 185 (1991); Elliot, K.J. *et al., Neursci. Abs. 17* 588 (1991); Nasstrom, J., *et al., Eur. J. Pharmacol 212: 21 - 29 (1992);* Coderre & Melzack, *J. Neurosci. 12:* 3665 - 3670 (1992); Yamamoto & Yaksh, *Anesthesiol 77:* 757 - 763 (1992); Vaccarino, A.L. *et al., Brain Res. 615:* 331 - 334 (1993); Milan & Seguin, *Eur. J. Pharmacol.238:* 445 - 447 (1993)). Aivoihin pääsyn puute ja/tai PCP:n kaltaiset sivuvaikutukset haittaavat kuitenkin joidenkin näiden yhdisteiden käyttöä.

Tiedetään hyvin, että NDMA-reseptoriin liittyvän glysiinin moduloivan paikan aktivointi on edellytys NMDA-reseptorin aktivoitumiselle (Johnson & Ascher, *Nature 325:* 529 - 531 (1987); Kleckner & DIngledine, *Science 241:* 835 - 837 (1988); Thomson, A.M. *et al., Nature 338.* 422 - 424 (1989); Mayer, M.K. *et al., Nature 38:* 425 - 427 (1989). On osoitettu, että 7-kloori-kynurenaatti (7CK), joka on NMDA-reseptoriin kytkeytyneen glysiinin moduloivan paikan antagonisti estää "kiristymisilmiön" (Dickenson & Ayder, *Neurosci. Let. 121:* 263-266 (1991)). Toinen tapa lievittää kipua olisi siten antagonisoida glysiinin moduloiva paikka NMDA-reseptorilla.

Kliinisissä tilanteissa kipu on yleensä pitkittynyttä ja siihen liittyy tulehdus. Jatkuvan kivun eläinmallien käyttäminen näyttää siten sopivammalta tavalta uusien analgeettilääkkeiden mahdollisen kliinisen käytön arvioimiseksi. Tämä tutkimus suunniteltiin NDMQX:n, uuden ja systeemiaktiivisen glysiini-/NMDA-reseptorin antagonistin, analgeettivaikutuksen arvioimiseksi Swiss-Webster-hiirien formaliinilla aikaansaadulle kivulle.

Menetelmät

Kohteet

Kaikissa kokeissa käytettiin Swiss-Webster-uroshiiriä (25 - 35 g), jotka oli saatu Simonsen Laboratories Inc.:sta (Gilroy, CA). Hiiriä pidettiin 4 - 6 kpl häkissä, jossa oli vapaa pääsy ruoalle ja vedelle, 12/12 h valoisa/pimeä-kierrolla. Hiiriä asutettiin vähintään 5 päivää ennen kokeita ja niitä käytettiin vain kerran. Kaikki kokeet tehtiin valoisan syklin aikana sokkokokeena, jossa havainnoitsijoille ei kerrottu eri käsittelyistä.

1. NDMQX:n vaikutus formaliinikokeessa

Suoritettu formaliinikoe oli Hunskaar'n *et al.* menetelmän muunnelma (Hunskaar, S. *et al., J. Neurosci. Meth. 14:* 69-76 (1985)). Heti sen jälkeen, kun hiiriä oli pidetty 60 minuuttia pleksilasipurkeissa, ne punnittiin ja niihin injektoitiin vatsaontelon sisälle (*i.p.*) NDMQX:a (1 - 20 mg/kg; N = 6 - 10 hiirtä/annos). Vertailuhiiriin injektoitiin DMSO:a (1 ml/kg, i.p.). 30 minuutin kuluttua hiiriin injektoitiin formaliinia (20 µl 5 % liuosta) oikean takakäpälän ihon alle, ne siirrettiin pleksilasiastioihin ja seurattiin injektoidun käpälän nuolemista tai puremista 1 tunnin ajan. Aikaa, jonka kukin hiiri vietti nuollen injektoitua käpäläänsä, mitattiin 0 - 5 min (aikainen vaihe) ja 15 - 50 min (myöhäinen vaihe).

Tulokset

1. NDMQX:n vaikutus formaliinikokeessa

NDMQX:n antaminen elimistöön (i.p.) lyhensi keskimääräistä nuolemisaikaa annosriippuvaisella tavalla Swiss-Webster-hiirien formaliinikokeen molemmissa vaiheissa (kuviot 1 ja 2, ja taulukko V).

Johtopäätökset

NDMQX sai aikaan merkittävän analgeettivaikutuksen Swiss-Webster-hiirissä formaliinilla aikaansaadun jatkuvan kivun molemmissa vaiheissa osoittaen, että yhdiste mahdollinen analgeetti jatkuvaan kiputilaan.

Taulukko V. NDMQX:n vaikutus nuolemiseen käytettyyn aikaan formaliinikokeessa.

Hoito	Varhaisvaihe (0,5 min) (keskiarvo ± keskivirhe) (s/5 min jakso)	Myöhäisvaihe (15 - 50 min) (keskiarvo ± keskivirhe) (s/5 min. jakso)
DMSO	8670 ± 8,65	33,00 ± 3,78
NDMQX (1,0 mg/kg)	72,57 ± 14,2	37,59 ± 5,37
NDMQX (2,5 mg/kg)	78,50 ± 10,0	26.38 ± 5,43
NDMQX (5 mg/kg)	32,83 ± 8,28	10,24 ± 2,66
NDMQX (10 mg/kg)	29,17 ± 14,9	10,19 ± 2,44
NDMQX (15 mg/kg)	6,83 ± 1,85	3,19 ± 1,37
NDMQX (20 mg/kg)	4,33 ± 2,85	0,05 ± 0,05

Esimerkki 51

5-nitro-6-metyyli-7-kloori-2,3-kinoksaliinidionin (NMCQX) ja 5-nitro-6,7-dimetyyli-2,3-kinoksaliinidioni (NDMQX) antikonvulsiivinen ja antinosiseptinen vaikutus MES- ja formaliinikokeessa.

NMCQX:n ja NDMQX:n antikonvulsiivista ja antinosiseptista vaikutusta arvioitiin Swiss-Webster-hiirien MES- ja formaliinikokeessa.

MES-kokeessa hiiriin injektoitiin vatsaontelon sisäisesti NMCQX:a (1,25 - 7,50 mg/kg) tai NDMQX:a (5,00 - 15,00 mg/kg). Vertailuhiiriin injektoitiin Tris:a (0,05 M) tai argiiniinia

(0,1 M), vastaavasti. Kohtaukset aiheutettiin antamalla suorakulmainen pulssi, 50 mA, 60 pulssia/sek, pulssin pituuden ollessa 0,8 msek ja pulssisarjan pituus 0,2 s, lääkkeen suurimman vaikutuksen aikaan. Molemmat yhdisteet suojasivat hiiriä annoksesta riippuvalla tavalla sähköshokin aiheuttamilta yleisiltä kloonis-toonisilta kohtauksilta. Koetulokset on esitetty kuvioissa 3 - 6.

Formaliinikokeessa hiiret injektoitiin *i.p.* NMCQX:lla (1,00 - 10,00 mg/kg, N = 7 - 13 hiirtä/annos) tai NDMQX:lla (0,5 - 20,000 mg/kg, N = 8 - 9 hiirtä/annos). Vertailuhiiret injektoitiin Tris:lla (0,5 M) tai Bis-Tris:lla (0,2 M), vastaavasti. Sitten hiiriin injektoitiin formaliinia. Ihonalainen formaliini-injektio sai aikaan kaksivaiheisen kipuvasteen, eli varhaista vaihetta (0 - 5 min) seurasi tooninen myöhäisvaihe (15 - 50 min). Molemmat yhdisteet saivat aikaan annoksesta riippuvan antinosiseptisen vaikutuksen formaliinikokeen molemmissa vaiheissa. Aikaa, jonka kukin hiiri vietti nuollen ja/tai purren injektoitua käpälää, mitattiin 1 h ajan.

Tulosten perusteella NMDA-reseptorilla on moduloiva vaikutus MES-aiheutetuissa kohtauksissa ja formaliinilla aikaansaadussa kipuärsykkeesssä.

Esimerkki 52

Morfiinin sietokyvyn esto 5-nitro-6,7-dimetyyli-2,3-kinoksaliinidionilla (NDMQX)

Johdanto

Opioidianalgeetteja käytetään kivun hallintaan. Opioidianalgeettien sietokyvyn kehittyminen estää kuitenkin näiden lääkkeiden käytön. Sellaisten vaihtoehtoisen lääkkeiden etsiminen, jotka lievittävät kipua ilman sietokyvyn kehittymistä, tai jotka toimivat lisähoitona estämässä sietoa häiritsemättä kivun lievitystä. Sietokyky kehittyy annettaessa morfiinia sekä akuutisti tai kroonisesti

(Kornetsky *et al.*, *Science 162:* 1011 - 1012 (1968); Way *et al.*, *J. Pharmacol. Exp. Ther. 167*: 1 - 8(1969); Huidobro *et al.*, *J. Pharmaco. Exp. Ther. 256:* 575 - 580 (1991)). Äskettäin tehtyjen tutkimusten tulosten perusteella N-metyyli-D-aspartaatti-(NMDA)-reseptorilla on moduloiva vaikutus morfiinin sietoon (Trujillo *et al.*, *Science 25:* 85 - 87 (1991); Marek *et al.*, *Brain Res. 547:*77 - 81 (1991); Tiseo *et al.*, *J. Pharmacol. Exp. Ther. 264:* 1090 - 1096 (1993); Lutfy *et al.*, *Brain Res. 616*: 83 - 88 (1993).

Glysiiniä tarvitaan NMDA-reseptorin aktivoimiseen (Johnson *et al.*, *Nature 325:* 529 - 533 (1987); Kleckner *et al.*, *Science 241:* 835 - 837 (1988); Mayer *et al.*, *Nature 338:* 425 - 427 (1989); Thomson *et al.*, *Nature 338:* 422 - 424 (1989)). Siten toinen lähestymistapa NMDA-reseptorin salpaamiseen ja sen seurauksena siedon estämiseen olisi antagonisoida NMDA-reseptorin glysiiniä moduloivan paikan. Tämä esimerkki esittää 5-nitro-6,7-dimetyyli-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dionin (NDMQX) käytön sen hypoteesin testaamiseksi, että NMDA-reseptorin/glysiinipaikan inhibointi voi olla käyttökelpoinen keino morfiinin siedon ennaltaehkäisyyn.

Materiaalit ja menetelmät

Kohteet

Kokeissa käytettiin Swiss-Webster-uroshiiriä, jotka painoivat 25 - 35 g, ja jotka saatiin Simonsen Laboratories, Inc.:sta (Gliroy, CA). Hiiriä pidettiin 4 - 6 kpl häkissä, jossa oli vapaa pääsy ruoalle ja vedelle, 12/12 h valoisa/pimeä-kierrolla. Hiiriä asutettiin vähintään 5 päivää ennen kokeita ja niitä käytettiin vain kerran. Kaikki kokeet tehtiin valoisan syklin aikana sokkokokeena, jossa havainnoitsijoille ei kerrottu eri käsittelyistä.

Formaliinikoe

Käytettiin formaliinikoetta, joka oli aiemmin selitetyn menetelmän muunnelma (Hunskaar, S. *et al.*, *J. Neurosci. Meth. 14:* 69-76 (1985)). Lyhyesti kuvattuna: hiiriä pidettiin 1 tunti

pleksilasipurkeissa niiden totuttamiseksi koeolosuhteisiin. Formaliinia (20 µl 5 % formaldehydin liuosta suolaliuoksessa) injektoitiin oikean takakäpälän selkäpuolen alle mikroruiskun (Hamilton Co., Reno, NV) 27-aukon neulalla. Hiiret siirrettiin sitten pleksilasiastioihin ja seurattiin injektoidun käpälän nuolemista tai puremista 1 tunnin ajan. Aikaa, jonka kukin hiiri vietti nuollen injektoitua käpäläänsä, mitattiin joka 5 minuutti 1 tunnin tarkkailujakson ajan.

1. NDMQX:n vaikutus morfiinin sietoon formaliinikokeessa

Hiiret injektoitiin 8 päivän ajan joko vehikkelillä (Bis-Tris; 0,2 M) tai NDMQX:lla (1, 20 ja 40 mg/kg, k.p.; N = 9 - 12 hiiriä/ryhmä). Hiiriin injektoitiin välittömästi, minuutin kuluessa, joko suolaliuoksella tai morfiinilla (20 mg/kg, ihon alle). Yhdeksäntenä päivänä hiiret punnittiin ja 1 tunnin totuttamisjakson jälkeen niihin injektoitiin morfiinia (4 mg/kg, ihon alle). Kolmenkymmenen minuutin kuluttua kaikki hiiret testattiin formaliinikokeessa (ks. edelle).

2. NDMQX:n vaikutus morfiinin kivunlievitykseen formaliinikokeessa

Hiiriä injektoitiin päivittäin 8 päivän ajan joko vehikkelillä (Bis-Tris; 0,2 M) tai NDMQX:lla (40 mg/kg, i.p.; N = 7 hiirtä/ryhmä). Yksi hiiriryhmä (N = 11) jätettiin käsittelemättä.

Yhdensäntenä päivänä hiiret punnittiin ja tunnin totuttamisjakson jälkeen ne injektoitiin morfiinilla (4 mg/kg, ihon alle). Käsittelemätön ryhmä jaettiin kahteen alaryhmään; toinen puoli sai suolaliuosta ja toinen puoli sai morfiini-injektion (4 mg/kg). Kolmenkymmenen minuutin kkuluttua kaikki hiiret testaiin formaliinikokeessa (ks. edelle).

Tulokset

1. NDMQX:n vaikutus morfiinin sietoon formaliinikokeessa

Morfiinin anto 8 päivän ajan sai aikaan sietokyvyn formaliinikokeen varhais- ja myöhäisvaiheissa (kuvio 7). Yksisuun-

tainen ANOVA ja sitä seurannut Newman-Keul-koe toi esille tilastollisesti merkittävän sietokyvyn kroonisesti morfiinilla käsitellyillä hiirillä ($F_{4,47}$ = 4,20 ja $F_{4,47}$ = 3,93 varhais- ja myöhäisvaiheille, vastaavasssa järjestyksessä; $p<0,05$ tai parempi). Sietokyky ei kehittynyt hiirillä, jotka oli käsitelty NDMQX:lla ennen morfiinia. NDMQX:n inhiboiva vaikutus morfiinin sietoon on annoksesta riippuva. NDMQX:lla ei ollut vaikutusta morfiinin sietoon annoksen ollessa 2 mg/kg; suuremmilla annoksilla se joko vähensi (20 mg/kg) tai poisti täysin (40 mg/kg) morfiinin siedon (kuvio 7).

2. NDMQX:n vaikutus morfiinin kivunlievitykseen formaliinikokeessa

Havaittiin, että NDMQX:n anto kroonisesti 8 päivän ajan ei muuttanut morfiinin kipua lievittävää vaikutusta formaliinikokeessa (kuvio 8). Morfiinilla aikaansaadussa kipulievityksessä ei ollut merkittävää eroa NDMQX-esikäsitellyillä ja vertailuryhmillä (vehikkeli-esikäsitellyt ryhmät) ($p>0,5$). lisäksi morfiinin aikaansaaman kipulievityksen taso näillä kahdella ryhmällä ei merkittävästi poikennut käsittelemättömistä (naiveista) hiiristä.

Johtopäätös

NDMQX, joka on uusi NMDA-reseptori/glysiinipaikka-antagonisti, esti morfiinin siedon formaliinikokeen molemmissa vaiheissa. NDMQX:n siedonesto ei johtunut morfiinin aikaansaaman kipulievityksen tehostamisesta formaliinikokeessa. Nämä tulokset viittaavat siihen, että NMDA-reseptori on osallinen jatkuvan kivun eläinmallissa morfiinin siedon modulointiin. NMDQX:n aikaansaama morfiinin siedon esto viittaa siihen, että NMDA-reseptoriin liittyvä glysiinin moduloiva paikka on käyttökelpoinen keino NMDA-reseptorin inhiboimiseksi ja morfiinin siedon estämiseksi. Sen vuoksi antagonismi NMDA-reseptoriin liittyvässä glysiiniä

moduloivassa paikassa näyttää olevan mahdollinen paikka sellaisten uusien lääkkeiden kehittämiseksi, joita voitaisiin käyttää lisähoitona morfiinin kanssa kivun hallinnassa ja sietokyvyn estossa.

Esimerkki 53

NDMQX:n neuroprotektiivinen vaikutus pysyvän paikallisen serebraaliiskeemian rottamallissa käytettäessä jatkuvaa suonensisäistä lääkeinfuusiota

N-metyyli-D-aspartaatti-alatyypin eksitatiiviset aminohappo-reseptorit näyttävät olevan merkittävässä asemassa paikallisen serebraali-iskeemian aikaansaamassa neuronaalidegeneraatiossa. Lukuisien kilpailevien ja ei-kilpailevien NMDA-reseptoriantagonistien on osoitettu tuovan merkittävän suojan neuronaalidegeneraatiota vastaan erilaisissa paikallisen iskeemian eläinmalleissa (katso Bullock *et al.*, *J. Neurotrauma 9* (Supp. 2): S443 - S462 (1992)). Tässä esimerkissä on selitetty NMDA-reseptorin glysiinipaikan antagonistin, NDMQX:n neuroprotektiivinen vaikutus rottamallin paikallisessa iskeemiassa.

Menetelmät

1. Paikallisen iskeemian aiheuttaminen

Sprague-Dawley-urosrottia (290 - 320 g) inkuboitiin ja pidettiin anestesiassa ± 2 % halotaanilla. Ruumiin lämpötilaa pidettiin leikkauksen aikana 37,5 °C:ssa lämmitystyynyn ja säätöyksikköön liitetyn peräsuolimittapään avulla. Yhteiset kaulavaltimot (CCA, engl. *common carotid arteries*) eristettiin ja kunkin CCA:n ympärille pantiin löysä silkkisidonta. Vasemman silmäkuopan ja korvakäytävän väliin tehtiin pystysuora ihoviilto, poistettiin poskiluun taaempi osa ja porattiin dorsorostraalisti pieni (2,0/2,5 mm) soikea aukko huuhtoen koko ajan suolaliuoksella. *Dura* avattiin mikrokirurgisella koukulla ja aivot vedettiin ulos ohuella spaatelilla, jotta paljastettaisiin sisäisen kaulavaltimon ja

keskimmäisen aivovaltimon haarautuma. Samanpuoleinen CCA sidottiin ja keskimmäinen kaulavaltimo hyytyi alkuperäisestään hajuelimistöön (engl. *olfactory tract*). Kaksi tuntia keskimmäisen kaulavaltimon sulkemisen jälkeen vastapuolisen CCA:n puristin poistettiin.

2. Lääkkeen anto

NDMQX liuostettiin 0,1 M L-argiiniiniin ja 5 % glukoosiin ja annettiin infuusio hitaasti, 10 mg/kg, suonensisäisenä annoksena (välittömästi keskimmäisen kaulavaltimon sulkemisen jälkeen), jonka jälkeen infuusiota jatkettiin 7 mg/kg/h 22 tunnin ajan.

3. Histologia

Aivot leikattiin 2 mm paloihin ja värjättiin tetrazolium punaisella (2,3,5-trifenyylitetrazoliumkloridi). Aivon vaurioituneet alueet tutkittiin kuva-analysaattorilla (Image-1, Universal Imaging Corporation, PA), jotta määritettäisiin kuori- ja kuorenalaisen (*cortical and subcortical*) infarktin tilavuus integroimalla alueet ja etäisyys kunkin tason välillä.

Tulokset

NDMQX sai aikaan merkittävän vähennyksen (71 %, $F_{1,19}$ = 11,57, $p<0,05$, ANOVA) kuori-infarktin tilavuudessa. Katso kuvio 9.

Johtopäätös

NDMQX sai aikaan merkittävän neuroprotektion paikallisen iskeemian rottamallissa.

Esimerkki 54

NMCQX:n neuroprotektiivinen vaikutus pysyvän paikallisen serebraaliiskeemian rottamallissa käytettäessä jatkuvaa suonensisäistä lääkeinfuusiota

Esimerkki 52 toistettiin sillä poikkeuksella, että NMCQX:lla korvattiin siinä käytetty NDMQX. Lääkkeen antoa varten NMCQX

liuotettiin 0,05 Tris:iin ja 5 % glukoosiin. Se annettiin infuusiona hitaasti, 2 mg/kg, suonensisäisenä annoksena (välittömästi keskimmäisen kaulavaltimon sulkemisen jälkeen), jonka jälkeen infuusiota jatkettiin 1,4 mg/kg/h 22 tunnin ajan.

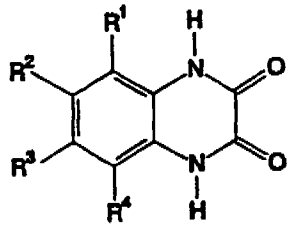
NMCQX sai aikaan merkittävän vähentymisen (75 %, $F_{1,18}$ = 5,24, $p<0,05$, ANOVA) kuoren infarktitilavuudessa. Katso kuvio 10.

Siten NMCQX sai aikaan myös merkittävän neuroprotektion paikallisen iskeemian rottamallissa.

Kun keksintö on nyt selitetty täydellisesti, on ammattimiehille ilmeistä, että sama voidaan tehdä laajalla ja vastaavalla olosuhteiden, koostumusten ja muiden parametrien vaihteluilla vaikuttamatta keksinnön suoja-alaan tai sen suoritusmuotoihn. Kaikki patentit ja julkaisut, joihin on tässä yhteydessä viitattu, liitetään kokonaisuuksina viitejulkaisuiksi.

Patenttivaatimukset

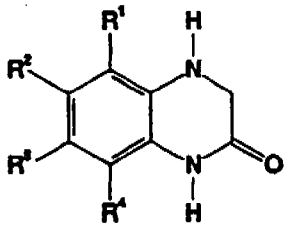
1. Menetelmä kaavan



mukaisen 1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dionin tai sen tautomeerin valmistamiseksi,
jossa kaavassa

R^1 on nitro;
R^2 on halogeenialkyyli, halogeeni, syano, alkyyli tai alkoksi;
R^3 on halogeenialkyyli, halogeeni, syano, alkyyli tai alkoksi; ja
R^4 on vety;

t u n n e t t u siitä, että saatetaan yhdiste, jonka kaava on:



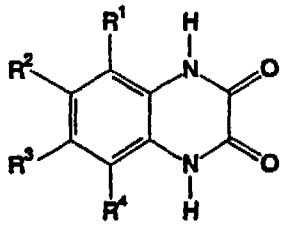
tai sen tautomeeri,
jossa kaavassa

R^1 on vety;
R^2 on halogeenialkyyli, halogeeni, syano, alkyyli tai alkoksi;
R^3 on halogeenialkyyli, halogeeni, syano, alkyyli tai alkoksi; ja
R^4 on vety;

reagoimaan savuavan typpihapon kanssa ja siten erotetaan val-

mistettu 1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni.

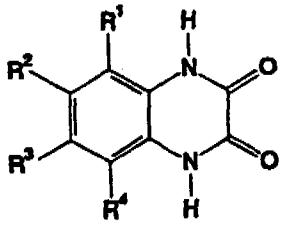
2. Menetelmä sellaisen yhdisteen valmistamiseksi, jonka kaava on:



tai sen tautomeerin valmistamiseksi,
jossa kaavassa

R^1 on nitro, syano, CF_3, karboksi tai alkanoyyli;
R^2 on alkoksi, aralkoksi, hydroksi, merkaptoalkyyli, atsido tai NR^5R^6, jossa R^5 ja R^6 ovat toisistaan riippumatta vety, alkyyli tai aryyliryhmiä;
R^3 on halogeeni, halogeenialkyyli, nitro, alkyyli, alkoksi, atsido tai syano; ja
R^4 on vety;

t u n n e t t u siitä, että saatetaan yhdiste, jonka kaava on:



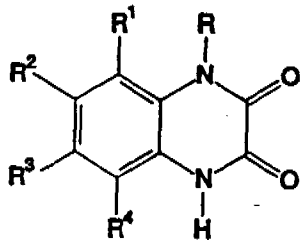
tai sen tautomeeri,
jossa kaavassa

R^1 on nitro, syano, CF_3, karboksi tai alkanoyyli;
R^2 on fluori;
R^3 on halogeeni, halogeenialkyyli, nitro, alkyyli, alkoksi, atsido tai syano; ja
R^4 on vety;

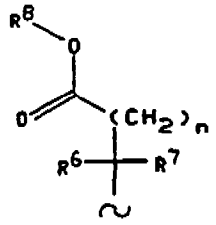
reagoimaan erikseen alkoksidin, aryylialkoksidin, hydroksidin,

alkyylimerkaptidin, atsidin tai HNR^5R^6:n kanssa inertissä liuottimessa ja siten erotetaan valmistettu yhdiste.

3. Patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukainen menetelmä, **t u n n e t t u** siitä, että valmistetaan yhdiste, jonka kaava on:



tai sen tautomeeri tai farmaseuttisesti hyväksyttävä suola;
jossa kaavassa
R on vety, hydroksi, amino, $-CH_2CONHAr$, $-NHCONHAr$, $-NHCOCH_2Ar$, $-COCH_2AR$, jossa Ar on aryyliryhmä tai radikaali, jolla on kaava:

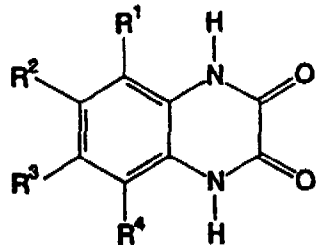


jossa R^6 on vety, alempi alkyyli, jossa on 1 - 6 hiiliatomia, tai aryyli, R^7 on vety tai alempi alkyyli, jossa on 1 - 6 hiiliatomia, n on kokonaisluku 0 - 5 ja R^8 on vety, C_{1-6}-alkyyli tai aralkyyli;
R^1, R^2, R^3 ja R^4 ovat toisistaan riippumattomasti vety, hydroksi, asyylioksi, aralkoksi, amino, alkanoyyliamino, halo, haloalkyyli, nitro, alkyyli, alkoksi, karboksi, alkanoyyli, tioalkyyli, alkoksialkyyli, aryylioksialkyyli, aryylialkyyli, alkenyyli, alkynyyli, aryylialkenyyli, aryylialkynyyli, syano, syanometyyli, disyanometyyli, syanoamino, disyanoamino tai atsido,
tai jossa R^1, R^2, R^3 ja R^4 muodostavat fuusioituneen 5- tai 6-jäsenisen karbosyklisen, heterosyklisen, aromaattisen tai

teroaromaattisen renkaan.

4. Patenttivaatimuksen 3 mukainen menetelmä, **t u n n e t t u** siitä, että valmistetaan 6,7-dimetyyli-5-nitro-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni, 7-fluori-6-metyyli-5-nitro-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni, 7-kloori-6-metyyli-5-nitro-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni, 7-bromi-6-metyyli-5-nitro-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni, 6-kloori-7-metyyli-5-nitro-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni, 6,7-dietyyli-5-nitro-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni, 5-syano-6,7-dikloori-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni tai 5-atsido-6,7-dikloori-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni.

5. Patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukainen menetelmä, **t u n n e t t u** siitä, että valmistetaan yhdiste, jonka kaava on:



tai sen tautomeeri tai farmaseuttisesti hyväksyttävä suola; jossa kaavassa

R^1 on nitro, syano, CF_3, karboksi tai alkanoyyli;

R^2 on alkoksi, aralkoksi, tioalkyyli, hydroksi, merkaptoalkyyli, atsido tai NR^5R^6, jossa R^5 ja R^6 ovat toisistaan riippumatta vety, alkyyli tai aryyliryhmiä;

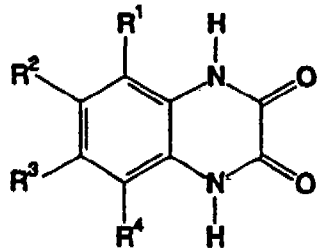
R^3 on halogeeni, halogeenialkyyli, nitro, alkyyli, alkoksi, atsido tai syano; ja

R^4 on vety.

6. Patenttivaatimuksen 5 mukainen menetelmä, **t u n n e t t u** siitä, että valmistetaan 6-atsido-7-fluori-5-nitro-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni, 7-fluori-6-metoksi-5-nitro-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni, 7-kloori-6-metoksi-5-nitro-

kinoksaliini-2,3-dioni, 7-kloori-6-etyylitio-5-nitro-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni tai 7-fluori-6-etoksi-5-nitro-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni.

7. Patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukainen menetelmä, **t u n n e t t u** siitä, että valmistetaan yhdiste, jonka kaava on:



tai sen tautomeeri tai farmaseuttisesti hyväksyttävä suola; jossa kaavassa

R^1 on nitro, fluori tai kloori;

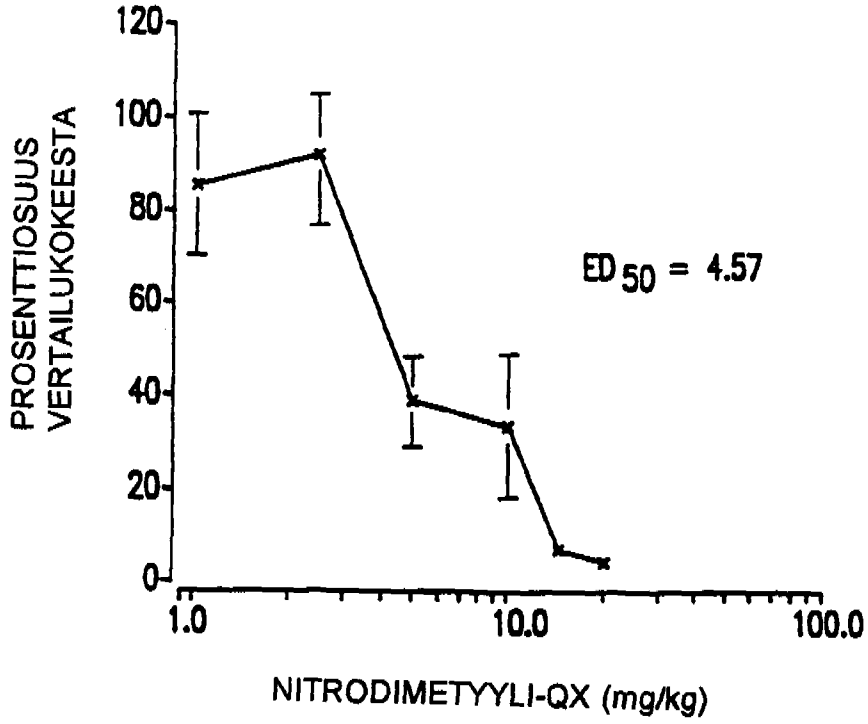
R^2 on fluori, kloori, alkyyli, atsido tai syano;

R^3 on fluori tai kloori; ja

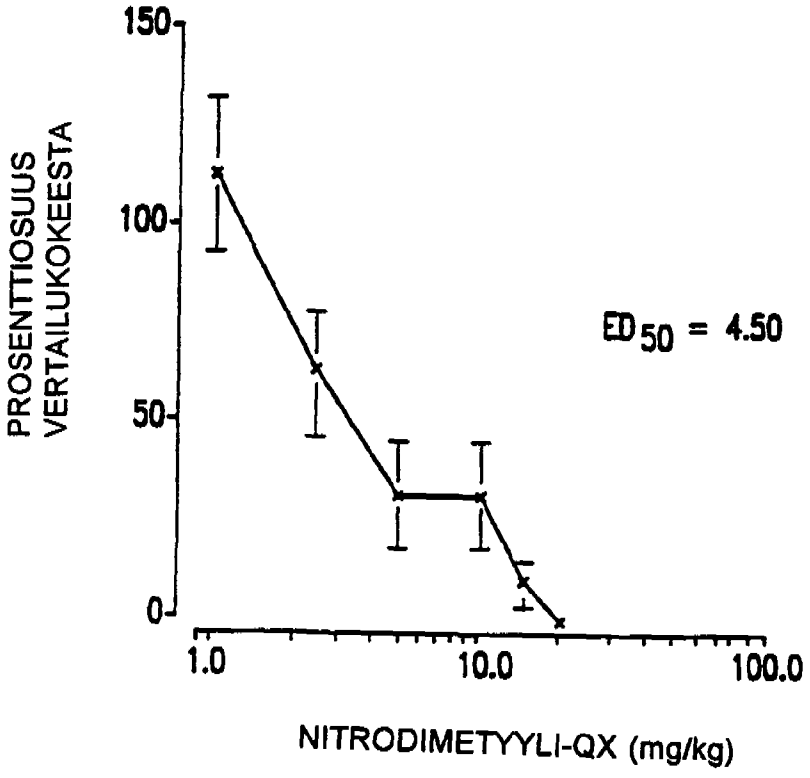
R^4 on vety;

sillä edellytyksellä, että vähintään yksi R^1-R^4-ryhmistä on fluori ja että R^2 ja R^4 eivät ole fluori silloin, kun R^1 on nitro.

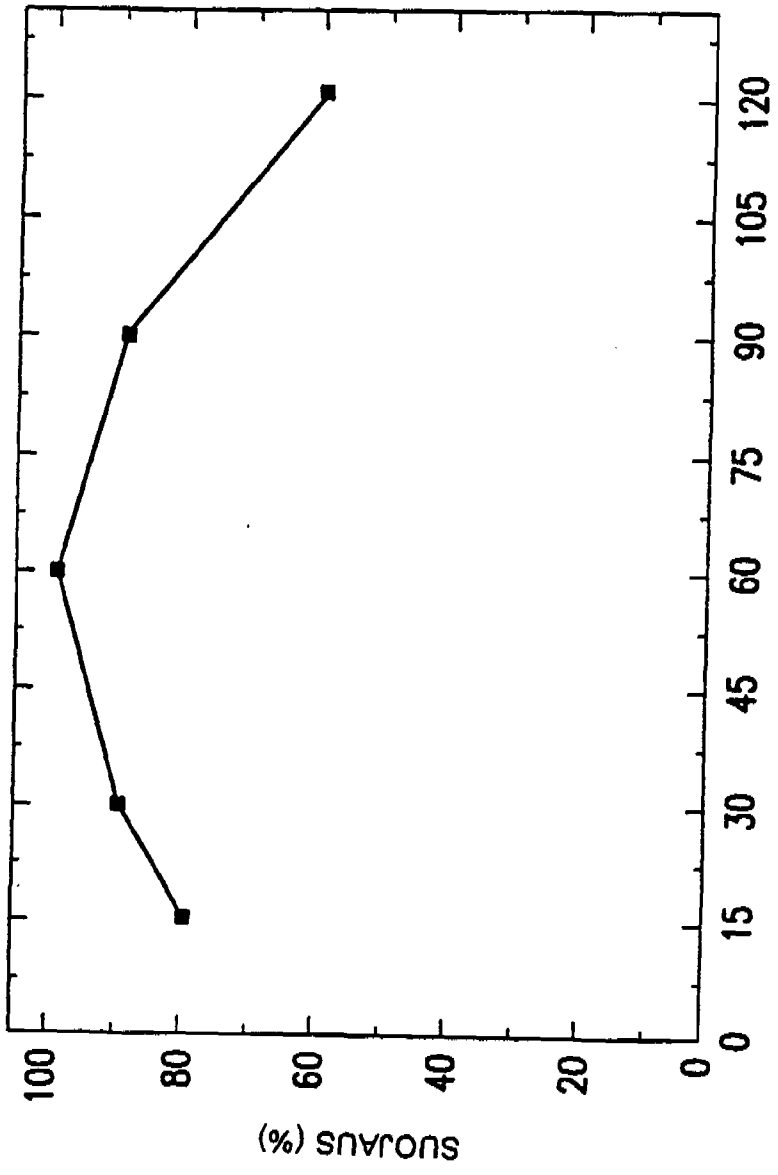
8. Patenttivaatimuksen 7 mukainen menetelmä, **t u n n e t t u** siitä, että se valmistetaan 5,6,7-trifluori-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni, 6-kloori-7-fluori-5-nitro-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni, 7-fluori-6-bromi-5-nitro-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni, 7-fluori-6-metyyli-5-nitro-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni, 6-kloori-5,7-difluori-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni, 5-kloori-6,7-difluori-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni, 5-kloori-6,7,8-trifluori-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni tai 6-kloori-7-fluori-5-trifluorimetyyli-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni.



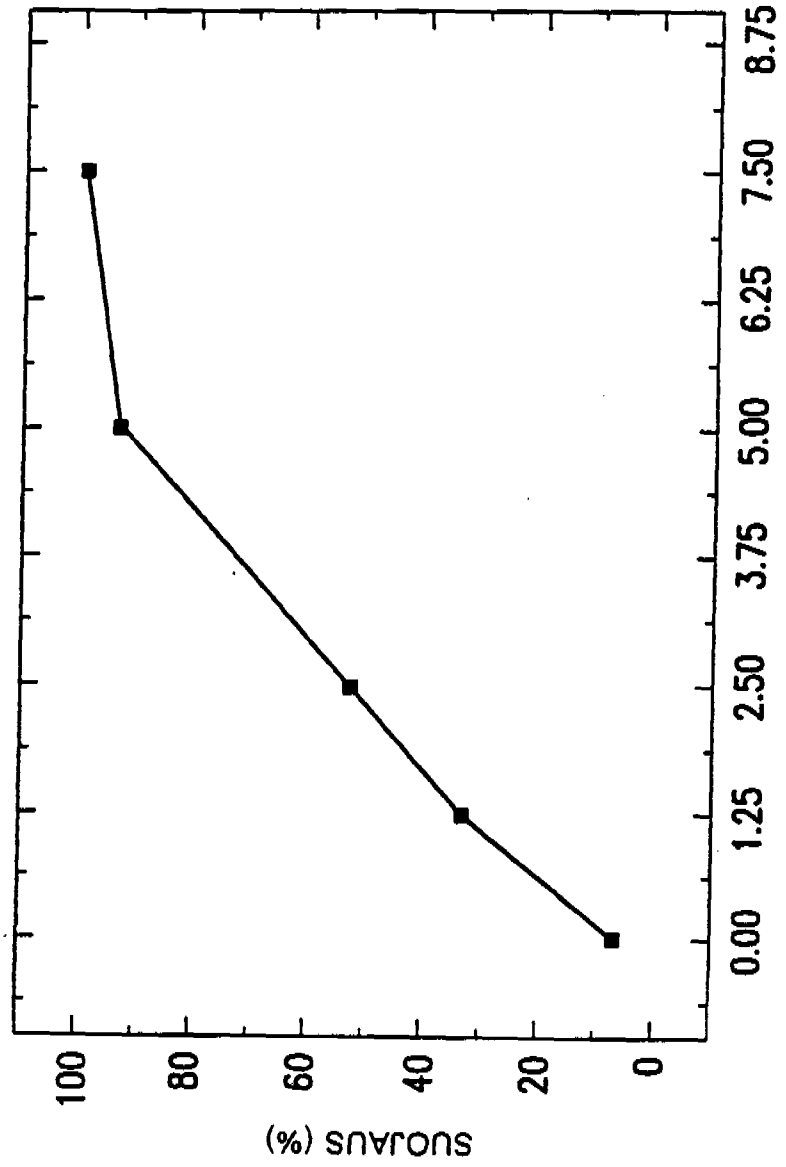
KUVIO 1



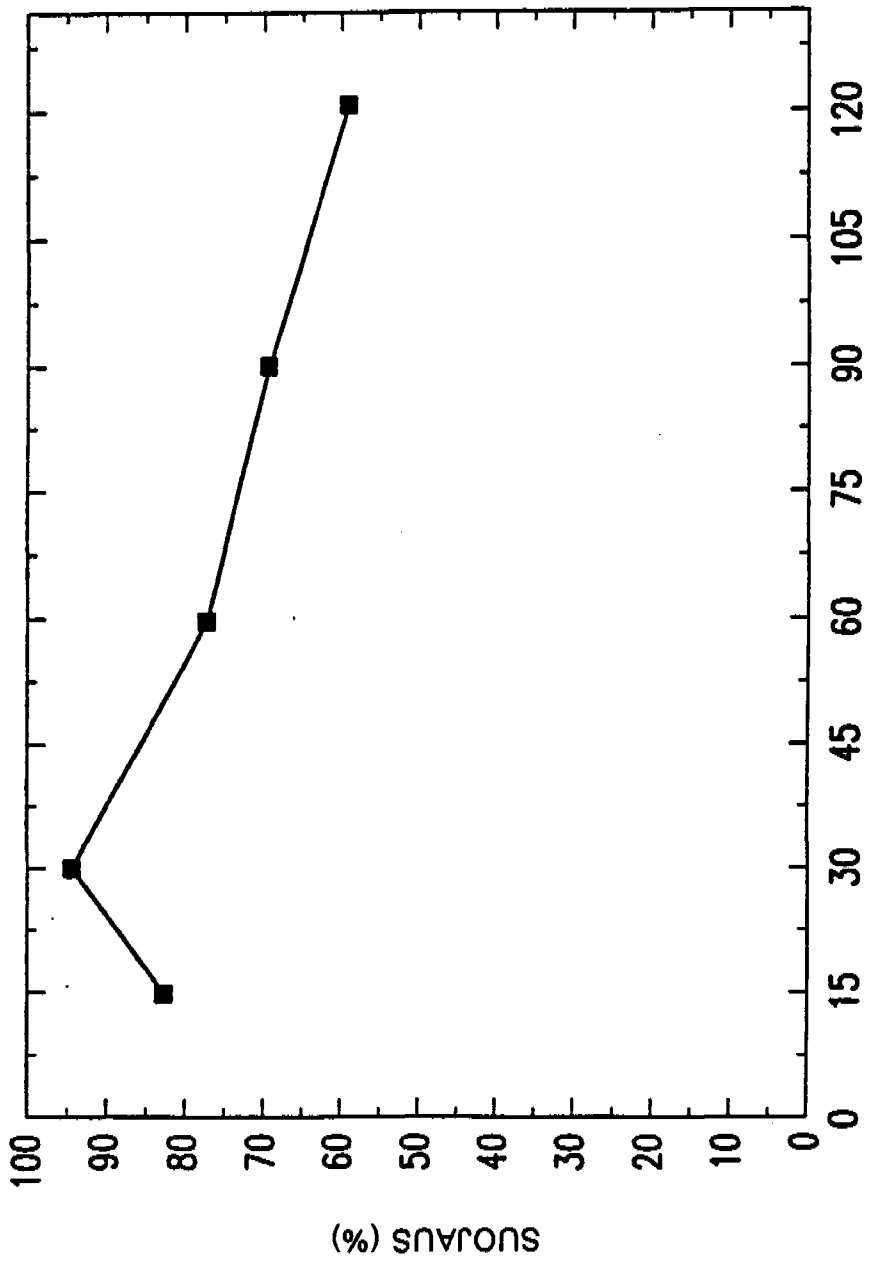
KUVIO 2


SUORAUS (%)
100
80
60
40
20
0
0
15
30
45
60
75
90
105
120
i.p.-INJEKTION JÄLKEEN KULUNUT AIKA (min)

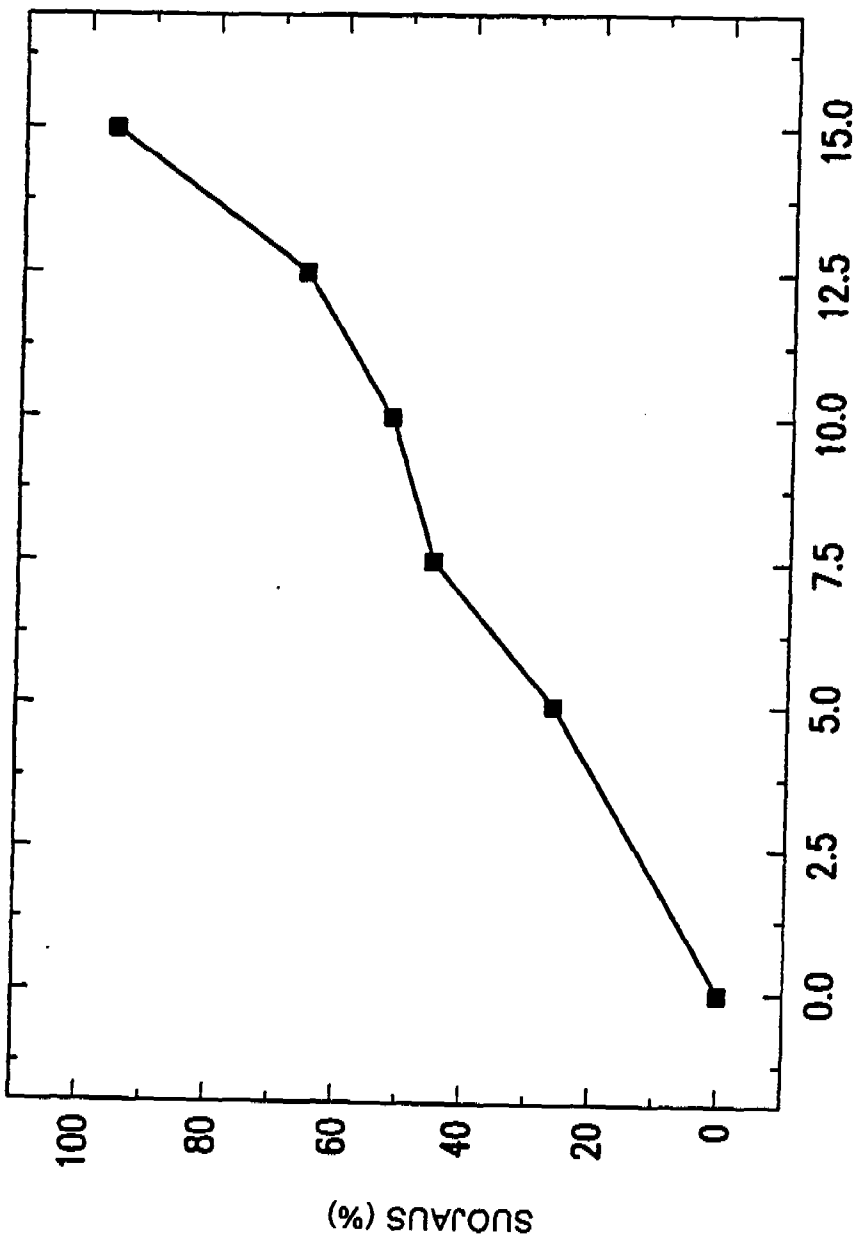
KUVIO 3


SUORAUS (%)
100
80
60
40
20
0
0.00
1.25
2.50
3.75
5.00
6.25
7.50
8.75
ANNOS (mg/kg)

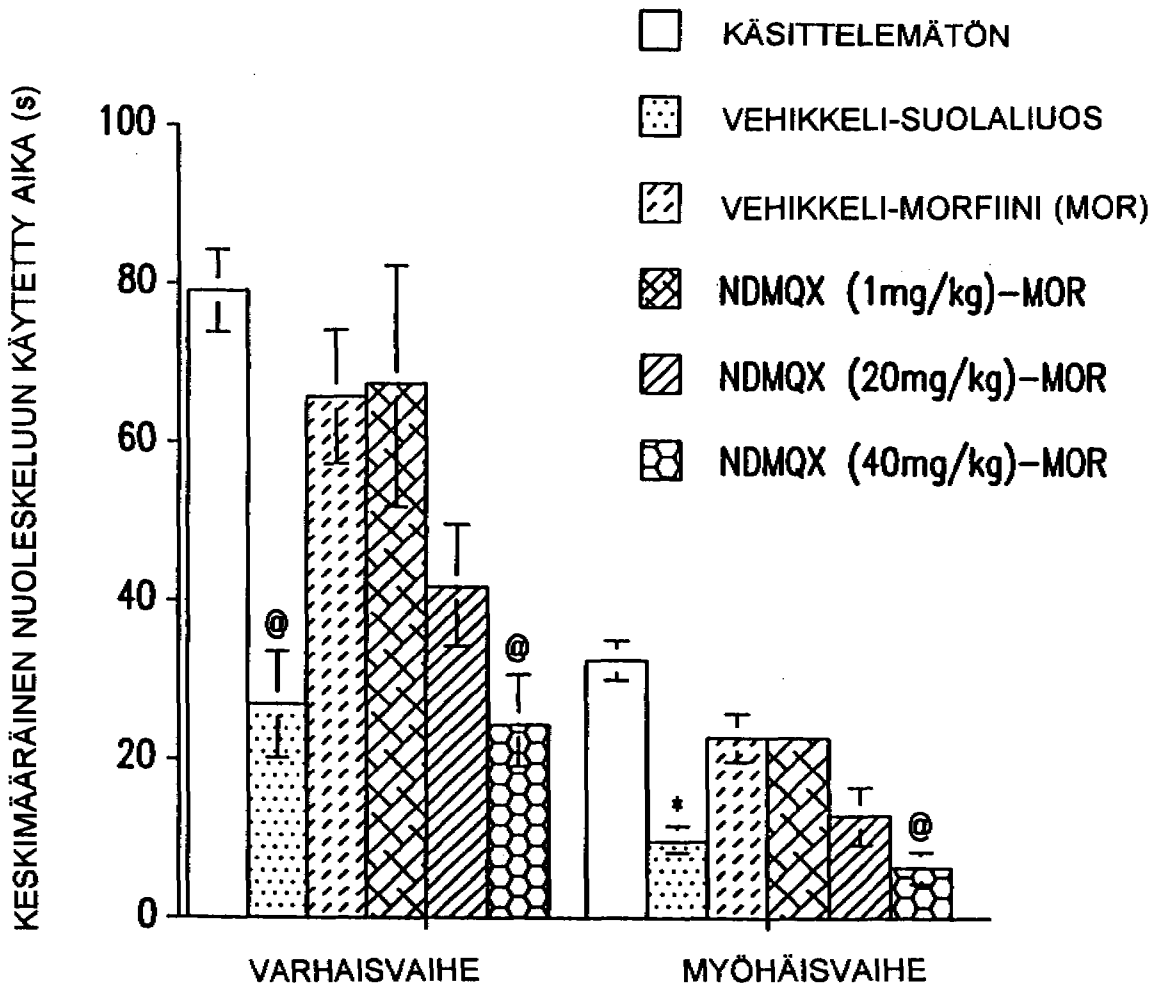
KUVIO 4


SUOJAUS (%)
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0
15
30
45
60
75
90
105
120
i.p.-INJEKTION JÄLKEEN KULUNUT AIKA (min)

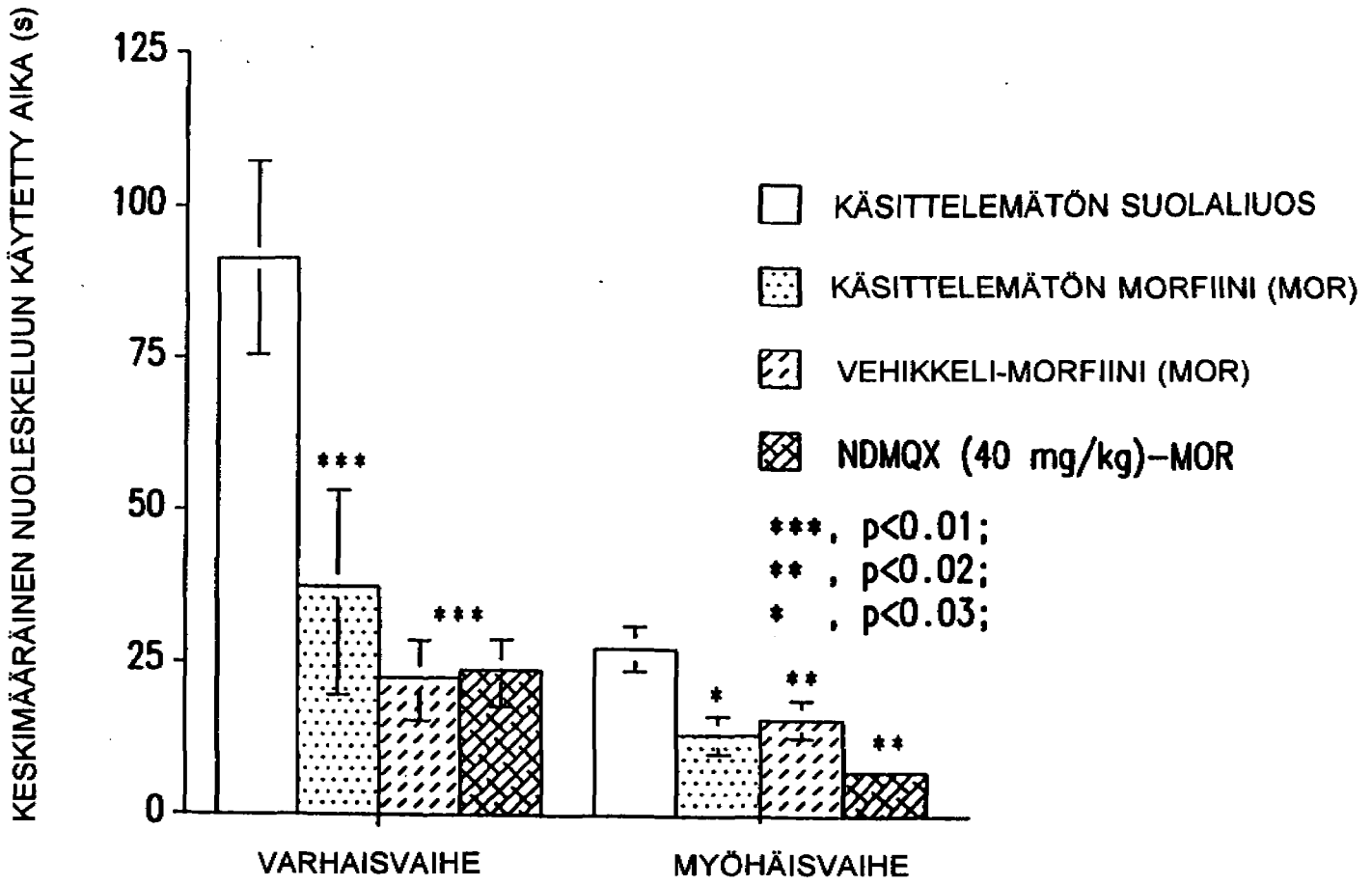
KUVIO 5



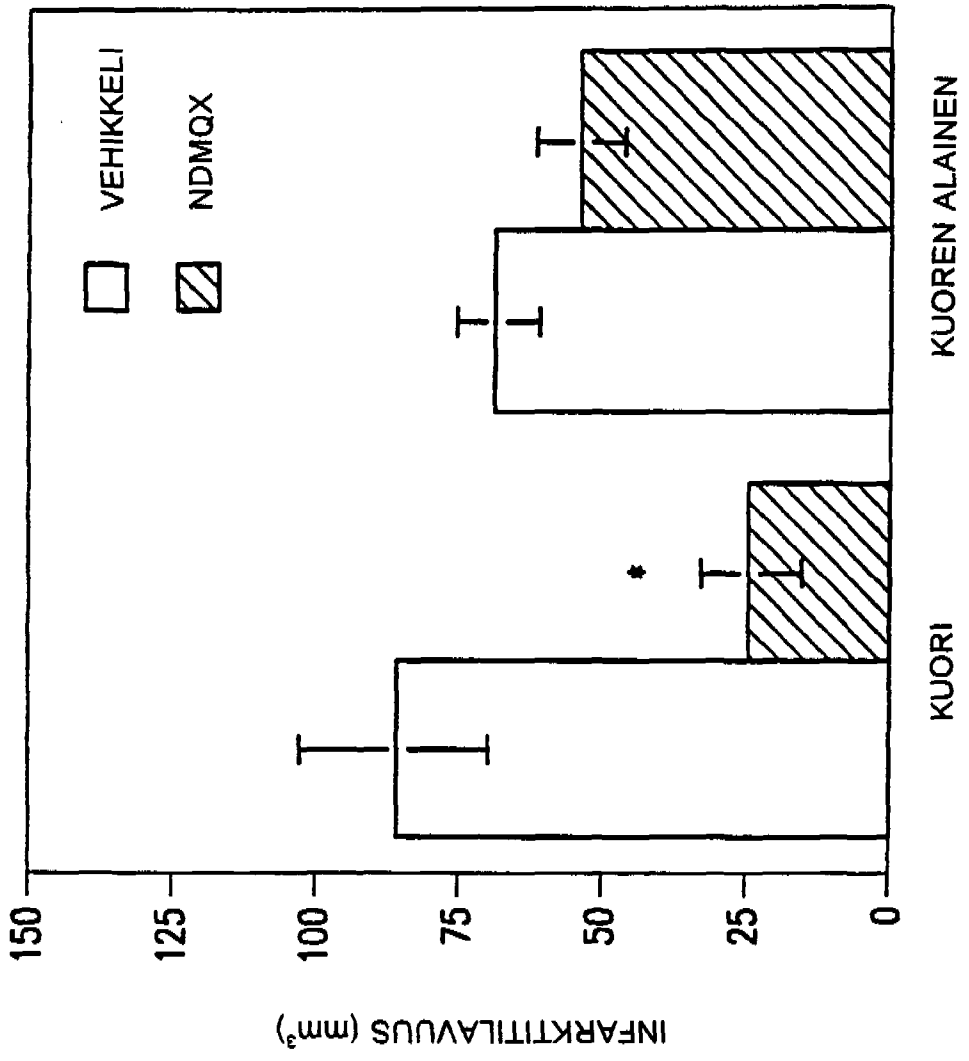
KUVIO 6


KÄSITTELEMÄTÖN
VEHIKKELI-SUOLALIUOS
VEHIKKELI-MORFIINI (MOR)
NDMQX (1mg/kg)–MOR
NDMQX (20mg/kg)–MOR
NDMQX (40mg/kg)–MOR
KESKIMÄÄRÄINEN NUOLESKELUUN KÄYTETTY AIKA (s)
100
80
60
40
20
0
@
*
VARHAISVAIHE
MYÖHÄISVAIHE

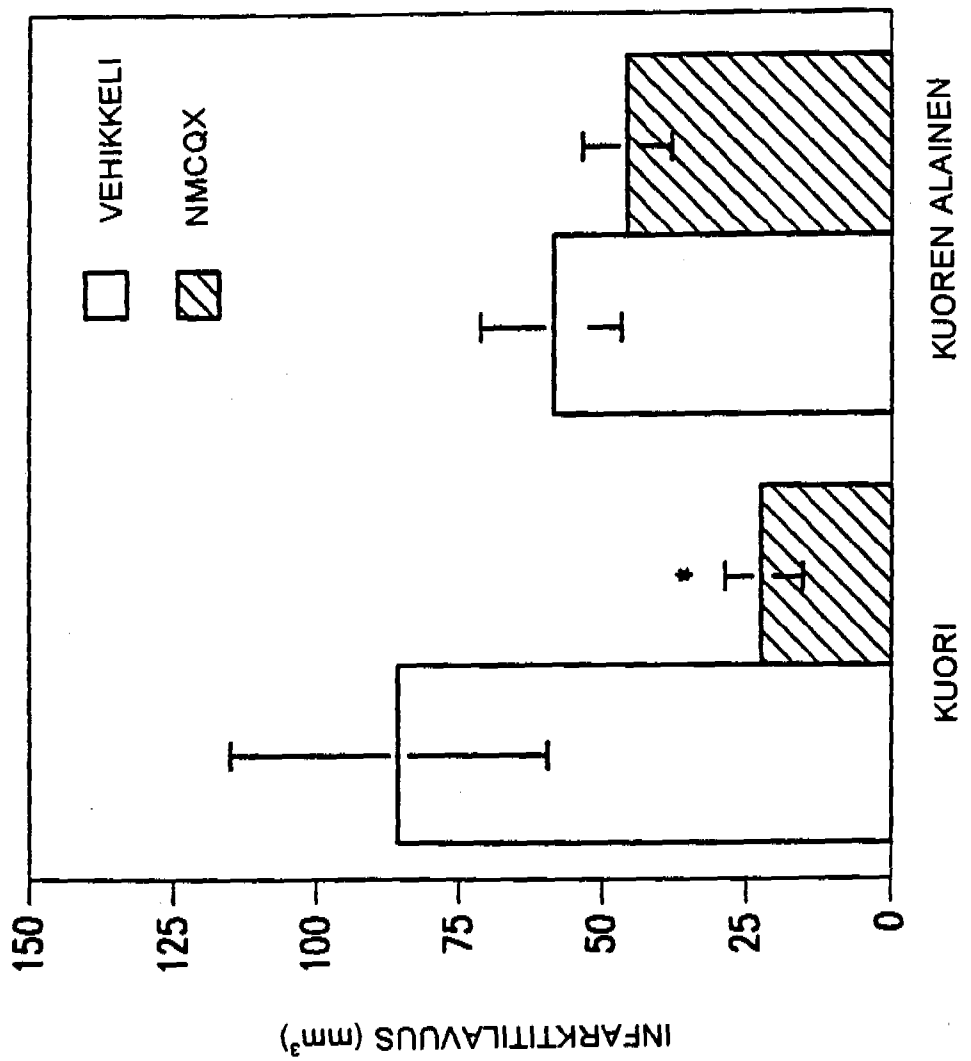
KUVIO 7


KESKIMÄÄRÄINEN NUOLESKELUUN KÄYTETTY AIKA (s)
125
100
75
50
25
0
***
***
*
**
**
VARHAISVAIHE
MYÖHÄISVAIHE
KÄSITTELEMÄTÖN SUOLALIUOS
KÄSITTELEMÄTÖN MORFIINI (MOR)
VEHIKKELI-MORFIINI (MOR)
NDMQX (40 mg/kg)-MOR
***, p<0.01;
** , p<0.02;
* , p<0.03;

KUVIO 8


INFARKTTILAVUUS (mm³)
150
125
100
75
50
25
0
VEHIKKELI
NDMQX
*
KUORI
KUOREN ALAINEN

KUVIO 9


INFARKTTILAVUUS (mm³)
150
125
100
75
50
25
0
VEHIKKELI
NMCQX
*
KUORI
KUOREN ALAINEN

KUVIO 10