FI000120094B

(12) PATENTTIJULKAISU
PATENTSKRIFT

(10) FI 120094 B

(45) Patentti myönnetty - Patent beviljats 30.06.2009

(51) Kv.lk. - Int.kl.

C07D 241/44 (2006.01)

(21) Patenttihakemus - Patentansökning 946005

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag 21.12.1994

(24) Alkupäivä - Löpdag 17.06.1993

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig 21.02.1995

(86) Kv. hakemus - Int. ansökan PCT/US1993/005859

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

22.06.1992 US 903080 P 22.12.1992 US 995167 P
28.05.1993 US 069274 P

SUOMI – FINLAND
(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS
PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN

(73) Haltija - Innehavare

1 • **The Regents of The University of California,** 300 Lakeside Drive, 22nd Floor, Oakland, CA 94612-3550, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)
2 • **State of Oregon Acting by and through The Oregon State Board of Higher Education, Acting for and on Behalf of The Oregon Health Sciences University and The University of Oregon, Eugene, Oregon,** University of Oregon, Riverfront Research Park, EUGENE, OR 97403-1238, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(72) Keksijä - Uppfinnare

1 • **Weber, Eckard,** 1290 Morningside Drive, Laguna Beach, CA 92651, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)
2 • **Keana, John F.W.,** 3854 Onyx Street, Eugene, OR 97405, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(74) Asiamies - Ombud

Kolster Oy Ab, Iso Roobertinkatu 23, 00120 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning

Menetelmä terapeuttisesti käyttökelpoisten 1, 4- dihydrokinoksaliini-2,3-dionijohdannaisten valmistamiseksi

Förfarande för framställning av terapeutiskt användbara 1, 4-dihydrokinoxalin -2,3-dionderivat

(56) Viitejulkaisut - Anförda publikationer

EP 377112 A, US 4975430 A, J. Med. Chem., vol. 34 (1991), p. 1243-1252.

(57) Tiivistelmä - Sammandrag

Menetelmiä, joilla hoidetaan tai ehkäistään halvaukseen, iskemiaan, keskushermoston traumaan, hypoglykemiaan ja leikkauksiin liittyvää neuronien menetystä, yhtä hyvin kuin hoidetaan neurodegeneratiivisia tauteja, mukaan luettuina Alzheimerin tauti, amyotrofinen lateraaliskleroosi, Huntingtonin tauti ja Downin syndrooma, hoidetaan tai ehkäistään eksitoivien aminohappojen yliaktiivisuuden haitallisia seurauksia, kuin myös hoidetaan ahdistuneisuutta, kroonista kipua, kouristuksia, saadaan aikaan anestesia ja hoidetaan psykoosia, esitetään antamalla tällaisen hoidon tarpeessa olevalle eläimelle yhdistettä, jolla on korkea affiniteetti glysiininsitoutumiskohtaan, jolta puuttuvat PCP:n sivuvaikutukset, ja joka kulkeutuu eläimen veriaivoesteen läpi. Myös uusia 1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dionej a ja niiden farmaseuttisia koostumuksia esitetään. Myös l,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dionien erittäin liukoisia ammoniumsuoloja esitetään.

Uppfinningen avser förfaranden för behandling eller förebyggande av neuronal förlust förenad med slag, ischemi, CNS-trauma, hypoglykemi och kirurgi, ävensom behandling av neurodegenerativa sjukdomar inklusive Alzheimers sjukdom, amyotrofisk lateralskleros, Huntingtons sjukdom och Downs syndrom, behandling eller förebyggande av de motsatta konsekvenserna av hyperaktiviteten av de retande aminosyrorna, ävensom behandling av ångest, kronisk värk, konvulsioner, inducering av anestesi och behandling av psykos genom administrering åt ett djur i behov av sådan behandling, av en förening, vilken har hög affinitet för glycinbindningsstallet, saknar PCP-bieffekter och vilken går igenom blodhjärnbarriären hos djuret. Uppfinningen avser även nya 1,4-dihydrokinoxalin-2,3-dioner och farmaceutiska kompositioner därav. Ytterligare avser uppfinningen höglösliga ammoniumsalter av 1,4-dihydroki-noxalin-2,3-dioner.

Menetelmä terapeuttisesti käyttökelpoisten 1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dionijohdannaisten valmistamiseksi

Keksinnön ala

Tämä keksintö kuuluu lääketieteellisen kemian alaan. Tämä keksintö koskee menetelmää yhdisteiden valmistamiseksi, joilla on korkea affiniteetti glysiininsitoutumiskohtaan, joilta puuttuvat PCP:n sivuvaikutukset ja joita kulkeutuu suuria määriä veriaivoesteen läpi. Erityisesti tämä keksintö koskee menetelmää uusien 1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dionien valmistamiseksi, jotka ovat käyttökelpoisia iskemiaan liittyvän neuronien degeneraation, patofysiologisten tilojen, jotka liittyvät neuronien degeneraatioon, kouristusten, ahdistuneisuuden, kroonisen kivun hoitamisessa tai estämisessä ja anestesian aikaansaamisessa. Keksintö koskee myös tiettyjä 1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dionien erittäin liukoisia ammoniumsuoloja.

Keksinnön tausta

Glutamiinihappoa pidetään tärkeimpänä eksitoivana neurotransmitterina aivoissa. Keskushermostossa on kolmea pääalatyyppiä glutamiinihapporeseptoreita. Näihin viitataan yleisesti kainaatti-, AMPA- ja N-metyyli-D-asparagiinihappo (NMDA) -reseptoreina (Watkins ja Olverman, *Trends in Neurosci.* 7:265-272 (1987)). NMDA-reseptoreita esiintyy käytännöllisesti katsoen aivojen jokaisen neuronin membraaneissa. NMDA-reseptorit ovat ligandin ohjaamia katio-

nikanavia, jotka sallivat Na^+:n, K^+:n ja Ca^{++}:n tunkeutua sisään, kun ne on aktivoinut glutamiinihappo tai asparagiinihappo (ei-selektiivisiä, endogeenisiä agonisteja) tai NMDA (selektiivinen, synteettinen agonisti) (Wong ja Kemp, *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 31:401-425 (1991)).

Glutamiinihappo yksinään ei kykene aktivoimaan NMDA-reseptoria. Tullakseen glutamiinihapon aktivoimaksi, NMDA-reseptorikanavan täytyy ensin sitoa glysiini spesifiseen, korkea-affiniteettiseen glysiininsitoutumiskohtaan, joka on erillinen glutamiinihapon/NMDA:n sitoutumiskohdasta reseptoriproteiinissa (Johnson ja Ascher, *Nature* 325:329-331 (1987)). Glysiini on siksi pakollinen koagonisti NMDA-reseptori/kanavakompleksissa (Kemp, J. A. ym., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:6547-6550 (1988)).

Glutamiinihappo/NMDA- ja glysiininsitoutumiskohtien lisäksi NMDA-reseptorissa on joukko muita funktionaalisesti tärkeitä sitoutumiskohtia. Näihin sisältyvät sitoutumiskohdat Mg^{++}:lle, Zn^{++}:lle, polyamiineille, arakidonihapolle ja fensyklidiinille (PCP) (Reynolds ja Miller, *Adv. in Pharmacol.* 21:101-126 (1990), Miller, B. ym., *Nature* 355:722-725 (1992)). PCP:n sitoutumiskohta, johon nykyisin yleensä viitataan PCP-reseptorina, sijaitsee NMDA-reseptori/kanavakompleksin ionoforin huokosen sisällä (Wong, E. H. F. ym., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:7104-7108 (1986), Huettner ja Bean, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:1307-1311 (1988), MacDonald, J.F. ym., *Neurophysiol.* 58:251-266 (1987)). Jotta PCP pääsisi PCP-reseptorille, kanavan täytyy ensin avautua glutamiinihapon ja glysiinin vaikutuksesta. Glutamiinihapon ja glysiinin puuttuessa PCP ei voi sitoutua PCP-reseptoriin, vaikkakin muutamat tutkimukset ovat viitanneet siihen, että pieni määrä PCP:n sitoutumista voi esiintyä jopa glutamiinihapon ja glysiinin puuttuessa (Sircar ja Zukin, *Brain Res.* 556:280-284 (1991)). Kun PCP sitoutuu PCP-reseptoriin, se estää ionivirran avoimen kanavan läpi. Siksi PCP on avoimen kanavan estäjä

ja nonkompetitiivinen glutamiinihapon antagonisti NMDA-reseptori/kanavakompleksissa.

Eräs voimakkaimpia selektiivisimpiä lääkeaineita, joka sitoutuu PCP-reseptoriin, on kouristuksenestäjälääkeaine MK801. Tällä lääkeaineella on K_d-arvo noin 3 nM PCP-reseptorilla (Wong, E.H.F. ym., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:7104-7108 (1986)).

Sekä PCP:llä että MK801:llä kuin myös muilla PCP-reseptorin ligandeilla (esim. dekstrometorfaani, ketamiini ja N,N'-disubstituoidut guanidiinit) on neuroprotektiivista tehoa sekä *in vitro* että *in vivo* (Gill, R. ym., *J. Neurosci.* 7:3343-3349 (1987), Keana, J. F. W. ym., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:5631-5635 (1989), Steinberg, G. K. ym., *Neuroscience Lett.* 89:193-197 (1988), Church, J. ym., teoksessa *Sigma and Phencyclidine-Like Compounds as Molecular Probes in Biology*, Domino ja Kamenka, toim., Ann Arbor: NPP Books, s. 747-756 (1988)). Näiden lääkeaineiden hyvin karakterisoitu neuroprotektiivinen teho johtuu ennen kaikkea niiden kyvystä estää Ca^{++}:n liiallinen sisääntulo neuroneihin NMDA-reseptorikanavien kautta, jotka tulevat yliaktivoiduiksi liiallisen glutamiinihapon vapautumisen vaikutuksesta aivoiskemiatiloissa (esim. halvauksessa, sydänpysähdysiskemiassa jne.) (Collins, R.C., *Metabol. Br. Dis.* 1:231-240 (1986), Collins, R.C. ym., *Annals Int. Med.* 110:992-1000 (1989)).

Kuitenkin näiden PCP-reseptorilääkeaineiden terapeuttista potentiaalia iskemiastaselviämisaineina ("ischemia rescue agents") halvauksessa on vakavasti haitannut se, että näillä lääkeaineilla on voimakkaita PCP:n kaltaisia käyttäytymissivuvaikutuksia (psykotomimeettisiä käyttäytymisvaikutuksia), jotka vaikuttavat johtuvan näiden lääkeaineiden interaktiosta PCP-reseptorin kanssa (Tricklebank, M. D. ym., *Eur. J. Pharmacol.* 167:127-135 (1989), Koek, W. ym., *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 245:969 (1989), Willets ja Balster, *Neuropharmacology* 27:1249 (1988)).

Nämä PCP:n kaltaiset käyttäytymissivuvaikutukset vaikuttavat aiheuttaneen MK801:n vetämisen pois kliinisestä kehitystyöstä iskemiastaselviämisaineena. Lisäksi näillä PCP-reseptorin ligandeilla vaikuttaa olleen huomattava väärinkäyttöpotentiaali, kuten PCP:n itsensä väärinkäyttöalttius on osoittanut.

PCP-reseptorin ligandien PCP:n kaltaiset käyttäytymisvaikutukset voidaan osoittaa eläinmalleissa: PCP ja sen sukuiset PCP-reseptorin ligandit saavat aikaan käyttäytymiseksitaation (ylilliikkuvuuden) jyrsijöissä (Tricklebank, M. D. ym., *Eur. J. Pharmacol.* 167:127-135 (1989)) ja tyypillisen katalepsian kyyhkysissä (Koek, W. ym., *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 245:969 (1989), Willets ja Balster, *Neuropharmacology* 27:1249 (1988)); lääkeainediskriminaatioparadigmoissa on voimakas korrelaatio näiden lääkeaineiden PCP-reseptoriaffiniteetin ja niiden tehon, jolla ne aiheuttavat PCP:lle ominaisen vastekäyttäytymisen, välillä (Zukin, S. R. ym., *Brain Res.* 294:174 (1984), Brady, K. T. ym., *Science* 215:178 (1982), Tricklebank, M.D. ym., *Eur. J. Pharmacol.* 141:497 (1987)).

Lääkeaineilla, jotka toimivat kompetitiivisina antagonisteina NMDA-reseptorin glutamiinihappositoutumiskohdassa, kuten CGS 19755:llä ja LY274614:llä, on myös neuroprotektiivista tehoa, koska nämä lääkeaineet, kuten PCP-reseptorin ligandit, voivat estää liiallisen Ca^{++}:n virtauksen NMDA-reseptorien/kanavien läpi iskemiassa (Boast, C. A. ym., *Brain Res.* 442:345-348 (1988), Schoepp, D. D. ym., *J. Neural. Trans.* 85:131-143 (1991)). Kuitenkin myös kompetitiivisilla NMDA-reseptorin antagonisteilla on PCP:n kaltaisia käyttäytymissivuvaikutuksia eläinmalleissa (käyttäytymiseksitaatio, aktiivisuus PCP:n lääkeainediskriminaatiokokeissa), vaikkei yhtä voimakkaasti kuin MK801:llä ja PCP:llä (Tricklebank, M.D. ym., *Eur. J. Pharmacol.* 167:127-135 (1989)).

Vaihtoehtoinen tapa inhiboida NMDA-reseptorikanavien aktivaatiota on käyttää antagonisteja NMDA-reseptorin glysiininsitoutumiskohdassa. Koska glysiinin täytyy sitoutua glysiinikohtaan, jotta glutamiinihappo saisi aikaan kanavan avautumisen (Johnson ja Ascher, *Nature* 325:329-331 (1987), Kemp, J.A. ym., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:6547-6550 (1988)), glysiinin antagonisti voi täysin estää ionien virtauksen NMDA-reseptorikanavan läpi, jopa suuren glutamiinihappomäärän ollessa läsnä.

Äskettäiset *in vivo* -mikrodialyysitutkimukset ovat osoittaneet, että rotan fokaalisen iskemian mallissa on suuri lisäys glutamiinihapon vapautumisessa iskeemisessä aivoalueessa *ilman* merkittävää lisäystä glysiinin vaputumisessa (Globus, M. Y. T. ym., *J. Neurochem.* 57:470-478 (1991)). Niinpä teoriassa glysiinin antagonistien pitäisi olla erittäin voimakkaita neuroprotektiivisia aineita, koska ne voivat estää nonkompetitiivisesti NMDA-kanavien avautumisen glutamiinihapon vaikutuksesta ja siksi, toisin kuin kompetitiivisilla NMDA-antagonisteilla, niiden ei tarvitse voittaa suuria endogeenisen glutamiinihapon konsentraatioita, jotka vapautuvat iskeemisellä aivoalueella.

Lisäksi, koska glysiinin antagonistit eivät toimi glutamiinihapon/NMDA:n eivätkä PCP:n sitoutumiskohdassa estäessään NMDA-kanavan avautumisen, nämä lääkeaineet eivät ehkä aiheuta sitä PCP:n kaltaista käyttäytymissivuvaikutusta, joka nähdään sekä PCP-reseptorin ligandeilla että kompetitiivisilla NMDA-reseptorin antagonisteilla (Tricklebank, M. D. ym., *Eur. J. Pharmacol.* 167:127-135 (1989), Koek, W ym., *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 245:969 (1989), Willets ja Balster, *Neuropharmacology* 27:1249 (1988), Tricklebank, M. D. ym., *Eur. J. Pharmacol.* 167:127-135 (1989), Zukin, S. R. ym., *Brain Res.* 294:174 (1984), Brady, K. T. ym., *Science* 215:178 (1982), Tricklebank, M. D. ym., *Eur. J. Pharmacol.* 141:497 (1987)). Siihen, että glysiinin antagonistit voivat tosiaan olla vailla PCP:n kaltaisia

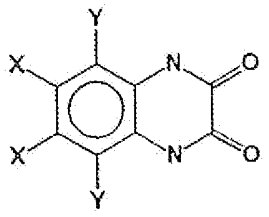
käyttäytymissivuvaikutuksia, ovat viitanneet äskettäiset tutkimukset, joissa saatavana olleita glysiinin antagonisteja injisoitiin suoraan jyrsijöiden aivoihin ilman, että aiheutui PCP:n kaltaisia käyttäytymistapoja (Tricklebank, M. D. ym., *Eur. J. Pharmacol.* 167:127-135 (1989)).

Kuitenkin on ollut kaksi pääongelmaa, jotka ovat estäneet glysiinin antagonistien kehittämisen kliinisesti käyttökelpoisiksi neuroprotektiivisiksi aineiksi:

A. Useimmat saatavana olevat glysiinin antagonistit, joilla on suhteellisen korkeat reseptoriinsitoutumisaffiniteetit *in vitro*, kuten 7-Cl-kynureenihappo (Kemp, J. A. ym., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:6547-6550 (1988)), 5,7-dikloorikynureenihappo (McNamara, D. ym., *Neuroscience Lett.* 120: 17-20 (1990)) ja indoli-2-karboksyylihappo (Gray, N.M. ym., *J. Med. Chem.* 34:1283-1292 (1991)), eivät pysty tunkeutumaan veriaivoesteen läpi, ja siksi niistä ei ole hyötyä terapeuttisina aineina;

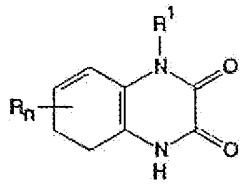
B. Ainoa saatavana oleva glysiinin antagonisti, joka tunkeutuu riittävästi veriaivoesteen läpi, lääkeaine HA-966 (Fletcher ja Lodge, *Eur. J. Pharmacol.* 151:161-162 (1988)), on osittainen agonisti, jolla on vain mikromolaarinen affiniteetti glysiininsitoutumiskohtaan. Siksi HA-966:n neuroprotektiivista tehoa *in vivo* ei ole osoitettu, eikä sitä ole osoitettu muille saatavana oleville glysiiniantagonisteille, koska niiltä puuttuu biologinen hyötyosuus *in vivo*.

Kirjallisuudessa on ollut joukko raportteja substituoiduista 1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioneista, jotka ovat hyödyllisiä hoidettaessa patofysiologisia tiloja, joita välittävät ei-NMDA-, NMDA- ja glysiinireseptorit. Esimerkiksi US-patentti nro 4 975 430 (1990) esittää 1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioniyhdisteet, joilla on kaava:



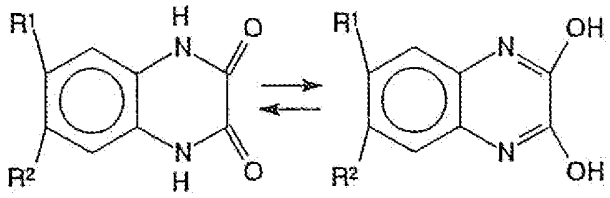
jossa kumpikin X on toisistaan riippumatta nitro tai syaani ja jossa kumpikin Y on toisistaan riippumatta H, alempi alkyyli, alempi alkoksi tai CF_3. Nämä yhdisteet ovat ilmoitetun mukaan hyödyllisiä hoidettaessa NMDA-reseptorin stimulaatioon liittyviä neuronaalisia tiloja.

US-patentti nro 3 962 440 (1976) esittää 1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioniyhdisteet, joilla on kaava:



jossa R^1 voi olla vety tai metyyli, R_n voi olla alempi alkyyli, alempi alkoksi, alempi alkyylitio, syklopropyyli, nitro, syaani, halogeeni, C_{1-2}(trifluorimetyyli)aminon tai substituoidun aminon fluorialkyyli, ja n voi olla 0, 1 tai 2. Nämä yhdisteet ovat ilmoitetun mukaan hyödyllisiä hypnootteina.

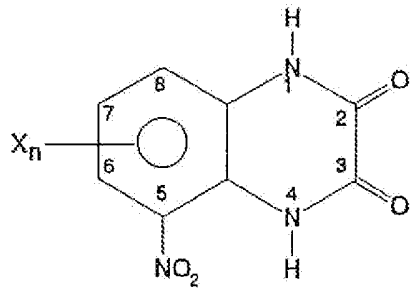
US-patentti nro 4 812 458 (1989) esittää 1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioniyhdisteet, joilla on kaava:



jossa R^1 on halogeeni, syaani, trifluorimetyyli, etynyyli tai N_3, ja R^2 on SO_2C_{1-3}-alkyyli, trifluorimetyyli, nitro, etynyyli tai syaani. Nämä yhdisteet ovat ilmoitetun mukaan

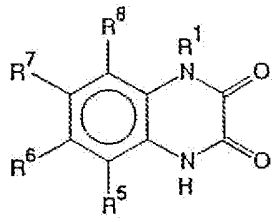
hyödyllisiä hoidettaessa eksitoivien neurotransmitterien, erityisesti kiskvalaattireseptorien, hyperaktiivisuuden aiheuttamia indikaatioita, ja neurolepteinä.

US-patentti nro 4 659 713 (1987) esittää 1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioniyhdisteet, joilla on kaava:



jossa X on vety, kloori, bromi, fluori, jodi, trikloorimetyyli, dikloorifluorimetyyli, difluorimetyyli tai trifluorimetyyli ja n on 1 tai 2. Nämä yhdisteet ovat ilmoitetun mukaan hyödyllisiä kokkidioosin torjunnassa eläimissä.

US-patentti nro 4 948 794 (1990) esittää 1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioniyhdisteet, joilla on kaava:



jossa

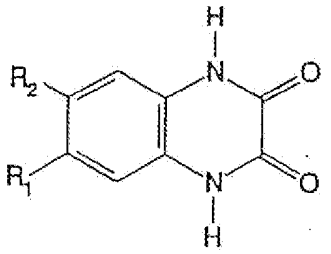
R^1 on C_{1-12}-alkyyli, joka on mahdollisesti substituoitu hydroksilla, formyylilla, karboksilla, karboksyyliestereillä, amideilla tai amiineilla, C_{3-8}-sykloalkyylillä, aryylilla, aralkyylillä, ja jossa R^6 on vety, halogeeni, CN, CF_3, NO_2, tai OR', jossa R' on C_{1-4}-alkyyli ja R^5, R^7 ja R^8 ovat vety, sillä edellytyksellä, että R^6 ei ole CF_3, OCH_3, NO_2, Cl eikä Br silloin, kun R^1 on CH_3, tai

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

R^5 ja R^6 yhdessä muodostavat vielä yhden fuusioidun aromaattisen renkaan, joka voi olla substituoitu ryhmällä halogeeni, NO_2, CN, CF_3 tai OR', jossa R'is C_{1-4}-alkyyli, tai

R^7 ja R^8 yhdessä muodostavat vielä yhden fuusioidun aromaattisen renkaan, joka voi olla substituoitu ryhmällä halogeeni, NO_2, CN, CF_3 tai OR', jossa R'is C_{1-4}-alkyyli, ja R^5 ja R^6 toisistaan riippumatta ovat vety, halogeeni, CN, CF_3, NO_2 tai OR', jossa R' on C_{1-4}-alkyyli. Nämä yhdisteet ovat ilmoitetun mukaan hyödyllisiä hoidettaessa eksitoivien neurotransmitterien, erityisesti kiskvalaattireseptorien, hyperaktiivisuuden aiheuttamia indikaatioita, ja neurolepteinä.

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



R^1	R^2	
H	H	QX
Cl	H	CQX
Cl	Cl	DCQX
NO_2	ON	CNQX
NO_2	NO_2	DNQX

Kirjoittajien mukaan rakenne-aktiivisuussuhteet kinoksaliineissa osoittavat selvästi, että molemmat bentseenirenkaassa asemissa 6 ja 7 olevat kloridiryhmät ovat olennaisen tärkeitä antagonistiteholle Gly-kohtia vastaan. Yhden kloridin poistaminen molekyylistä johtaa 10-kertaiseen affiniteetin vähenemiseen Gly-kohtien suhteen.

Kleckner ja Dingledine, *Mol. Pharm.* 36:430-436 (1989), esittävät, että 6,7-dinitro-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni ja 6-syaani-7-nitro-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni ovat voimakkaampia kainaatin kuin glysiinin antagonisteja, mutta Cl:lla substituutio asemassa 6 ja erityisesti asemissa 6 ja 7 lisää tehoa glysiinikohdassa. Lisäksi kirjoittajat esittävät, että glysiinikohdan antagonistit saattaisivat olla tehokkaita NMDA-reseptorivälitteisiä neuropatologisia tiloja vastaan.

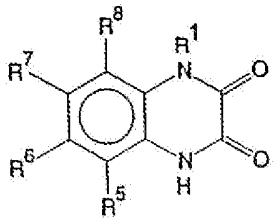
Rao, T. S ym., *Neuropharmacology* 29:1031-1035 (1990), esittävät, että 6,7-dinitro-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni ja 7-syaani-6-nitro-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni antagonisoivat NMDA:han liittyvien glysiinintunnistuskohtien välittämiä vasteita *in vivo*.

Pellegrini-Giampietro, D.E. ym., *Br. J. Pharmacol.* 98:1281-1286 (1989), esittävät, että 6-syaani-7-nitro-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni ja 6,7-dinitro-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni voivat antagonisoida vasteita L-glutamiinihapolle olemalla vuorovaikutuksessa NMDA-reseptori-ionikanavakompleksin glysiinintunnistuskohtien 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-insensitiivisille [^{3}H]-glysiininsitoutumiskohdille spesifinen, kompetitiivinen antagonisti. Kirjoittajien mukaan kinoksaliinin bentseenirenkaan asemissa 6 ja 7 olevat kaksi kloridiradikaalia ovat olennaisen tärkeitä antagonistiteholle glysiininsitoutumiskohtia vastaan.

Kessler, M. ym., *Brain Res.* 489:377-382 (1989), esittävät, että 6,7-dinitro-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni ja 6-syaani-7-nitro-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni inhiboivat [^{3}H]-glysiinin sitoutumista NMDA-reseptoreihin liittyviin strykniini-insensitiivisiin glysiininsitoutumiskohtiin.

EP-patenttihakemusjulkaisu nro 0 377 112, julkaistu 11. heinäkuuta 1990, esittää 1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioniyhdisteet, joilla on kaava:



jossa mm. R^1 voi olla hydroksi, alkoksi, aryylioksi, aralkyylioksi, sykloalkyylialkoksi, sykloalkoksi tai asyylioksi, ja R^5, R^6, R^7 ja R^8 voivat olla toisistaan riippumatta vety, nitro, halogeeni, syaani, trifluorimetyyli, $SO_2NR'R'$, SO_2R' tai OR', jossa R' on vety tai C_{1-4}-alkyyli. Nämä yhdisteet ovat ilmoitetun mukaan hyödyllisiä hoidettaessa eksitoivien neurotransmitterien, erityisesti kiskvalaattireseptorien, hyperaktiivisuuden aiheuttamia indikaatioita, ja neurolepteinä.

Lester, R. A. ym., *Mol. Pharm.* 35:565-570 (1989), esittävät, että 6-syaani-7-nitro-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni antagonisoi NMDA-reseptorivälitteisiä vasteita kompetitiivisella vuorovaikutuksella glysiininsitoutumiskohdan kanssa.

Patel, J. ym., *J. Neurochem.* 55:114-121 (1990), esittävät, että 6,7-dinitro-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dionin neuroprotektiivinen aktiivisuus johtuu glysiinin koagonistiaktiivisuuden antagonisoimisesta NMDA-reseptori-kanavakompleksilla.

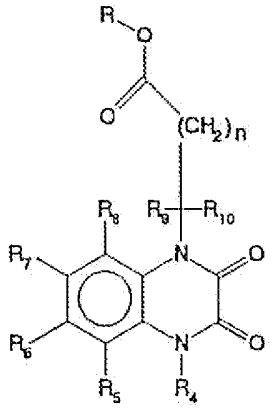
Horner, L. ym., *Chem. Abstracts* 48:2692 (1953) esittävät 6,8-dinitro-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dionin.

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

Honore, T. ym., *Science* 241:701-703 (1988), esittävät, että 6,7-dinitro-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni ja 7-syaani-6-nitro-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni ovat voimakkaita ei-NMDA-glutamiinihapporeseptorin antagonisteja.

Sheardown, M. J. ym., *Eur. J. Pharmacol.* 174:197-204 (1989), esittävät, että 5,7-dinitro-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni on strykniini-insensitiivisen glysiinireseptorin voimakas antagonisti, ja sillä on kouristuksenestäjäominaisuuksia. Kuitenkin Sheardown ym. myös esittävät, että 5,7-dinitro-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dionilla kuin myös DNQX:lla ja CNQX:lla on heikko pääsy keskushermostoon.

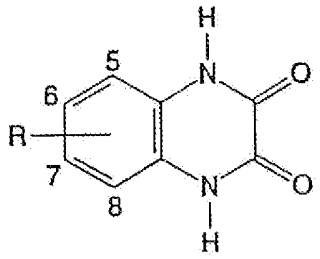
Kansainvälinen patenttihakemusjulkaisu nro WO91/13 878 esittää seuraavat N-substituoidut 1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dionit, jotka sitoutuvat glysiinireseptoriin:



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 toisistaan riippumatta ovat vety, nitro, halogeeni, alkoksi, aryylioksi, aralkoksi, C_{1-6}-alkyyli tai aryyli, R^9 on vety, alempi alkyyli tai aryyli, R^{10} on vety tai alkyyli, ja niiden farmaseuttisesti hyväksyttävät suolat.

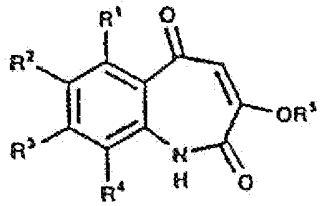
Leeson ym., *J. Med. Chem.* 34: 1243-1252 (1991), esittävät joukon epäselektiivisen eksitoivien aminohappojen antagonistin, kynureenihapon, johdannaisia. Myös jouk-

ko rakenteellisesti samansukuisia kinoksaliini-2,3-dioneja, jotka ovat myös glysiini/NMDA-antagonisteja, mutta jotka eivät ole selektiivisiä, ja ovat selvästi vähätehoisempiä kuin kynureenihappojohdannaiset, esitetään. Näillä kinoksaliini-2,3-dioneilla on rakenne:



jossa R on H, 5-Cl, 7-Cl, 5,7-Cl_2, 6,7-Cl_2, 6,7-$(CH_3)_2$, 6-NO_2 tai 6,7-$(NO_2)_2$. Myös joukko N-metyylijohdannaisia esitetään.

Swartz ym., *Mol. Pharmacol.* 41:1130-1141 (1992), esittävät, että tietyt substituoidut ja substituoimattomat bentsatsapiinit ovat glutamiinihapporeseptorikanavien kompetitiivisia antagonisteja viljellyissä kortikaalisissa neuroneissa. Ks. myös kansainvälinen patenttihakemusjulkaisu nro WO92/11 854, joka esittää, että yhdisteet, joilla on kaava



jossa R^1-R^4 voi olla vety, C_{1-3}-perfluorialkyyli, halogeeni, nitro tai syaani ja R^5 voi olla vety tai C_{1-5}-alkyyliryhmä, ovat NMDA-reseptorikompleksin glysiininsitoutumiskohdan antagonisteja.

Edelleen on olemassa tarve voimakkaille ja selektiivisille glysiini/NMDA-antagonisteille, jotka:

- ovat vailla PCP:n kaltaisia käyttäytymissivuvaikutuksia, jotka ovat yleisiä PCP:n kaltaisilla NMDA-kana-

van estäjillä, kuten MK801:llä, tai kompetitiivisillä NMDA-reseptorin antagonisteilla, kuten CGS19755:llä,

- osoittavat voimakasta anti-iskeemistä tehoa johtuen niiden NMDA-reseptorin glutamiinihappoantagonismin nonkompetitiivisesta luonteesta,

- kulkeutuvat veriaivoesteen läpi tehoon riittävinä pitoisuuksina,

- ovat hyödyllisiä uusina kouristuksenestäjinä vähemmin sivuvaikutuksin kuin PCP:n kaltaiset NMDA-kanavan estäjät tai kompetitiiviset NMDA-antagonistit,

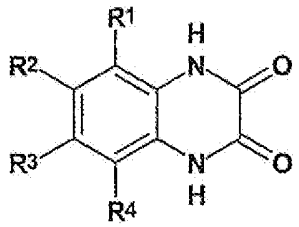
- auttavat määrittelemään NMDA-reseptorin glysiiniinsitoutumiskohdan funktionaalista merkitystä *in vivo*.

Keksinnön yhteenveto

Keksintö koskee sellaisen yhdisteiden luokan löytämistä, joilla nähdään korkea affiniteetti strykniini-insensitiiviseen glysiininsitoutumiskohtaan, joilla ei nähdä PCP:n sivuvaikutuksia ja joita kulkeutuu veriaivoesteen läpi suuria määriä. Tämä on toisin kuin kirjallisuuden raportit siitä, että muut yhdisteet, esim. erityisesti 1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dionit ja HA-966, joko eivät kulkeudu veriaivoesteen läpi tai niitä kulkeutuu vain pieniä määriä. Lisäksi monilla näistä yhdisteistä nähdään matala sitoutumisaffiniteetti muihin reseptorikohtiin.

Niinpä tämä keksintö koskee menetelmää yhdisteiden valmistamiseksi, joilla on korkea affiniteetti glysiininsitoutumiskohtaan, joilla ei nähdä PCP:n sivuvaikutuksia ja joita kulkeutuu veriaivoesteen läpi suuria määriä. Niinpä tämän keksinnön mukaisesti valmistettavat yhdisteet ovat erittäin hyödyllisiä patofysiologisten tilojen hoitamiseen ilman merkittäviä sivuvaikutuksia tai toksisuutta.

Erityisesti esillä oleva keksintö koskee menetelmää terapeuttisesti käyttökelpoisten 1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dionijohdannaisten valmistamiseksi, joilla on kaava I



jossa

R^1 on halogeeni, amino, C_{1-3}-asyyliamino tai nitro,

R^2 on amino, nitro tai halogeeni,

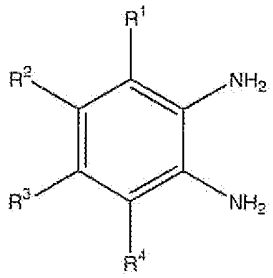
R^3 on halogeeni tai halogeenialkyyli ja

R^4 on vety,

sillä edellytyksellä, että kun R^2 on amino, R^3 ei ole halogeeni,

ja niiden tautomeerien ja farmaseuttisesti hyväksyttävien suolojen valmistamiseksi, jolloin menetelmälle on tunnusomaista, että

a) diaminobentseeni, jolla on kaava II



jossa R^1, R^2, R^3 ja R^4 merkitsevät samaa kuin edellä, saatetaan reagoimaan dietyylioksalaatin $(EtOCO)_2$ tai oksaalihapon kanssa, jolloin saadaan kaavan I mukainen yhdiste, tai vaihtoehtoisesti

niiden kaavan I mukaisten yhdisteiden valmistamiseksi, jossa kaavassa R^1 ja/tai R^2 ovat nitro, kaavan I mukainen yhdiste, jossa R^1 ja R^2 merkitsevät muuta kuin nitroa, saatetaan reagoimaan KNO_3:n kanssa, tai

niiden kaavan I mukaisten yhdisteiden valmistamiseksi, jossa kaavassa R^1 ja/tai R^2 on amino, vastaava nitroryhmä pelkistetään, ja

haluttaessa muutetaan saatu kaavan I mukainen yhdiste farmaseuttisesti hyväksyttäväksi suolaksi.

Keksinnön mukaisesti valmistettavat yhdisteet ovat käyttökelpoisia hoidettaessa tai ehkäistäessä halvaukseen, iskemiaan, keskushermoston traumaan, hypoglykemiaan ja leikkauksiin liittyvää neuronien menetystä, tai yhtä hyvin hoidettaessa neurodegeneratiivisia tauteja, mukaan luettuina Alzheimerin tauti, amyotrofinen lateraaliskleroosi, Huntingtonin tauti ja Downin syndrooma, hoidettaessa tai ehkäistäessä eksitoivien aminohappojen ylistimulaation haitallisia seurauksia, kuin myös hoidettaessa ahdistuneisuutta, kouristuksia, kroonista kipua, psykoosia, ja saataessa aikaan anestesia.

Kuvioiden kuvaus

Kuvio 1 esittää pylväskuvaajaa, josta nähdään formaliinin indusoiman kivun inhibitio hiirissä annosten 5, 10, 20, 30 ja 40 mg/kg 6,7-dikloori-5-nitro-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dionia vaikutuksesta. Hiirille ruiskutettiin intraperitoneaalisesti joko DMSO:ta (vehikkelikontrolli) tai lääkeainetta DMSO:ssa 30 minuuttia ennen 20 ml:n 5-prosenttista formaliinia ihonalaista injektiota takatassun pohjaan. Sitten hiiriä tarkkailtiin, ja se aika, jonka hiiret kuluttivat ruiskeen saanutta takatassua nuollen viiden minuutin jaksoilla ilmoitettuina aikoina, kirjattiin ylös. Ruiskeen saanutta takatassua nuollessa kulutettu aika on eläimen kokeman kivun indikaattori. Kuten kuviosta 1 nähdään, 6,7-dikloori-5-nitro-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni inhiboi formaliinin indusoimaa nuolemista annoksesta riippuvalla tavalla, mikä osoittaa voimakasta kivunestotehoa tässä kroonisen kivun eläinmallissa.

Kuviot 2A ja 2B esittävät viivakuvaajia, joista nähdään formaliinin indusoiman kivun inhibitio hiirissä annosten 1, 5, 10, 20 ja 40 mg/kg 6,7-dibromi-5-nitro-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dionia vaikutuksesta. Hiirille ruiskutettiin intraperitoneaalisesti joko DMSO:ta (vehikkelikontrolli) tai lääkeainetta DMSO:ssa 30 minuuttia ennen

20 ml:n 5-prosenttista formaliinia ihonalaista injektiota takatassun pohjaan. Sitten hiiriä tarkkailtiin, ja se aika, jonka hiiret kuluttivat ruiskeen saanutta takatassua nuollen viiden minuutin jaksoilla ilmoitettuina aikoina, kirjattiin ylös. Ruiskeen saanutta takatassua nuollessa kulutettu aika on eläimen kokeman kivun indikaattori. Kuten kuvioista 2A ja 2B nähdään, 6,7-dibromi-5-nitro-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni inhiboi formaliinin indusoimaa nuolemista annoksesta riippuvalla tavalla kivun nuolentavasteen sekä alkuvaiheessa (0 - 5 minuuttia, kuvio 2A) että myöhäisvaiheessa (15 - 50 minuuttia, kuvio 2B), mikä osoittaa voimakasta kivunestotehoa tässä kroonisen kivun eläinmallissa.

Kuvio 3 esittää kaaviota, josta nähdään 5-kloori-7-trifluorimetyyli-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dionin, sen koliinisuolan, monokaliumsuolan ja di-kaliumsuolan liukoisuudet.

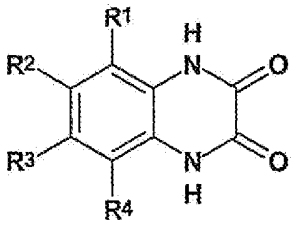
Kuviot 4A ja 4B esittävät kuvaajia, joista nähdään PCP:n, 5-kloori-7-trifluorimetyyli-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dionin ja 5-nitro-6,7-dikloori-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dionin eri annosten vaikutukset rotissa, jotka oli harjoitettu erottamaan 2 mg/kg PCP suolaliuoksesta. Kuviosta 4A nähdään PCP:n kaltaisten vaikutusten aste kuten se ilmenee PCP-vivun valinnan keskimääräisenä prosenttiosuutena. Kuviosta 4B nähdään vaikutukset kokonaisvastausnopeuksiin. Tekstien SAL, PCP ja DMSO yläpuolella olevat arvot näyttävät tulokset kontrollikokeista, jotka on tehty vastaavasti suolaliuoksella, annoksella 2 mg/kg PCP:tä ja annoksella 0,5 ml/kg DMSO:ta ennen PCP:n, 5-kloori-7-trifluorimetyyli-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dionin ja 5-nitro-6,7-dikloori-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dionin testaamista. Arvot edustavat kuuden rotan keskiarvoa.

Kuvio 5 esittää pylväskuvaajaa, josta nähdään Swiss/Webster hiirten liikeaktiivisuus 5-nitro-6,7-dikloori-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dionin DMSO:ssa tehdyn tai MK801:n suolaliuoksessa tehdyn intraperitoneaalisen injek-

tion jälkeen. Ainakin kuuden hiiren ryhmille ruiskutettiin vehikkeliä tai yhä suurempia annoksia 5-nitro-6,7-dikloori-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dionia DMSO:ssa tai MK801:tä suolaliuoksessa. Sitten liikeaktiivisuus kirjattiin ylös neljän peräkkäisen 15 minuutin jakson aikana. Liikeaktiivisuus toisella viidentoista minuutin jaksolla esitetään.

Edullisten suoritusmuotojen kuvaus

Tämä keksintö koskee menetelmää yhdisteiden valmistamiseksi, joilla on korkea affiniteetti glysiininsitoutumiskohtaa kohtaan, joilla ei ole PCP:n sivuvaikutuksia ja joita kulkeutuu veriaivoesteen läpi suuria määriä. Esimerkkeihin tällaisista yhdisteistä kuuluvat sellaiset 1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dionit, jotka ovat NMDA-reseptorin glysiininsitoutumiskohdan selektiivisiä, kompetitiivisia antagonisteja. Keksinnön mukaisesti valmistettavilla 1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioneilla on seuraava kaava I:



tai sen tautomeeri, jossa

R^1 on halogeeni, amino, C_{1-3}-asyyliamino tai nitro,

R^2 on amino, nitro tai halogeeni,

R^3 on halogeeni tai halogeenialkyyli ja

R^4 on vety,

sillä edellytyksellä, että kun R^2 on amino, R^3 ei ole halogeeni.

Edullisia kaavan I piiriin kuuluvia yhdisteitä ovat ne, joissa R^1 on halogeeni tai nitro, R^2 on nitro tai halogeeni, R^3 on halogeeni tai halogeenialkyyli ja R^4 on vety. Erityisen edullisia yhdisteitä ovat ne, joissa R^1 on amino tai nitro, R^2 on halogeeni, R^3 on halogeeni tai halogeenialkyyli ja R^4 on vety.

Tyypillisiin C_{1-6}-alkyyliryhmiin kuuluvat 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.

Tyypillisiin halogeeniryhmiin kuuluvat fluori, kloori, bromi ja jodi.

Tyypillisiin halogeenialkyyliryhmiin kuuluvat C_{1-6}-alkyyliryhmät, jotka on substituoitu yhdellä tai useammalla fluori-, kloori-, bromi- tai jodiatomilla, esim. fluorimetyyli-, difluorimetyyli-, trifluorimetyyli-, pentafluorietyyli-, 1,1-difluorietyyli- ja trikloorimetyyliryhmät.

Tyypillisiin aminoryhmiin kuuluvat $-NH_2$, NHR^9 ja $-NR^9R^{10}$, jossa R^9 ja R^{10} ovat jokin edellä mainituista C_{1-6}-alkyyliryhmistä.

Erityisen edullisiin tämän keksinnön mukaisesti valmistettaviin kinoksaliini-2,3-dioneihin kuuluvat, näihin rajoittumatta, 6,7-dikloori-5-nitro-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni, 6,7-difluori-5-nitro-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni, 6-kloori-5-nitro-7-bromi-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni, 5-kloori-6-nitro-7-trifluorimetyyli-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni, 6-kloori-5-nitro-7-trifluorimetyyli-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni, 5-kloori-6,7-difluori-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni, 5-bromi-6,7-difluori-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni, 6,7-dibromi-5-nitro-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni, 5-amino-6,7-dibromi-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni, 5-amino-6,7-dikloori-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni ja 6-amino-5-kloori-7-trifluorimetyyli-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni.

Varsinkin edullisia yhdisteitä ovat 6,7-dibromi-5-nitro-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni, 6,7-dikloori-5-nitro-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni, 7-bromi-6-kloori-5-nitro-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni, 6-kloori-5-nitro-7-trifluorimetyyli-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni ja 5-bromi-6,7-difluori-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni.

6,7-dikloori-5-nitro-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni estää iskemian aiheuttamaa hermosolujen kuolemista gerbiilin globaalin iskemian mallissa i.p. antamisen jälkeen. 6,7-dikloori-5-nitro-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni ja 6,7-dibromi-5-nitro-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni ovat voimakkaita kouristuksenestäjiä ainakin kahdessa kolmesta eläinmallista i.p. antamisen jälkeen. 6,7-dikloori-5-nitro-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dionin ja 6,7-dibromi-5-nitro-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dionin havaittiin myös osoittavan kipua poistavaa vaikutusta i.p. antamisen jälkeen kroonisen (formaliinin indusoiman) kivun eläimessä.

Tämän keksinnön mukaisesti valmistettavilla yhdisteillä nähdään alhainen ristireagoivuus kainaatti-, AMPA- ja kiskvalaattireseptorien kanssa sekä NMDA-reseptorien glutamiinihappo- ja PCP-sitoutumiskohtien kanssa, ja siksi ne poikkeavat kaikista aikaisemmin kuvatuista 1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioneista, erityisesti 6-syaani-7-nitro-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dionista ja 6,7-dinitro-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dionista, kuten ne on kuvattu US-patentissa nro 4 975 430.

Tämän keksinnön mukaisesti valmistettavat yhdisteet ovat aktiivisia neuronien menetyksen, neurodegeneratiivisten tautien ja kroonisen kivun hoitamisessa ja estämisessä, ovat aktiivisia kouristuksenestäjinä ja aiheutettaessa anestesia ilman haitallisia sivuvaikutuksia, joita aiheuttaa ei-selektiivinen sitoutuminen muihin reseptoreihin, erityisesti kainaatti-, AMPA- ja kiskvalaattireseptoreihin sekä NMDA-reseptoriin liittyviin PCP- ja glutamiinihappo-reseptoreihin. Lisäksi nämä yhdisteet ovat tehokkaita hoidettaessa tai estettäessä eksitoivien aminohappojen, esim. NMDA-reseptorisysteemissä mukana olevien, hyperaktiivisuuden haitallisia seurauksia estämällä glysiinireseptoreita ja estämällä ligandin ohjaamia kationikanavia avautumasta ja päästämästä liiallista Ca^{++}-virtausta neuroneihin, kuten iskemian aikana tapahtuu.

Neurodegeneratiivisiin tauteihin, joita voidaan hoitaa tämän keksinnön mukaisesti valmistettavilla yhdisteillä, kuuluvat Alzheimerin tauti, amyotrofinen lateraaliskleroosi, Huntingtonin tauti ja Downin syndrooma.

Tämän keksinnön mukaisesti valmistettavat yhdisteet ovat erityisen käyttökelpoisia hoidettaessa tai estettäessä toistuviin halvauksiin liittyvää neuronien menetystä, joka johtaa dementiaan. Sen jälkeen kun potilaan on diagnostisoitu kärsivän halvauksesta, näitä yhdisteitä voidaan antaa helpottamaan välitöntä iskemiaa ja estämään enempää neuronien vaurioitumista, joka voi seurata toistuvista halvauksista.

Lisäksi tämän keksinnön mukaisesti valmistettavat yhdisteet pystyvät kulkeutumaan veriaivoesteen läpi, toisin kuin 6-syaani-7-nitro-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni ja 6,7-dinitro-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni ja muut 6,7-disubstituoidut 1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dionit, jotka eivät pysty kulkeutumaan veriaivoesteen läpi i.p. antamisen jälkeen (ks. Turski, L. ym., *J. Pharm. Exp. Ther.* 260:742-747 (1992)). Ks. myös Sheardown ym., *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-syaani-7-nitro-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni pääsevät huonosti keskushermostoon.

Jotta yhdisteellä alkaisi näkyä *in vivo* -tehoa, ja siten kyky kulkeutua veriaivoesteen läpi, yhdisteellä täytyisi nähdä ED_{50}, joka on alle noin 100 mg eläimen painokiloa kohti. Edullisesti tämän keksinnön mukaisesti valmistettavilla yhdisteillä nähdään ED_{50} alle noin 20 mg/kg ja edullisemmin alle noin 10 mg/kg.

Keksinnön mukaisesti valmistettavat yhdisteet ovat erityisen käyttökelpoisia hoidettaessa tai estettäessä leikkausten haitallisia neurologisia seurauksia. Esimerkiksi sepelvaltimon ohitusleikkaus vaatii sydän-keuhkokoneiden käyttöä, joilla on taipumus tuoda verenkiertoon ilmakuplia, jotka voivat jäädä aivoihin. Tällaisten ilmakuplien läsnä-

olo vie hermokudokselta hapen, mikä johtaa anoksiaan ja iskemiaan. Tämän keksinnön mukaisesti valmistettavien 1,4-dihydrokinoksaliinien antaminen ennen leikkausta tai sen jälkeen hoitaa tai estää syntyvää iskemiaa. Edullisessa suoritusmuodossa yhdisteitä annetaan potilaille, joille suoritetaan sydämen ohitusleikkaus tai päänvaltimon endarterektomialeikkaus.

Tämän keksinnön mukaisesti valmistettavat yhdisteet ovat myös hyödyllisiä hoidettaessa tai estettäessä kroonista kipua. Tällainen krooninen kipu voi johtua leikkauksesta, vammasta, päänsärystä, artriitista tai muusta degeneratiivisesta taudista. Yhdisteet ovat erityisen käyttökelpoisia hoidettaessa haamukipua, joka aiheutuu raajan amputaatiosta. Kivun hoitamisen lisäksi keksinnön mukaisesti valmistettavat yhdisteet ovat myös hyödyllisiä anestesian, joko yleis- tai paikallisen anestesian, saamiseksi aikaan esimerkiksi leikkauksen aikana.

Yhteensä yli 30 1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dionijohdannaista on syntetisoitu ja niistä on testattu glysiiniantagonistiaktiivisuus *in vivo*. Näiden uusien lääkeaineiden joukosta on tunnistettu useita yhdisteitä, joilla on erityisen korkea affiniteetti glysiini/NMDA-reseptoreihin. Voimakkaimpien analogien rakenteen tarkastelun perusteella näyttää siltä, että NO_2-ryhmän yhdistelmä kahden halogeeniatomin, esim. kloorin tai bromin, tai Cl- ja CF_3-ryhmän kanssa 1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dionirengassysteemissä antaa erityisen voimakkaita glysiiniantagonisteja. Todellakin 6,7-dibromi-5-nitro-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni ja 6,7-dikloori-5-nitro-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni, joiden affiniteetit glysiininsitoutumiskohtaan ovat vastaavasti 6 nM ja 8 nM, ovat voimakkaimmat tähän päivään mennessä löydetyt glysiini/NMDA-antagonistit. On huomionarvoista, että NO_2-ryhmä yhdisteessä 6,7-dikloori-5-nitro-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni on lisännyt monisatakertaisesti sen kantayhdisteen, 6,7-dikloori-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dionin (DCQX), jonka

muut ovat kuvanneet voimakkaaksi ja selektiiviseksi glysiiniantagonistiksi (Yoneda ja Ogita, *Biochem. Biophy. Res. Commun.* 164:841-849 (1989), glysiinireseptoriaffiniteettia. Yllättäen on mahdollista pelkistää 6,7-dibromi-5-nitro-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dionin ja 6,7- dikloori-5-nitro-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dionin nitroryhmä aminosubstituoitujen 1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dionien saamiseksi, joilla on myös korkea sitoutumisaffiniteetti glysiininsitoutumiskohtaan.

Koska 1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dionien, erityisesti CNQX:n ja DNQX:n, tiedetään olevat voimakkaita kainaatti- ja AMPA-antagonisteja, tämän keksinnön mukaisesti valmistettavat uudet yhdisteet testattiin kainaatin ja AMPA:n sitoutumismäärityksissä, jotta määritettäisiin ristireaktiivisuus näihin ei-NMDA-reseptoreihin. Voimakkailla glysiiniantagonisteilla ei havaittu olevan merkittävää ristireaktiivisuutta kainaatti- ja AMPA-kohtiin tai vain vähäinen ristireaktiivisuus.

Keksinnön mukaisesti valmistettavilla yhdisteillä nähdään edullisesti glysiininsitoutumiskohtaan sitoutumisaffiniteetti, jossa K_i = noin 10 µM tai alle, edullisemmin 1 µM tai alle ja edullisemmin 500 nM tai alle ja edullisemmin 100 nM tai alle ja edullisimmin noin 10 nM tai alle. Edullisia ovat myös yhdisteet, joilla nähdään sitoutuminen kainaatti- ja AMPA-kohtiin, joiden K_i on ainakin 1 µM ja edullisemmin ainakin 10 µM.

Sitten uusilta glysiiniantagonisteilta testattiin *in vivo* -aktiivisuus intraperitoneaalisen injektion jälkeen käyttäen useita kouristuksenestäjätestejä hiirissä (kuuloärsykkeestä laukeavan epilepsiakohtauksen malli DBA-2-hiirissä, pentyleenitetratsolin aiheuttamat epilepsiakohtaukset hiirissä, NMDA:n aiheuttama kuolema hiirissä). Kaikilla testatuilla yhdisteillä nähtiin aktiivisuus yhdessä tai useammassa kolmesta mallista. 6,7-dikloori-5-nitro-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni (yhdiste nro 1, taulukko IV) oli voimakkain viidestä, erityisesti kuuloärsykkeestä lau-

keavan epilepsiakohtauksen mallissa (ED_{50} = 5 mg/kg) ja NMDA:n aiheuttaman kuoleman mallissa (ED_{50} = 20 mg/kg). 6,7-dibromi-5-nitro-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni (yhdiste nro 13, taulukko IV) oli myös hyvin voimakas, erityisesti kuuloärsykkeestä laukeavan epilepsiakohtauksen mallissa (ED_{50} = 10 mg/kg). Kuitenkin näillä kahdella yhdisteellä nähtiin erilaiset taipumukset aiheuttaa ataksiasivuvaikutuksia "rotorod"-juoksupyöräataksiatestillä hiirissä määritettynä. Erityisesti 6,7-dibromi-5-nitro-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dionilla nähtiin TD_{50} = 200 mg/kg tässä testissä. Siten tämä yhdiste on tehokas estämään epilepsiakohtauksia annoksilla, jotka ovat paljon alempia kuin ne, jotka aiheuttavat ataksiasivuvaikutuksia. Tätä voidaan verrata TD_{50}-arvoon 27 mg/kg "rotorod"-juoksupyöräataksiatestissä yhdisteelle 6,7-dikloori-5-nitro-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni.

Kahdelta yhdisteeltä (nro 1 (taulukko IV) ja 5-kloori-7-trifluorimetyyli-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni (yhdiste nro 2 (taulukko IV)) testattiin myös neuroprotektiivinen teho intraperitoneaalisen injektion jälkeen gerbiilin globaalin iskemian mallissa, ja niillä havaittiin olevan voimakas neuroprotektiivinen teho tässä paradigmassa. Samat yhdisteet testattiin myös lääkeainediskriminaatiokokeissa rotilla, jotka oli harjoitettu erottamaan PCP suolaliuoksesta. Kumpaakaan näistä kahdesta yhdisteestä ei rinnastettu PCP:hen millään annoksella näissä lääkeainediskriminaatiotutkimuksissa. Lisäksi mikään yhdisteistä ei tuottanut käyttäytymisen eksitaatiota liikeaktiivisuustesteissä hiirellä. Näiden tutkimusten tulokset viittaavat siihen, ettei tämän keksinnön mukaisesti valmistettavilla uusilla glysiiniantagonisteilla nähdä PCP:n kaltaisia käyttäytymissivuvaikutuksia, jotka ovat yleisiä NMDA-kanavan estäjille, kuten MK801 ja PCP, tai kompetitiivisille NMDA-antagonisteille, kuten CGS 19755.

On huomattava, että uusilla glysiiniantagonisteilla nähtiin voimakas aktiivisuus *in vivo* intraperitoneaalisen

injektion jälkeen, mikä viittaa siihen, että nämä yhdisteet kykenevät kulkeutumaan veriaivoesteen läpi. Muut tutkijat ovat raportoineet, etteivät 1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dionianalogit CNQX ja DNQX kykene kulkeutumaan veriaivoesteen läpi (Turski, L. ym., *J. Pharm. Exp. Ther.* 260:742-747 (1992)), havainto, jonka keksijät ovat varmentaneet. Ilmeisesti muutokset 1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dionien bentseenirenkaan substituenteissa eivät vain johda glysiinireseptoriaffiniteetin dramaattiseen nousuun ja AMPA/kainaattireseptoriaffiniteetin menetykseen, vaan voivat myös tuottaa yhdisteitä, joilla on varsin tyydyttävä kyky kulkeutua veriaivoesteen läpi (ks. Turski, L. ym., *J. Pharm. Exp. Ther.* 260:742-747 (1992)).

Ennen tätä keksintöä erään glysiiniantagonismille tärkeimmistä farmakoforeista uskottiin olevan amidiryhmä 1,4-dihydro-2,3-kinoksaliinidionissa, jonka tehoa lisää substituutio elektroneja vetävillä substituenteilla aromaattisessa renkaassa, mikä alentaa amidivedyn pKa-arvoa (Gray ym., *J. Med. Chem.* 34:1283 (1991), Leeson, P.D. ym., *J. Med. Chem.* 34:1243 (1991)). Vaikkakin tässä keksinnössä kuvatut tutkimukset ovat yleisesti tukeneet tätä esitystä, nyt on keksitty, että substituenttien keskinäiset asemat renkaassa sekä myös elektroneja vetävien ryhmien identiteetti ovat myös tärkeitä.

Voimakkain uusi antagonisti, joka on osa tätä keksintöä, on 6,7-dibromi-5-nitro-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni (Ki = 6 nM). Toiseksi voimakkain antagonisti on 6,7-dikloori-5-nitro-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni (Ki = 8 nM). Muihin voimakkaisiin antagonisteihin kuuluvat nitrattujen 5-kloori-7-trifluorimetyyli-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dionien seos (3x ja 3y (taulukko I, ja yhdisteet nro 3 ja 4, taulukko IV). Vielä eräs 1,4-dihydro-2,3-kinoksaliinidionisarjassa syntetisoitu voimakas antagonisti on 5-kloori-7-trifluorimetyyli-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni (3h, taulukko I ja yhdiste nro 2, taulukko IV; ei keksinnön mukainen). Elektroneja vetävän ryhmän paikka ja

tyyppi renkaassa vaikuttaa olevan tärkeä, koska substituutiot 1,4-dihydro-2,3-kinoksaliinidionirenkaan 5- ja 7-asemiin vaikuttavat lisäävän glysiininsitoutumiskohdan tehoa. Substituutio 6-asemaan ionisoituvilla ryhmillä, kuten sulfonaateilla, primaarisilla sulfonamideilla (3l-n, taulukko I; ei keksinnön mukainen) ja karboksyylihapoilla tuhoaa yhdisteiden glysiinireseptoriin sitoutumiskyvyn. Ei sulfonamidin alkylaatio (3o-p, taulukko I) eikä hapon metylaatio johda aktiivisuuden lisääntymiseen. Myös amiditypen metylaatio kinoksaliinirenkaassa tuhoaa yhdisteen sitoutumiskyvyn, mistä todistaa 6,7-dinitro-N-metyyli-1,4-dihydro-2,3-kinoksaliinidionin aktiivisuuden puute.

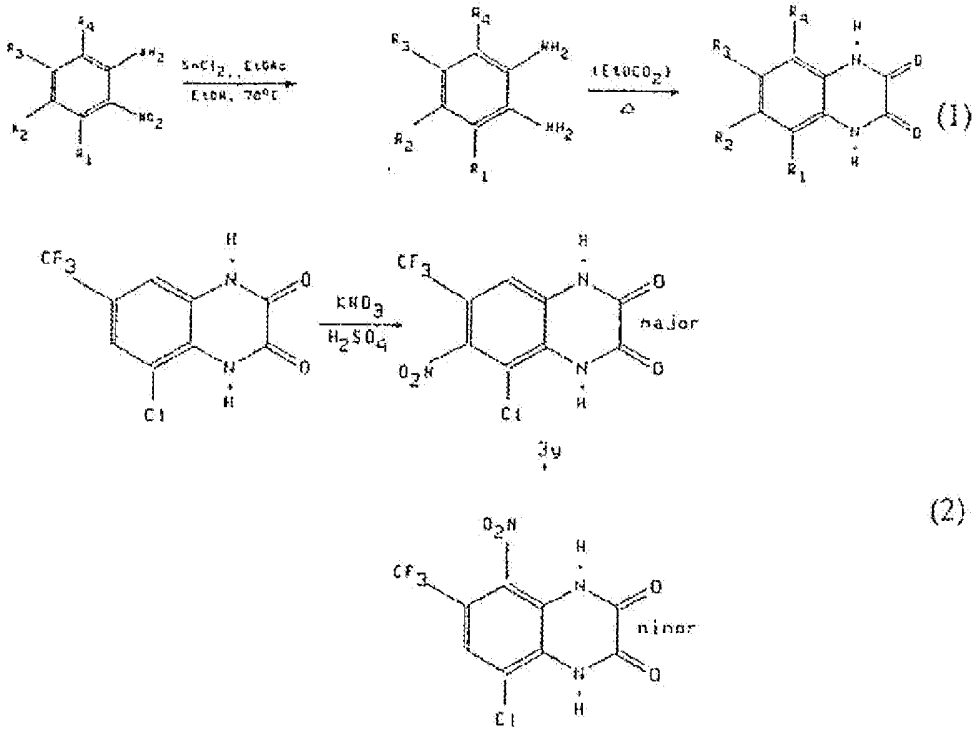
Tämän keksinnön vielä eräs tärkeä puoli koskee havaintoa, että myös aminosubstituoiduilla 1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioneilla on korkea sitoutumisaffiniteetti glysiininsitoutumiskohtaan. Tämä oli odottamatonta ottaen huomioon, että aminoryhmät ovat elektroneja luovuttavia ja että odotettiin, että elektroneja vetävät ryhmät ovat tärkeitä korkean sitoutumisaffiniteetin kannalta.

Potentiaalisina glysiiniantagonisteina testattaviksi syntetisoiduista yhdisteistä esitetään yhteenveto edempänä (taulukko I), joista keksinnön piiriin kuuluvia ovat yhdisteet 1r, 1s, 2r, 2s, 3r ja 3s. Useimmat olivat saatavissa dietyylioksalaatin yksinkertaisella kondensaatiolla vastaavan diaminobentseenin kanssa artikkelin Cheeseman, G. W. H., *J. Chem. Soc.* 1171 (1962) mukaisesti. 1,4-dihydro-2,3-kinoksaliinidioneja voidaan helposti valmistaa korkealla saannolla kuumentamalla oksaalihappoa ja vastaavaa *o*-diamiinia noin 100 - 140 °C:n lämpötilassa 1 - 10 tuntia vahvan mineraalihapon, kuten HCl:n, H_2SO_4:n, H_3PO_4:n tai vastaavan ollessa läsnä. Edullisessa suoritusmuodossa oksaalihappo ja *o*-diamiini kuumennetaan 125 °C:n lämpötilaan 2 N HCl:ssa 2,5 tunnin ajaksi vastaavan 1,4-dihydro-2,3-kinoksaliinidionin saamiseksi korkealla saannolla.

o-diaminobentseenilähtöaineet ovat saatavina joko suoraan valmistajalta tai saatiin helposti pelkistämällä

vastaava o-nitroaniliini (kaavio I, yhtälö 1), artikkelin Bellamy, F. D. ja Ou, K., *Tetr. Lett.* 25:839 (1984) mukaisesti. Nitraukset suoritettiin käsittelemällä 1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dionia KNO_3:lla väkevässä H_2SO_4:ssa (kaavio III, yhtälö 2). 5-halogeeni-6,7-fluori-1,4-dihydro-2,3-kinoksaliinidionit valmistettiin käsittelemällä 4,5-difluori-2-nitroaniliinia N-bromisukkinimidillä tai N-kloorisukkinimidillä (Mitchell, R. H. ym., *J. Org. Chem.* 44:4733 (1979)), mitä seurasi pelkistys ja kondensaatio dietyylioksalaatin kanssa. Yhdisteiltä testattiin potentiaalinen glysiiniantagonistiaktiivisuus havainnoimalla 1 µM glysiinillä stimuloidun [^{3}H]-MK-801:n sitoutumisen inhibitiota rotan tai marsun aivojen membraanihomogenaateissa. Mitä voimakkaampi glysiiniantagonisti sitä vähemmän [^{3}H]-MK-801:ta voi sitoutua, koska [^{3}H]-MK801:n sitoutumiskohta (PCP-reseptori) on esillä vain, kun ionikanava on avautunut glutamiinihapon *ja* glysiinin vaikutuksesta (Fletcher, E. L. ym., teoksessa *Glycine Neurotransmission*, Otterson, P. ym. (toim.), John Wiley and Sons (1990), Johnson, J. W. ym., *Nature* 325:529 (1987)).

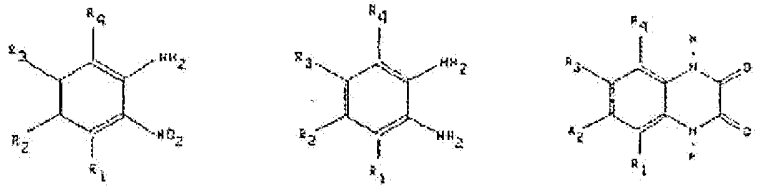
Kaavio 1



(1)

(2)

Taulukko I



1 2 3

		R^1	R^2	R^3	R^4
	1a	H	F	H	H
	b	H	CN	H	H
	c	H	CF_3	H	H
	d	H	F	F	H
	e	F	F	F	F
	f	Br	H	F	H
	1q	Cl	H	F	H
	r	Cl	F	F	H
	s	Br	F	F	H
	t	H	Br	F	H
	2a	H	F	H	H
	b	H	CN	H	H

c	H	CF_3	H	H
d	H	F	F	H
e	F	F	F	F
f	Br	H	F	H
g	H	Cl	F	H
h	Cl	H	CF_3	H
i	Br	H	CF_3	H
2q	Cl	H	F	H
r	Cl	F	F	H
s	Br	F	F	H
t	H	Br	F	H
u	Cl	H	Cl	H
v	Br	H	Br	H
w	Cl	Cl	Cl	Cl
3a	H	F	H	H
b	H	CN	H	H
c	H	CF_3	H	H
d	H	F	F	H
e	F	F	F	F
f	Br	H	F	H
g	H	Cl	F	H
h	Cl	H	CF_3	H
i	Br	H	CF_3	H
j	H	F	NO_2	H
k	H	CF_3	NO_2	H
l	H	$SOCl_2$	H	H
m	H	SO_2H	H	H
n	H	SO_2NH_2	H	H
o	H	SO_2N-n-Pr	H	H
p	H	$SO_2N(CH_3)_2$	H	H
3q	Cl	H	F	H
r	Cl	F	F	H
s	Br	F	F	H
t	H	Br	F	H
u	Cl	H	Cl	H
v	Br	H	Br	H
w	Cl	Cl	Cl	Cl
y	Cl	H	CF_3	NO_2
x	Cl	NO_2	CF_3	H
z	H	Br	Br	NO_2

Minkä tahansa tietyn tämän keksinnön mukaisesti valmistettavan yhdisteen anksiolyyttinen aktiivisuus voidaan määrittää käyttämällä mitä tahansa tunnustetuista ahdistuneisuuden eläinmalleista. Edullisen mallin ovat kuvanneet Jones, B. J. ym., *Br. J. Pharmacol.* 93:985-993 (1988). Tähän malliin sisältyy, että kyseistä yhdistettä annetaan hiirille, joilla on korkea ahdistuneisuuden perustaso. Testi perustuu havaintoon, että tällaiset hiiret kokevat vastenmieliseksi sen, että ne otetaan pimeästä kotiympäristös-

tään pimeässä koehuoneessa ja sijoitetaan valkeaksi maalatulle ja kirkkaasti valaistulle alueelle. Koelaatikossa on kaksi osastoa, toinen valkea ja kirkkaasti valaistu, toinen musta ja valaisematon. Hiirellä on pääsy molempiin osastoihin osastoja erottavassa väliseinässä lattian tasolla olevan aukon kautta. Hiiret sijoitetaan kirkkaasti valaistun alueen keskelle. Sen jälkeen kun hiiret ovat löytäneet pimeälle alueelle johtavan aukon, ne voivat vapaasti kulkea edestakaisin näiden kahden osaston välillä. Kontrollihiirillä on taipumus viettää suurin osa ajasta pimeässä osastossa. Kun niille annetaan anksiolyyttiä, hiiret kuluttavat enemmän aikaa tutkimassa uudenkaltaisempaa kirkkaasti valaistua osastoa, ja niillä nähdään pidentynyt viive pimeään osastoon siirtymisessä. Lisäksi anksiolyytillä käsitellyillä hiirillä nähdään enemmän toimintoja valkeassa osastossa, tutkivien pystyynnousujen ja viivojen ylitysten mukaan mitattuna. Koska hiiret voivat tottua koetilanteeseen, kokeessa pitäisi aina käyttää naiveja hiiriä. Viittä parametriä voidaan mitata: viive pimeään osastoon menemisessä, kummallakin alueella kulutettu aika, osastojen välisten kulkujen lukumäärä, kummassakin osastossa ylitettyjen viivojen lukumäärä ja pystyynnousujen lukumäärä kummassakin osastossa. Yhdisteiden antamisen odotetaan johtavan siihen, että hiiret kuluttavat enemmän aikaa testikammion suuremmalla, kirkkaasti valaistulla alueella.

Valo/pimeä-ympäristöntutkintamallissa tutkittavan aineen anksiolyyttinen aktiivisuus voidaan tunnistaa perustuen valoisassa osastossa tapahtuvien viivojen ylitysten ja pystyynnousujen lukumäärän kasvuun pimeässä osastossa tapahtuvien viivojen ylitysten ja pystyynnousujen lukumäärien kustannuksella, kontrollihiiriin verrattuna.

Toinen edullinen eläinmalli on rotan sosiaalisen interaktion testi, jonka ovat kuvanneet Jones, B. J. ym., em. teos, jossa kvantitoidaan kahden hiiren sosiaalisessa interaktiossa kuluttama aika. Tutkittavan aineen anksiolyyttinen aktiivisuus voidaan tunnistaa perustuen lisä-

ykseen ajassa jonka urosrottaparit kuluttavat aktiivisessa sosiaalisessa interaktiossa (90 % toiminnoista on luonteeltaan tutkivia). Testiareenan sekä tuttuutta että valaistustasoa voidaan säädellä. Lääkeainetta saamattomilla rotilla nähdään korkein sosiaalisen interaktion taso, kun testiareena on tuttu ja himmeästi valaistu. Sosiaalinen interaktio vähenee, jos areena on rotille vieras tai kirkkaasti valaistu. Anksiolyytit estävät tämän vähenemisen. Myös liikeaktiivisuuden kokonaistaso voidaan mitata, jotta voitaisiin havaita lääkeaineen sosiaalisille käyttäytymistapahtumille spesifiset vaikutukset.

Tämän keksinnön mukaisesti valmistettavia yhdisteitä voidaan antaa koostumuksina, joihin sisältyy kaavan I mukaisia yhdisteitä sellainen määrä, joka on tehokas ajatellun tarkoituksen saavuttamiseksi. Joskin yksilölliset tarpeet vaihtelevat, kunkin komponentin tehokkaiden määrien optimialueiden määrittäminen on sinänsä tunnettua. Yhdisteitä voidaan tyypillisesti antaa nisäkkäille, esim. ihmisille, suun kautta annoksella 0,0025 - 50 mg, tai ekvivalentti määrä niiden farmaseuttisesti hyväksyttävää suolaa, päivää ja sen nisäkkään painokiloa kohti, jota hoidetaan ahdistuneisuushäiriöiden takia, esim. yleistyneen ahdistuneisuushäiriön, pelkohäiriöiden, obsessiivis-kompulsiivisen häiriön, paniikkihäiriön ja trauman jälkeisen stressihäiriöiden. Edullisesti noin 0,01 - 10 mg/kg annetaan suun kautta tällaisten häiriöiden hoitamiseksi tai ehkäisemiseksi. Lihaksensisäistä injektiota varten annos on yleensä noin puolet suun kautta otettavasta annoksesta. Esimerkiksi ahdistuneisuuden hoitoon tai ehkäisyyn sopiva lihaksensisäinen annos olisi noin 0,0025 - 15 mg/kg, ja edullisimmin, noin 0,01 - 10 mg/kg.

Kun hoidetaan tai ehkäistään iskemiaan, aivo- tai selkäydintraumaan, hypoksiaan, hypoglykemiaan ja leikkauksiin liittyvää neuronien menetystä, tai yhtä hyvin hoidetaan Alzheimerin tautia, amyotrofista lateraaliskleroosia, Huntingtonin tautia ja Downin syndroomaa, tai kun hoidetaan

sairautta, jossa häiriön patofysiologiaan liittyy eksitoivien aminohappojen hyperaktiivisuus tai NMDA-reseptori-ionikanavaan liittyvä neurotoksisuus, koostumukset voivat käsittää tämän keksinnön mukaisesti valmistettavia yhdisteitä kerta-annostasolla noin 0,01 - 50 mg painokiloa kohti, tai ekvivalentin määrän niiden farmaseuttisesti hyväksyttävää suolaa, annostuksella 1 - 4 kertaa päivässä. Kroonisen kivun hoitoon tai anestesian aikaansaamiseen käytettäessä yhdisteitä voidaan antaa kerta-annostasolla noin 0,01 - 50 mg painokiloa kohti, tai ekvivalentti määrä niiden farmaseuttisesti hyväksyttävää suolaa, annostuksella 1 - 4 kertaa päivässä. Tietysti ymmärretään, että tarkka hoitotaso riippuu hoidettavan eläimen, esim. ihmisen, tapauksen taustasta. Ammattimies voi määrittää täsmällisen hoitotason ilman liiallista kokeilua.

Suun kautta otettava kerta-annos voi käsittää noin 0,01 - 50 mg, edullisesti noin 0,1 - 10 mg yhdistettä. Kerta-annos voidaan antaa kerran tai useampia kertoja päivässä yhtenä tai useampana tablettina, joista kukin sisältää noin 0,1 - 10, sopivasti noin 0,25 - 50 mg yhdistettä tai sen solvaatteja.

Keksinnön mukaisesti valmistettavia yhdisteitä sisältävä farmaseuttinen valmiste sisältää sopivia farmaseuttisesti hyväksyttäviä kantajia, jotka käsittävät apuaineita, jotka helpottavat yhdisteiden prosessointia valmisteiksi, joita voidaan käyttää farmaseuttisesti. Edullisesti valmisteet, varsinkin ne valmisteet, joita voidaan antaa suun kautta ja joita voidaan käyttää edullisessa antotavassa, kuten tabletit, päällystetyt tabletit ja kapselit, ja myös valmisteet, joita voidaan antaa rektaalisesti, kuten peräpuikot, sekä myös injektiona tai suun kautta annettaviksi sopivat liuokset, sisältävät noin 0,01 - 99 %, edullisesti noin 0,25 - 75 % vaikuttavaa ainetta/aineita yhdessä apuaineen kanssa.

Tämän keksinnön suojapiiriin sisältyvät myös keksinnön mukaisesti valmistettavien yhdisteiden myrkyttömät,

farmaseuttisesti hyväksyttävät suolat. Happoadditiosuoloja muodostetaan sekoittamalla yhdisteen liuos farmaseuttisesti hyväksyttävän, myrkyttömän hapon, kuten suolahapon, fumaarihapon, maleiinihapon, meripihkahapon, etikkahapon, sitruunahapon, viinihapon, hiilihapon, fosforihapon, oksaalihapon ja vastaavien liuoksen kanssa. Esimerkiksi emässuoloja muodostetaan sekoittamalla 1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dionin liuos farmaseuttisesti hyväksyttävän, myrkyttömän emäksen, kuten natriumhydroksidin, natriumkarbonaatin ja vastaavien liuoksen kanssa.

Edullisia keksinnön mukaisesti valmistettavia 1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dionien suoloja ovat erittäin liukoiset suolat, jotka käsittävät C_{3-24}-ammoniumvastaionin, jossa jokin alkyyliryhmistä voi olla substituoitu hydroksiryhmällä. Useimmat 1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dionit ovat erittäin liukenemattomia vesiliuoksiin. Siten 1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dionien i.v. antamista rajoittaa vaikuttavan aineen suhteellinen liukenemattomuus. Erittäin liukoisia ammoniumsuoloja voidaan valmistaa esimerkiksi liuottamalla 1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni liuokseen, jossa on yksi molaarinen ekvivalentti vastaavaa ammoniumhydroksidia tai aminoyhdistettä.

Ammoniumvastaionit voivat olla kvaternäärisiä ammoniumkationeita tai mono-, di- tai trisubstituoituja amiineja, jotka muodostavat protonoituneita ammoniumsuoloja, kun niitä yhdistetään 1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dionien kanssa liuoksessa.

1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dionien monokoliinisuolalla on pH noin 7,8 - 9,8, käytetystä 1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dionista riippuen. Vaihtoehtoisesti 1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni voidaan ensin liuottaa liuokseen, joka sisältää kaksi molaarista ekvivalenttia ammoniumhydroksidia. Dikoliinisuola voidaan eristää tai liuoksen pH voidaan säätää arvoon noin 7,8 - 9,8 yhdellä ekvivalentilla etikkahappoa.

1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dionien ammoniumsuola voidaan vaivatta eristää puhtaana lyofilisoimalla liuos, tuloksena kuiva jauhe, joka on erittäin liukoinen veteen. Jopa 90 mg/ml tai enemmän 1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dionin monokoliinisuolaa liukenee veteen antaen kirkkaan liuoksen. Suola voidaan myös liuottaa i.v. injektioon sopivaan isotoniseen glukoosiliuokseen.

Esimerkkeihin ammoniumhydroksideistä, joita voidaan käyttää ammoniumsuolojen valmistamiseksi, kuuluvat mitkä tahansa tetra-C_{1-6}-alkyyliammoniumhydroksidit, esim. tetrametyyliammoniumhydroksidi, tetraetyyliammoniumhydroksidi, tetrabutyyliammoniumhydroksidi, tetrapentyyliammoniumhydroksidi, tetraheksyyliammoniumhydroksidi, sekä myös mitkä tahansa tri-C_{1-6}-alkyyli-C_{1-6}-alkanoliammoniumhydroksidit, esim. koliinihydroksidi, (3-hydroksipropyyli)trimetyyliammoniumhydroksidi, (4-hydroksibutyyli)trimetyyliammoniumhydroksidi, (2-hydroksietyyli)trietyyliammoniumhydroksidi, (2-hydroksietyyli)tripropyyliammoniumhydroksidi ja (2-hydroksietyyli)tributyyliammoniumhydroksidi. Edullisesti ammoniumhydroksidi on koliinihydroksidi. Lisäksi mitä tahansa C_{6-12}-aralkyyli-C_{1-6}-trialkyyliammoniumhydroksidia voidaan käyttää, esim. bentsyylitrimetyyliammoniumhydroksidia.

Esimerkkeihin aminoyhdisteistä, joita voidaan käyttää 1,4-kinoksaliini-2,3-dionien suolojen valmistamiseksi, kuuluvat, näihin rajoittumatta, etyleenidiamiini, dietyleenitriamiini, N-metyylietanoliamiini, di-(2-etanoli)amiini, tri-(2-etanoli)amiini, spermidiini, spermiini ja aminohiilihydraatit, kuten glukoosiamiini, N-metyyliglukamiini, galaktoosiamiini, mannoosiamiini, ksyloosiamiini, sellobioosiamiini ja maltoosiamiini. Muihin aminoyhdisteisiin, joita voidaan käyttää 1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dionien ammoniumsuolojen valmistamiseksi, kuuluvat mono-N-, di-(N,N ja N,N')-, tri-(N,N,N')- ja tetra-(N,N,N',N')-C_{1-6}-alkyyliguanidiinit sekä myös biguanidiini, poly-C_{1-6}-alkyylisubstituoidut biguanidiinit, amidiini, arginiini, N-C_{1-6}-alkyyliamidiinit, 1,8-diatsabisyklo[5.4.0]undek-7-eeni (DBU),

tris(hydroksimetyyli)aminometaani (Tris, Tromethamine) ja bis-tris-propaani.

Kuten kuviosta 3 nähdään, kun 5-kloori-7-trifluorimetyyli-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dionin monokaliumsuola valmistetaan, se on veteen liukenematon. Kuitenkin 5-kloori-7-trifluorimetyyli-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dionin dikaliumsuola on liukoinen veteen, mutta se vaatii 4 ekvivalentin KOH:a lisäämisen, jotta saadaan liuos, jolla on pH-arvo 12,7. 1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni pysyy liukoisena, kun pH lasketaan arvoon 11,9 lisäämällä 1 ekvivalentti etikkahappoa. Kuitenkin toisen etikkahappoekvivalentin lisääminen saa aikaan sakan muodostumisen. Siihen mennessä kun pH tulee arvoon 11, saostuminen on täydellinen. Odottamatta on havaittu, että 5-kloori-7-trifluorimetyyli-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni liukenee vaivatta vain yhteen ekvivalenttiin koliinihydroksidia. Kun etikkahappoa lisätään, sakkaa ei ala muodostua ennen kuin pH tulee arvoon noin 9,2. Samaan tapaan 6,7-dikloori-5-nitro-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni voidaan liuottaa yhteen ekvivalenttiin koliinihydroksidia vedessä. pH voidaan säätää arvoon noin 8 ilman sakan ilmestymistä. Kuiva monokoliinisuola voidaan eristää puhtaassa muodossa, esimerkiksi lyofilisoimalla vesiliuos, ja se on liukoinen erittäin korkeissa konsentraatioissa (ainakin 90 mg/ml). Siten keksinnön tämä puoli on suuri edistysaskel alalla, koska se sallii 1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dionien konsentroitujen liuosten valmistamisen laskimonsisäistä antamista varten.

Joillakin 1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dionien liukoistamiseen hyödyllisillä ammoniumvastaioneilla voidaan nähdä toksisuutta i.v. antamisen jälkeen, esimerkiksi tetrametyyliammoniumhydroksidilla ja tetraetyyliammoniumhydroksidilla. On havaittu, että monet 1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dionit voidaan vaivatta liuottaa trishydroksimetyyliaminometaanin (Tris, Tromethamine USP) 0,05 - 0,5 M liuoksiin. Tris on käytännössä myrkytöntä laskimonsisäisesti ihmisille annettuna. Siten 1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-

dionien Tris-liuos on erittäin hyödyllinen ihmisille i.v. antamista varten, ja se ylittää suurimman esteen 1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dionien liuoksen saamiseksi ihmisille i.v. käyttöä varten. Vaihtoehtona Trisille voidaan käyttää bis-tris-propaania (1,3-bis[tris-(hydroksimetyyli)-metyyliamino]propaani), Trisin analogia, jolla myös nähdään matala toksisuus nisäkkäissä. Bis-tris-propaanilla on korkeampi pK kuin Trisilla, ja se on siksi hyödyllinen joidenkin 1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dionien liuottamiseksi, jotka eivät ole niin helposti liukoisia Trisiin.

Keksinnön mukaisesti valmistettavaa yhdistettä sisältäviä farmaseuttisia koostumuksia voidaan antaa mille tahansa eläimelle, joka voi kokea keksinnön mukaisten yhdisteiden suotuisia vaikutuksia. Tärkeimpinä tällaisten eläinten joukossa ovat ihmiset, joskaan keksinnön ei ole tarkoitus olla näin rajoittunut.

Farmaseuttisia koostumuksia voidaan antaa millä vain tavalla, jolla niiden aiottu tarkoitus saavutetaan. Esimerkiksi antaminen voi tapahtua parenteraalista, ihonalaista, laskimonsisäistä, lihaksensisäistä, vatsaontelonsisäistä tai transdermaalista reittiä tai suun limakalvon tai silmän kautta. Vaihtoehtoisesti tai samanaikaisesti antaminen voi tapahtua suun kautta. Annettu annos riippuu saajan iästä, terveydestä ja painosta, mahdollisen samanaikaisen hoidon laadusta, hoidon tiheydestä ja halutun vaikutuksen luonteesta.

Silloin kun koostumuksia annetaan silmän kautta, voidaan saada aikaan joko paikallinen tai systeeminen antaminen. Esimerkiksi koostumuksia voidaan antaa sellaisten silmätippojen muodossa, jotka ovat oleellisesti isotonisia kyynelnesteen kanssa, systeemistä antoa varten. Edullisesti tällaiset koostumukset käsittävät myös permeaatiota tehostavan aineen, joka edistää tämän keksinnön mukaisesti valmistettavien yhdisteiden systeemistä imeytymistä. Ks. US-patentti nro 5 182 258. Vaihtoehtoisesti koostumuksia voidaan antaa silmän kautta näköhermon degeneraation hoitami-

seksi tai ehkäisemiseksi. Tässä suoritusmuodossa yhdisteitä annetaan silmätippoina, kuten edellä on esitetty, tai niitä voidaan injektoida näköhermon läheisyyteen. Vaihtoehtoisesti voidaan käyttää ohuita silmälamelleja, jotka vapauttavat hitaasti tämän keksinnön mukaisesti valmistettavia yhdisteitä.

Farmakologisesti aktiivisten yhdisteiden lisäksi uudet farmaseuttiset valmisteet voivat sisältää sopivia farmaseuttisesti hyväksyttäviä kantajia, jotka käsittävät apuaineita, jotka helpottavat vaikuttavien aineiden prosessointia valmisteiksi, joita voidaan käyttää farmaseuttisesti. Edullisesti valmisteet, varsinkin ne valmisteet, joita voidaan antaa suun kautta ja joita voidaan käyttää edullisessa antotavassa, kuten tabletit, päällystetyt tabletit ja kapselit, ja myös valmisteet, joita voidaan antaa rektaalisesti, kuten peräpuikot, sekä myös injektiona tai suun kautta annettaviksi sopivat liuokset, esiintyvät pitoisuudessa noin 0,01 - 99 %, yhdessä apuaineen kanssa.

Farmaseuttiset valmisteet valmistetaan sinänsä tunnetulla tavalla, esimerkiksi tavanomaisten sekoitus-, rakeistus-, päällystettyjen tablettien valmistus-, liuotus- tai lyofilisointimenetelmillä. Siten suun kautta käytettäviksi tarkoitettuja farmaseuttisia valmisteita voidaan saada yhdistämällä vaikuttavat aineet kiinteiden apuaineiden kanssa, mahdollisesti jauhamalla saatu seos ja prosessoimalla raeseos, sopivien apuaineiden, jos niitä halutaan tai tarvitaan, lisäämisen jälkeen, tablettien tai päällystettävien tablettien ytimien valmistamiseksi.

Sopivia apuaineita ovat erityisesti täyteaineet, kuten sakkaridit, esimerkiksi laktoosi tai sakkaroosi, mannitoli tai sorbitoli, selluloosavalmisteet ja/tai kalsiumfosfaatit, esimerkiksi trikalsiumfosfaatti tai kalsiumvetyfosfaatti, kuin myös sideaineet, kuten tärkkelystahdas, käyttäen esimerkiksi maissitärkkelystä, vehnätärkkelystä, riisitärkkelystä, perunatärkkelystä, gelatiinia, traganttia, metyyliselluloosaa, hydroksipropyylimetyyliselluloo-

saa, natriumkarboksimetyyliselluloosaa ja/tai polyvinyylipyrrolidonia. Haluttaessa voidaan lisätä hajotusaineita, kuten edellä mainittuja tärkkelyksiä ja myös karboksimetyylitärkkelystä, silloitettua polyvinyylipyrrolidonia, agaria tai alginiinihappoa tai sen suolaa, kuten natriumalginaattia. Muita apuaineita ovat ennen kaikkea juoksevuudensäätelyaineet ja liukuaineet, esimerkiksi piihappo, talkki, steariinihappo tai sen suolat, kuten magnesiumstearaatti tai kalsiumstearaatti, ja/tai polyetyleeniglykoli. Päällystettävien tablettien ytimille järjestetään sopivat päällysteet, jotka haluttaessa ovat mahanesteitä kestäviä. Tähän tarkoitukseen voidaan käyttää konsentroituja sakkaridiliuoksia, jotka voivat mahdollisesti sisältää arabikumia, talkkia, polyvinyylipyrrolidonia, polyetyleeniglykolia ja/tai titaanidioksidia, lakkaliuoksia ja sopivia orgaanisia liuottimia tai liuotinseoksia. Mahanesteitä kestävien päällysteiden tuottamiseksi käytetään sopivien selluloosavalmisteiden liuoksia, kuten asetyyliselluloosaftalaatin tai hydroksipropyylimetyyliselluloosaftalaatin. Väriaineita tai pigmenttejä voidaan lisätä tabletteihin tai päällystettyjen tablettien päällysteisiin, esimerkiksi tunnistamista varten tai jotta karakterisoitaisiin vaikuttavan aineen annosten yhdistelmiä.

Muihin farmaseuttisiin valmisteisiin, joita voidaan käyttää suun kautta, kuuluvat gelatiinista tehdyt yhteenpainettavat kapselit sekä myös pehmeät, umpinaiset kapselit, jotka on tehty gelatiinista ja pehmittimestä, kuten glyserolista tai sorbitolista. Yhteenpainettavat kapselit voivat sisältää vaikuttavat aineet rakeiden muodossa, jotka voivat olla seoksia täyteaineiden, kuten laktoosin, sideaineiden, kuten tärkkelysten, ja/tai liukuaineiden, kuten talkin tai magnesiumstearaatin ja mahdollisesti säilöntäaineiden kanssa. Pehmeissä kapseleissa vaikuttavat aineet on edullisesti liuotettu tai suspensoitu sopiviin nesteisiin, kuten rasvaöljyihin tai nestemäiseen paraffiiniin. Lisäksi voidaan lisätä säilöntäaineita.

Mahdollisiin farmaseuttisiin valmisteisiin, joita voidaan käyttää rektaalisesti, kuuluvat esimerkiksi peräpuikot, jotka koostuvat yhden tai useamman vaikuttavan aineen yhdistelmästä peräpuikkojen perusaineen kanssa. Sopivia peräpuikkojen perusaineita ovat esimerkiksi luonnolliset tai synteettiset triglyseridit tai paraffiinihiilivedyt. Lisäksi on myös mahdollista käyttää rektaalisia gelatiinikapseleita, jotka koostuvat vaikuttavien aineiden yhdistelmästä perusaineen kanssa. Mahdollisiin perusaineisiin kuuluvat esimerkiksi nestemäiset triglyseridit, polyetyleeniglykolit tai paraffiinihiilivedyt.

Parenteraaliseen antamiseen sopiviin formulaatioihin kuuluvat vaikuttavien aineiden liuokset vesiliukoisessa muodossa, esimerkiksi vesiliukoisina ammoniumsuoloina (erityisesti tris-, bis-tris-propaani- ja koliinisuoloina) ja emäksisinä liuoksina. Lisäksi vaikuttavien aineiden suspensioita voidaan antaa asianmukaisina öljypohjaisina injektiosuspensioina. Sopiviin lipofiilisiin liuottimiin tai vehikkeleihin kuuluvat rasvaöljyt, esimerkiksi seesamiöljy, tai synteettiset rasvahappoesterit, esimerkiksi etyylioleaatti tai triglyseridit tai polyetyleeniglykoli 400 (yhdisteet ovat liukoisia PEG-400:aan). Vesipohjaiset injektiosuspensiot voivat sisältää aineita, jotka lisäävät suspension viskositeettia, esimerkiksi natriumkarboksimetyyliselloloosa, sorbitoli ja/tai dekstraani. Mahdollisesti suspensio voi sisältää myös säilöntäaineita.

Glysiininsitoutumiskohtien karakterisointi *in vitro* on ollut vaikeaa, koska ei ole ollut selektiivisiä lääkeaineligandeja. Siten tämän keksinnön mukaisesti valmistettavia glysiiniligandeja voidaan käyttää glysiininsitoutumiskohdan karakterisointiin. Erityisen edullisia substituoituja 1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioneja, joita voidaan käyttää tähän tarkoitukseen, ovat radioisotooppileimatut johdannaiset, esim. sellaiset, joissa yksi tai useampi atomeista on korvattu ^{3}H:lla, ^{11}C:llä, ^{14}C:llä, ^{15}N:llä tai ^{18}F:llä. Lisäksi positroniemittereitä, kuten ^{11}C tai ^{18}F voi-

daan sisällyttää 1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioniin positroniemissiotomografiassa (PET) käytettäväksi glysiininsitoutumiskohtien paikallistamista varten. Lisäksi ^{123}I-substituoituja 1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioneja voidaan käyttää glysiininsitoutumiskohdan yksittäisfotoniemissiotietokonetomografialla (SPECT) kuvantamista varten. Lisäksi voidaan valmistaa isotooppileimattuja yhdisteitä, jotka eivät ole radioaktiivisia, metabolisissa tutkimuksissa käytettäviksi, esim. sellaisia, joissa yksi tai useampi vedyistä ja/tai hiilistä on rikastettu ^{2}H:n tai ^{13}C:n suhteen.

Seuraavat esimerkit ovat tämän keksinnön mukaista menetelmää havainnollistavia, mutta eivät rajoittavia. Muut sopivat muunnelmat ja sovellutukset kliinisessä hoidossa normaalisti tavattavissa erilaisissa olosuhteissa ja parametreissä, ja jotka ovat ammattimiehille ilmeisiä, kuuluvat keksinnön henkeen ja suojapiiriin.

Esimerkit

Menetelmät ja materiaalit

Seuraavissa esimerkeissä 1 - 4 kaikki ^{1}H-NMR:t ajettiin 300 MHz:n taajuudella ja ^{13}C-NMR:t 75 MHz:n taajudella QE-300-laitteella, ja viitetaajuus on asetettu protoneja sisältävän liuotinjäännöksen mukaan. ^{19}F-NMR:t ajettiin 339 MHz:n taajuudella NT-360-laitteella, ja viitetaajuus on asetettu ulkoisen C_6F_6:n mukaan. Sulamispisteet saatiin Mel-Temp-sulamispistelaitteella, ja ne ovat korjaamattomia. Näytteet pantiin blokkiin, kun lämpötila oli > 250 °C hajoamisen minimoimiseksi ennen sulamista. DMF tislattiin ennen käyttöä. Kaikki muut reagenssit käytettiin sellaisina kuin saatiin valmistajalta. Yhdisteet hankittiin yhtiöltä Aldrich Chemical Co., ellei seuraavassa toisin mainita.

Esimerkki 1

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

Menetelmä A

6,7-dikloori-1,4-dihydro-2,3-kinoksaliinidioni (1)

Seosta, jossa oli 422 mg (2,5 mmol) 4,5-dikloori-o-fenyleenidiamiinia (Pfaltz & Bauer, Inc., käytettiin sellaisena kuin saatiin) ja 1,10 g (7,5 mmol) dietyylioksalaattia (Sigma, käytettiin sellaisena kuin saatiin), sekoitettiin argonin alla 160 °C:n lämpötilassa 2 tuntia, sitten 180 °C:n lämpötilassa 7 tuntia. Reaktioseoksen annettiin jäähtyä huoneenlämpötilaan (22 °C), se laimennettiin heksaaniseoksella (10 ml), sakka kerättiin talteen sentrifugoimalla ja pestiin heksaaniseoksella (2 x 10 ml). Harmaata kiinteää ainetta sekoitettiin 40 ml:n NaOH:n vesiliuosta (noin 1 N) ja aktiivihiilen (0,4 g) kanssa huoneenlämpötilassa 30 minuuttia, hiili poistettiin imusuodatuksella ja pestiin tislatulla H_2O:lla (6 x 10 ml), joka yhdistettiin alkuperäiseen suodokseen, happamoitiin ilman HCl:n noin 4 N vesiliuosta (noin 20 ml). Valkea sakka kerättiin talteen imusuodatuksella, pestiin tislatulla H_2O:lla (5 x 10 ml), EtOH:lla (3 x 5 ml), sitten kuivattiin 60 °C:n lämpötilassa alle 13 Pa (0,1 mmHg) paineessa 8 tuntia, tuloksena 426 mg (73,8 %) yhdistettä 1 kermanvärisenä kiinteänä aineena. Sp. > 400 °C ^{1}H-NMR (DMSO-d_6) 12,010 (s, 2H) 7,226 (s, 2H).

5-nitro-6,7-dikloori-1,4-dihydro-2,3-kinoksaliinidioni (2)

Yhdiste 1 (416 mg, 1,80 mmol) liuotettiin 5,5 ml:aan väkevää H_2SO_4:a 0 °C:n lämpötilassa sekoittaen. Tähän tulokseksi saatuun syvänharmaaseen liuokseen lisättiin 202 mg (2,22 mmol) hienoksi jauhettua KNO_3:a (Baker, käytettiin sellaisena kuin saatiin) 0 °C:n lämpötilassa sekoittaen. Seosta sekoitettiin 0 °C:n lämpötilassa 3 tuntia, sitten huoneenlämpötilassa (22 °C) 30 tuntia. Reaktioseos lisättiin jää-H_2O-seokseen (60 g), sakka kerättiin

talteen imusuodatuksella, pestiin tislatulla H_2O:lla (5 x 10 ml), EtOH:lla (3 x 5 ml), sitten kuivattiin alle 13 Pa (0,1 mmHg) paineessa 80 °C:n lämpötilassa 2 tuntia, tuloksena 443,5 mg (89,6 %) epäpuhdasta yhdistettä 2 kermanvärisenä, amorfisena kiinteänä aineena (^{1}H-NMR osoitti sen olevan 95-98-prosenttisen puhdasta).

Jatkopuhdistus oli seuraavanlainen:

443 mg epäpuhdasta yhdistettä 2 (edellä saatu) liuotettiin NaOH:n noin 1 N vesiliuokseen (120 ml) huoneenlämpötilassa, aktiivihiiltä (1 g) lisättiin, sitten sekoitettiin huoneenlämpötilassa 15 minuuttia. Hiili poistettiin imusuodatuksella, pestiin tislatulla H_2O:lla (2 x 10 ml). Yhdistetty suodos happamoitiin pH-arvoon 2 HCl:n noin 4 N vesiliuoksella (noin 50 ml). Sakka kerättiin talteen imusuodatuksella, pestiin tislatulla H_2O:lla (5 x 10 ml), EtOH:lla (2 x 5 ml), kuivattiin alle 13 Pa (0,1 mmHg) paineessa 80 °C:n lämpötilassa 2 tuntia, tuloksena 327 mg (74 %:n saanto) oleellisesti puhdasta yhdistettä 2, sp. 350 - 354 °C (haj.). (^{1}H-NMR osoitti, ettei epäpuhtauksia ollut mukana lähes lainkaan).

Jälleenkiteytys: 315 mg puhtaampaa yhdistettä 2 (edellä saatu) liuotettiin 45 ml:aan DMSO:ta, tähän liuokseen lisättiin H_2O:ta (noin 1 ml) tipoittain kunnes sakka muodostui. Seosta kuumennettiin (100 - 105 °C öljyhaude) sekoittaen (käyttäen pientä magneettisauvaa), H_2O:ta (noin 1 ml) lisättiin tipoittain, kunnes muodostui samea seos, ja DMSO:ta lisättiin tipoittain kirkkaan liuoksen saamiseksi. Kahdeksan tunnin huoneenlämpötilassa seisotuksen jälkeen keltaiset mikrokiteet kerättiin talteen imusuodatuksella, pestiin H_2O:lla (5 x 10 ml), EtOH:lla (2 x 3 ml), kuivattiin alle 13 Pa (0,1 mmHg) paineessa 80 °C:n lämpötilassa 3 tuntia, tuloksena 286 mg (90,8 %:n saanto) puhdasta yhdistettä 2, sp. 354 - 357 °C.

Menetelmä B

4,5-dikloori-1,2-fenyleenidiamiini (1)

Suspensioon, jossa oli 6,21 g (30,0 mmol) 4,5-dikloori-2-nitroaniliinia (Aldrich, käytettiin sellaisena kuin saatiin) EtOH:ssa (100 ml), lisättiin 310 mg 5-prosenttista Pd/C:tä, seosta hydrattiin 30 - 20 parrin H_2-paineella 4 tuntia, sitten suodatettiin. Suodos pyörohaihdutettiin kuiviin. Mustaa, kiinteää jäännösta sekoitettiin 250 ml:n HCl:n 2 N vesiliuosta kanssa 20 minuuttia, sitten suodatettiin. Suodos tehtiin emäksiseksi pH-arvoon 13 NaOH:n 4 N vesiliuoksella (125 ml). Sakka kerättiin talteen sintterisuppilolle imusuodatuksella, pestiin H_2O:lla (5 x 10 ml), kuivattiin 40 °C:n lämpötilassa alle 13 Pa (0,1 mmHg) paineessa 16 tuntia, saantona 3,72 g (70 %) raakatuotetta kahvin värisenä jauheena.

Edellä saatu raakatuote (3,70 g) puhdistettiin kiteyttämällä bentseenistä (60 ml), tuloksena 3,17 g (85 %:n saanto) lievästi purppuranvärisinä hiutaleina, joka oli puhdasta TLC:n mukaan ($CHCl_3$:EtOH = 9:1). Sp. 159 - 260 °C (Aldrich: 159 - 162 °C).

6,7-dikloori-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni

Suspensiota, jossa oli 2,655 g (15,0 mmol) 4,5-dikloorifenyleeni-1,2-diamiinia ja 1,986 g (15,75 mmol) oksaalihappodihydraattia (Fisher Scientific Co., käytettiin sellaisena kuin saatiin) 22,5 ml:ssa HCl:n 2 N vesiliuosta, palautusjäähdytettiin sekoittaen 125 °C:n lämpötilassa (hauteen lämpötila) 2,5 tuntia, (ensimmäisten 5 minuutin lämmityksen aikana suspensio lähes muuttui liuokseksi, sitten sakkaa alkoi muodostua). Reaktioseoksen annettiin jäähtyä 22 °C:seen, ja H_2O:ta (50 ml) lisättiin. Sakka kerättiin talteen Hirshin suppilolle imusuodatuksella, pestiin H_2O:lla (6 x 25 ml) ja kuivattiin 60 °C:n lämpötilassa alle 13 Pa (0,1 mmHg) paineessa 12 tuntia, saantona 3,39 g (98 %) 6,7-dikloorikinoksaliini-2-3,dionia syvän vaaleanpunaisena jauheena. Sp. > 400 °C. ^{1}H-NMR (DMSO-

d_6): δ 12,016 (s, 2H), 7,234 (s, 2H). Tämä tuote käytettiin seuraavassa reaktiossa ilman lisäpuhdistusta.

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

3,335 g (14,5 mmol) 6,7-dikloori-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dionia liuotettiin 65 ml:aan väkevää H_2SO_4:a sekoittaen ja jäähdyttäen jää-H_2O-hauteella, sitten 2,20 g (21,76 mmol) KNO_3:a (Baker, käytettiin sellaisena kuin saatiin) lisättiin erissä 10 minuutin aikana sekoittaen. Saatua seosta sekoitettiin 22 °C:n lämpötilassa typen alla 20 tuntia, sitten kaadettiin hitaasti jää-H_2O-seokseen (400 ml) sekoittaen. Sakka kerättiin talteen sintterisuppilolle imusuodatuksella, pestiin H_2O:lla (5 x 10 ml), ja kuivattiin 60 °C:n lämpötilassa alle 13 Pa (0,1 mmHg) paineessa 12 tuntia, tuloksena 3,39 g (85 %) epäpuhdasta 6,7-dikloori-5-nitro-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dionia harmaankeltaisena jauheena. Puhtaus: > 98,5 % HPLC-analyysin perusteella.

Yhdiste puhdistettiin seuraavasti. 3,365 g edellä saatua 6,7-dikloori-5-nitro-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dionia lisättiin 550 ml:aan NaOH:n 1 N vesiliuosta ja sekoitettiin kiivaasti 20 minuuttia. Saatu seos suodatettiin imusuodatuksella sintterisuppilon läpi pienen määrän liukenematonta materiaalia poistamiseksi. Suodokseen lisättiin hitaasti väkevää HCl:a (noin 43 ml) (tipoittain) kiivaasti sekoittaen pH:n säätämiseksi arvosta 13 arvoon 11 (käyttäen pH-mittaria seuraamiseen). (Kontrollikoe osoitti, että 6,7-dikloorikinoksaliini-2,3-dioni, nitrausreaktion lähtöaine, voitiin saostaa sen liuoksesta NaOH:n 1 N vesiliuoksessa vasta olosuhteissa, joissa pH oli välillä 9,5 - 8.) Sakka kerättiin talteen sintterisuppilolle imusuodatuksella ja pestiin H_2O:lla (5 x 50 ml). Kostea tuote lisättiin 200 ml:aan H_2O:ta, ja tähän tuloksena saatuun suspensioon lisättiin hitaasti väkevää HCl (tipoittain) pH:n säätämiseksi arvoon 5. Sakka kerättiin talteen Hirshin suppilolle imusuodatuksella, pestiin H_2O:lla (8 x

50 ml) ja kuivattiin 60 °C:n lämpötilassa alle 13 Pa (0,1 mmHg) paineessa 16 tuntia, tuloksena 3,12 g (92,9 %:n saanto) puhtaampaa 6,7-dikloori-5-nitro-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dionia. Sp. 347 - 348 °C. ^{1}H-NMR (DMSO-d_6): 12,265 (lev s, 2H), 7,379 (s, 1H). Puhtaus: > 99,2 % HPLC-analyysin perusteella.

Esimerkki 2

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

2-kloori-3,4-difluori-6-nitroaniliini

2-kloori-3,4-difluori-6-nitroaniliini valmistettiin käyttäen sovellusta Mitchellin ym. menetelmästä (Mitchell, R.H. ym., *J. Org. Chem.* 44:4733 (1979)). Liuokseen, jossa oli 4,5-difluori-2-nitroaniliinia (500 mg, 2,87 mmol) DMF:ssä (16 ml) typen alla, lisättiin N-kloorisukkinimidiä (401 mg, 3,00 mmol) DMF:ssä. Reaktion annettiin olla sekoituksessa 48 h. Sitten liuos kaadettiin 75 ml:aan H_2O:ta. Sitten muodostunutta sameaa oranssia suspensiota uutettiin 4 x 25 ml:lla metyleenikloridia. Yhdistettyjä orgaanisia uutoksia pestiin 5 x 20 ml:lla H_2O:ta ja 25 ml:lla kyllästettyä NaCl-liuosta. Orgaaninen faasi kuivattiin ($MgSO_4$) ja kuivausaine poistettiin imusuodatuksella. Liuotin pyöröhaihdutettiin, tuloksena kellanoranssi öljy, joka kiteytyi seisoessaan. ^{1}H-NMR osoitti tämän kiinteän aineen olevan klooratun tuotteen ja lähtöaineen seos. Seos erotettiin flash-kromatografialla (piidioksidigeeli, 3:1 heksaaniseos:etyyliasetaatti), saantona 162 mg keltaista, kiteistä kiinteää ainetta (27 %). ^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ 6,60 (lev s, 2H, NH_2), 8,00 (m, 1H, H-5). Lähtöaineesta oli 17 %:n kontaminaatio NMR:n mukaan.

3-kloori-4,5-difluori-1,2-diaminobentseeni

3-kloori-4,5-difluori-1,2-diaminobentseeni valmistettiin käyttäen sovellusta Bellamyn ym. menetelmästä (Bellamy, F.D. ym., *Tetrahedron Lett.* 25:839 (1984)) Seos, jossa oli 2-kloori-3,4-difluori-6-nitroaniliinia (160 mg, 0,767 mmol) ja $SnCl_2.2H_2O$:a (0,863 g, 3,84 mmol), liuotet-

tiin 5 ml:aan etyyliasetaattia ja 2 ml:aan absoluuttista etanolia typen alla ja kuumennettiin 75 °C:n lämpötilassa 5 tuntia. Reaktioseoksen annettiin jäähtyä huoneenlämpötilaan ja kaadettiin 50 ml:aan H_2O. Riittävä määrä kyllästettyä $NaHCO_3$-liuosta lisättiin (vaahtoamista!) pH:n saamiseksi arvoon 7. Tuloksena saatua seosta uutettiin 3 x 20 ml:lla etyyliasetaattia, ja yhdistettyjä orgaanisia uutoksia pestiin 20 ml:lla kyllästettyä NaCl-liuosta. Orgaaninen faasi kuivattiin ($MgSO_4$), imusuodatettiin ja liuotin pyöröhaihdutettiin, tuloksena ruskea kiinteä aine, 124 mg (91 %). ^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ 3,52 (lev s, 4H, 2(NH_2)), 6,49 (dd, 1H, J_{HF} = 7,5, 10,8 Hz, H-6). 4,5-difluori-1,2-diaminobentseeniä oli mukana 13 % NMR:n mukaan.

5-kloori-6,7-difluori-1,4-dihydro-2,3-kinoksaliinidioni

Otsikon yhdiste valmistettiin käyttäen muunnelmaa Cheesemanin menetelmästä. (Cheeseman, G.W.H., *J. Chem. Soc.* 1171 (1962)). Seos, jossa oli dietyylioksalaattia (981 mg, 6,72 mmol) ja 3-kloori-4,5-difluori-1,2-diaminobentseeniä (120 mg, 0,670 mmol), kuumennettiin palautusjäähdytykseen typen alla 15 tunniksi. Reaktioseoksen annettiin jäähtyä huoneenlämpötilaan ja harmaa kiinteä aine kerättiin talteen imusuodatuksella ja huuhdottiin jääkylmällä EtOH:lla (10 ml) ja ilmakuivattiin. Kiinteä aine otettiin ja liuotettiin kuumentaen 5 ml:aan 1 N NaOH:a. Liuos käsiteltiin aktiivihiilellä ja suodatettiin Celite-kerroksen läpi. Tuloksena saatu liuos happamoitiin varovasti 1 N HCl:lla (pH = 1). Liuokseen muodostui valkea jauhe pH-arvossa 6, mutta muutama pisara 1 N NaOH:a kirkasti liuoksen, ja lisättäessä muutama pisara 1 N HCl:a, valkeita neuloja muodostui hitaasti liuokseen. Nämä kerättiin talteen imusuodatuksella, huuhdottiin 20 ml:lla H_2O:ta ja kuivattiin tyhjiössä (13 Pa (0,1 torr), 78 °C), tuloksena 24,9 (16 %) vaaleankeltaisia neuloja. ^{1}H-NMR (d_6-DMSO) δ 7,05 (dd, 1H, J = 10,5, H-8), 11,6 (lev s, 1

H, NH), 12,0 (lev s, 1 H, NH). 6,7-difluori-1,4-dihydro-2,3-kinoksaliinidionia oli mukana 13 % NMR:n mukaan.

Esimerkki 3

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

2-bromi-3,4-difluori-6-nitroaniliini

2-bromi-3,4-difluori-6-nitroaniliini valmistettiin käyttäen sovellusta Mitchellin ym. menetelmästä (Mitchell, R.H. ym., *J. Org. Chem.* 44:4733 (1979)). Liuokseen, jossa oli 4,5-difluori-2-nitroaniliinia (500 mg, 2,87 mmol) DMF:ssä (25 ml) typen alla, lisättiin kerralla N-bromisukkinimidi (511 mg, 2,87 mmol) kuivassa DMF:ssä (16 ml). Reaktioseoksen annettiin olla sekoituksessa yli yön. TLC (1:1 heksaaniseos:etyyliasetaatti) osoitti lähtöainetta olevan vielä hieman. Lisää N-bromisukkinimidiä (100 mg) lisättiin, ja reaktioseosta sekoitettiin vielä 12 tuntia. Sitten liuos kaadettiin 100 ml:aan H_2O:ta ja tuloksena saatua sameaa suspensiota uutettiin 3 x 20 ml:lla metyleenikloridia. Yhdistetyt orgaaniset faasit pestiin 4 x 25 ml:lla H_2O:ta ja 25 ml:lla kyllästettyä NaCl-liuosta ja kuivattiin ($MgSO_4$). $MgSO_4$ imusuodatettiin ja liuotin pyöröhaihdutettiin, tuloksena kellanruskea öljy, joka kiteytyi hitaasti, saantona 700 mg (96 %). ^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ 6,70 (lev s, 2H, NH_2), 7,99 (m, 1H, H-5).

3-bromi-4,5-difluori-1,2-diaminobentseeni

3-bromi-4,5-difluori-1,2-diaminobentseeni valmistettiin käyttäen sovellusta Bellamyn ym. menetelmästä (Bellamy, F.D. ym., *Tetrahedron Lett.* 25:839 (1984)). Seosta, jossa oli 2-bromi-3,4-difluori-6-nitroaniliinia (700 mg, 2,78 mmol) ja $SnCl_2.2H_2O$:a (3,14 g, 13,9 mmol) liuotettuina 7 ml:aan etyyliasetaattia ja 3 ml:aan absoluuttista etanolia typen alla, kuumennettiin 75 °C:n lämpötilassa 2 tuntia. Kaikki lähtöaine oli reagoinut, kuten TLC osoitti (piidioksidigeeli, 2:1 heksaaniseos:etyyliasetaatti). Reaktioseoksen annettiin jäähtyä huoneenlämpötilaan ja kaadettiin 20 ml:aan jäämurskaa. Riittävä määrä

kyllästettyä $NaHCO_3$-liuosta lisättiin (vaahtoamista!) pH:n saamiseksi arvoon 5, sitten paksua keltaista valkeaa emulsiota uutettiin 3 x 25 ml:lla etyyliasetaattia, ja yhdistettyjä orgaanisia uutoksia pestiin kyllästetyllä NaCl-liuoksella. Orgaaninen faasi kuivattiin ($MgSO_4$), imusuodatettiin, ja liuotin pyöröhaihdutettiin, tuloksena tummanruskea öljy, joka kiteytyi seisoessaan, saantona 410 mg (66 %). ^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ 3,59 (lev s, 4H, 2(NH_2)), 6,52 (m, 1H, H-6).

5-bromi-6,7-difluori-1,4-dihydro-2,3-kinoksaliinidioni

Otsikon yhdiste valmistettiin käyttäen sovellusta Cheesemanin menetelmästä. (Cheeseman, G.W.H., *J. Chem. Soc.* 1171 (1962)). Seos, jossa oli dietyylioksalaattia (2,70 g, 18,5 mmol) ja 3-bromi-4,5-difluori-1,2-diaminobentseeniä (410 mg, 1,85 mmol), kuumennettiin palautusjäähdytykseen typen alla 15 tunniksi. Reaktioseoksen annettiin jäähtyä huoneenlämpötilaan, ja tummanruskea kiinteä aine kerättiin talteen imusuodatuksella ja huuhdottiin EtOH:lla (20 ml) ja ilmakuivattiin, saantona 215 mg (42 %). Osa tästä kiinteästä aineesta (150 mg) otettiin ja liuotettiin 20 ml:aan 1 N NaOH:a kuumentaen. Liuos käsiteltiin aktiivihiilellä ja suodatettiin Celite-kerroksen läpi. Tuloksena saatu liuos happamoitiin varovasti 1 N HCl:lla (pH = 1). Liuokseen muodostui hitaasti vaaleankeltaisia neuloja, ja ne kerättiin talteen imusuodatuksella, huuhdottiin 20 ml:lla H_2O:ta ja kuivattiin tyhjiössä (13 Pa (0,1 torr), 78 °C), tuloksena 67,8 mg jauhomaisia vaaleankeltaisia kiteitä, sp. 306 - 310 °C (haj.). ^{1}H-NMR (d_6-DMSO) δ 7,09 (dd, 1H, J = 7,5, H-8), 11,3 (lev s, 1H, NH), 12,1 (lev s, 1H, NH). EIMS m/z 278 (M+2, 75), 276 (M+, 77), 250 (56), 248 (57), 141 (bp). EIHRMS laskettu yhdisteelle $C_8H_4BrF_2N_2O_2$) 275,9346, havaittu 275,9331.

Esimerkki 4

5-kloori-6-nitro-7-trifluorimetyyli-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni ja 5-kloori-8-nitro-7-trifluorimetyyli-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dionin (ei keksinnön mukainen yhdiste) valmistus

Otsikon yhdisteet valmistettiin käyttäen sovellusta Cheesemanin menetelmästä. (Cheeseman, G.W.H., *J. Chem. Soc.* 1171 (1962)). 6-kloori-7-trifluorimetyyli-1,4-dihydro-2,3-kinoksaliinidioni (500 mg, 1,89 mmol) liuotettiin 15 ml:aan väkevää H_2SO_4:a ja kirkas liuos jäähdytettiin 0 °C:seen sekoittaen. Tähän lisättiin pienissä erissä KNO_3:a (191 mg, 1,89 mmol). Reaktioseoksen annettiin olla sekoituksessa tunnin ajan 0 °C:n lämpötilassa ja sitten annettiin tulla huoneenlämpötilaan ja olla sekoituksessa yli yön. Sitten vaaleankeltainen reaktioseos kaadettiin 50 ml:aan jää-H_2O-seosta. Tuote eristettiin imusuodatuksella valkeana kiinteänä aineena, joka huuhdeltiin pienellä määrällä kylmää H_2O:ta ja ilmakuivattiin. Valkea kiinteä aine liuotettiin mahdollisimman pieneen määrään kuumaa DMSO:ta. Kiehuvaa H_2O:ta lisättiin tipoittain, kuumentaen kunkin lisäyksen jälkeen, kunnes sakka ei enää liuennut. Muutama pisara DMSO:ta lisättiin, kunnes liuos oli kirkas, ja liuoksen annettiin jäähtyä hitaasti huoneenlämpötilaan. Valkea kiinteä aine eristettiin imusuodatuksella, ja sen annettiin ilmakuivua. Kiinteä aine kuivattiin vielä tyhjiössä (13 Pa (0,1 torr), 25 °C), tuloksena 241,6 mg 6-nitro- ja 8-nitrotuotteen seosta suhteessa 3,3:1 ^{1}H-NMR:n mukaan. Sakka, joka muodostui edellisessä suodoksessa, eristettiin imusuodatuksella, huuhdottiin 50 ml:lla H_2O:ta ja kuivattiin kuten edellä, tuloksena valkea jauhe (80,7 mg), joka oli 6-nitro- ja 8-nitrotuotteen seos suhteessa 12,6:1. Edeltävistä näytteistä yhteensä saatiin 55 %:n saanto, korjattuna reagoimattoman lähtöaineen suhteen. Osa 3,3:1-seoksesta otettiin ja jälleenkiteytettiin DMSO:H_2O-seoksesta kuten edellä on kuvattu, tuloksena pieniä, neulamaisia kiteitä, jotka eristettiin imusuodatuk-

sella, tuloksena 21,1 mg 6-nitro- ja 8-nitrotuotteen seosta suhteessa 1:1,76. Tuotteiden suhteet seoksissa määritettiin ^{1}H-NMR:llä, tarkkaillen aromaattisten vetyjen integroituja arvoja asemissa δ 7,45 ja 7,84. Substituutioasemat ovat alustavia arvioita ja perustuvat aromaattisten vetyjen kemiallisiin siirtymiin. ^{1}H-NMR (d_6-DMSO) δ 7,45 (s, 8-H, 6-nitrotuote), (s, 6-H, 8-nitrotuote), 12,18 (s, N-H), 12,41 (s, N-H). EIMS m/z 311 (M+2, 35), 309 (M+, bp), 251 (60), 235 (95). EIHRMS laskettu yhdisteelle $C_9H_3ClF_3N_3O_4$: 308,9733, havaittu 308,9768.

Pääasiallinen isomeeri, 5-kloori-6-nitro-7-trifluorimetyyli-1,4-dihydro-2,3-kinoksaliinidioni, eristettiin puhtaana 64 %:n saannolla DMSO-vesi-seoksesta kiteyttämällä. Sp. 343 - 347 °C. Rakenne varmistettiin röntgenanalyysillä.

Seuraavissa esimerkeissä 5 - 10 reagensseja käytettiin sellaisina kuin saatiin, ellei toisin ilmoiteta. Sulamispisteet saatiin Mel-Temp-sulamispistelaitteella, ja ne ovat korjaamattomia. Näytteet pantiin blokkiin, kun lämpötila oli yli 250 °C hajoamisen minimoimiseksi ennen sulamista. Pylväskromatografia suoritettiin flash-ajoina Davisil-piidioksidigeelissä (200-425 mesh), ellei toisin ilmoiteta. Analyyttinen ohutkerroskromatografia suoritettiin alumiinitaustaisilla piidioksidigeeli 60 F_{254} -levyillä, ja visualisointi saatiin aikaan ultraviolettilampulla. ^{1}H-NMR spektrit tallennettiin 300 MHz:n General Electric QE-300 -laitteella, kemialliset siirtymät ilmoitetaan delta-yksiköissä, viitetaso asetettuna deuteroitujen liuottimien protonijäännösten signaalien perusteella ($CHCl_3$, δ 7,26, CHD_2OD, δ 3,30, CD_3SOCD_2H, δ 2,49, CD_3COCD_2H, δ 2,04. ^{13}C-NMR spektrit ajettiin 75 MHz:n taajuudella. Infrapunaspektrit saatiin Nicolet 5DXB FT-IR -spektrometrillä. Absorptiot kirjattiin aaltolukuina (cm^{-1}), ja absorptioiden intensiteetti on ilmoitettu kirjaimilla s (vahva), m (keskivahva) ja w (heikko). Massaspektrit tallennettiin VG ZAB-2-HF -massaspektrometrillä, jossa oli VG-11-250

-datasysteemi, elektroni-ionisaatiomoodissa (70 eV), ellei toisin ilmoiteta. Mikroanalyysit suoritti Desert Analytics (Tuscon, Arizona).

Esimerkki 5

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

Artikkelin Cheeseman, G.W.H., *J. Chem. Soc.* 1170 (1962) menettelyä sovellettiin. Sekoituksessa olevaan suspensioon, jossa oli 6,7-dibromi-1,4-dihydro-2,3-kinoksaliinidionia (576 mg, 1,8 mmol) väkevässä H_2SO_4:ssa (6 ml) 0 °C:n lämpötilassa 30 minuutin ajan, lisättiin KNO_3:a (220 mg, 2,18 mmol, Baker) yhtenä eränä. Seosta sekoitettiin 0 °C:n lämpötilassa 3 tuntia sitten huoneenlämpötilassa päivän ajan. Seoksen väri muuttui punaisesta kellanruskeaksi. Sitten se kaadettiin jäille (60 g), mikä johti kirkkaankeltaisen sakan erottumiseen, joka kerättiin talteen suodattamalla ja pestiin tislatulla vedellä (2 x 2 ml) ja sen jälkeen etanolilla (2 x 1 ml), tuloksena 498 mg epäpuhdasta 5-nitro-6,7-dibromi-1,4-dihydro-2,3-kinoksaliinidionia (76 %, sisältää vähäisiä epäpuhtauksia NMR:n mukaan). Kiteytys DMSO/H_2O-seoksesta antoi puhtaan 5-nitro-6,7-dibromi-1,4-dihydro-2,3-kinoksaliinidionin kirkkaankeltaisina mikrokiteinä, sp. 352 - 354 °C (haj.). IR (KBr, cm^{-1}): 3387, 3256, 1756, 1700, 1537. NMR (^1H, DMSO-d_6): δ 7,475 (s, 1H), 12,217 (s, 1H), 12,265 (s, 1H). HRMS: laskettu yhdisteelle $C_8H_3N_3O_4Br_2$ (M+) m/z: 362,8489, havaittu: 362,8509.

Esimerkki 6

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

Cheesemanin menetelmää, em. teos, sovellettiin. 5,7-dikloori-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dionia (239 mg, 1,03 mmol) liuotettiin väkevään H_2SO_4:oon (3 ml) 0 °C:n lämpötilassa 30 minuutin ajan, ja KNO_3:a (125,3 mg, 1,24 mmol, Baker) lisättiin tähän liuokseen. Seosta sekoitettiin 0 °C:n lämpötilassa 3 tuntia ja sitten sekoitet-

tiin huoneenlämpötilassa 30 tuntia. Sitten se kaadettiin jääveteen (15 g). Sakka ilmestyi ja kerättiin talteen suodattamalla, liuotettiin 1 N KOH:iin (10 ml) ja punainen sakka poistettiin suodattamalla. Sitten liuos happamoitiin 4 N HCl:lla pH-arvoon 2, tuloksena kermanvärinen sakka, joka kerättiin talteen suodattamalla, sitten kuivattiin ilmassa 50 °C:n lämpötilassa 4 tuntia, tuloksena puhdas 6-nitro-5,7-dikloori-1,4-dihydro-2,3-kinoksaliinidioni (231 mg, 80 %) keltaisina mikrokiteinä. Sp. 320 - 325 °C (haj. 290 °C:sta alkaen). IR (KBr, cm^{-1}): 3467, 3140, 3055, 2946, 1717, 1693, 1541. NMR (^1H, DMSO-d_6): δ 7,221 (s, 1H), 11,932 (s, 1H), 12,312 (s, 1H). HRMS: laskettu yhdisteelle $C_8H_3N_3O_4Cl_2$ (M+) m/z: 274,9499, havaittu: 274,9509

Esimerkki 7

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

Cheesemanin menetelmää, em. teos, sovellettiin. 5,7-dibromi-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dionia (74 mg, 0,23 mmol) liuotettiin väkevään H_2SO_4:oon (1 ml) 0 °C:n lämpötilassa 30 minuutin ajan, ja sitten KNO_3:a (28 mg, 0,27 mmol, Baker) lisättiin tähän liuokseen. Seosta sekoitettiin 0 °C:n lämpötilassa 3 tuntia ja sitten huoneenlämpötilassa 30 tuntia. Se kaadettiin jääveteen (8 g), ja sakka kerättiin talteen suodattamalla, liuotettiin 1 N KOH:iin (5 ml), ja punainen sakka poistettiin suodattamalla. Sitten liuos happamoitiin 4 N HCl:lla pH-arvoon 2, tuloksena kermanvärinen sakka, joka kerättiin talteen suodattamalla, sitten kuivattiin ilmassa 50 °C:n lämpötilassa 4 tuntia, mistä saatiin puhdas 6-nitro-5,7-dibromi-1,4-dihydro-2,3-kinoksaliinidioni (71 mg, 84,5 %) keltaisena jauheena, sp. 318 - 320 °C (haj.). IR (KBr, cm^{-1}): 3468, 3131, 3062, 2931, 1712, 1593, 1537. NMR (^1H, DMSO-d_6): δ 7,392 (s, 1H), 11,566 (s, 1H), 12,274 (s, 1H). HRMS: laskettu yhdisteelle $C_8H_3N_3O_4Br_2$ m/z: 362,8489, havaittu: 362,8478.

Esimerkki 8

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

Cheesemanin menetelmää, em. teos, sovellettiin. 5-kloori-7-fluori-1,4-dihydro-2,3-kinoksaliinidionia (30 mg, 0,14 mmol) liuotettiin väkevään H_2SO_4:oon (0,5 ml) 0 °C:n lämpötilassa 30 minuutin ajan, ja KNO_3:a (17 mg, 0,17 mmol, Baker) lisättiin yhtenä eränä tähän liuokseen. Seosta sekoitettiin 0 °C:n lämpötilassa 3 tuntia, sitten huoneenlämpötilassa 30 tuntia. Se kaadettiin jääveteen (5 g), ja sakka kerättiin talteen suodattamalla. Sakka liuotettiin 1 N NaOH:iin (5 ml), sitten happamoitiin 4 N HCl:lla pH-arvoon 2, tuloksena kermanvärinen sakka, joka kerättiin talteen suodattamalla, sitten kuivattiin ilmassa 50 °C:n lämpötilassa 4 tuntia, tuloksena puhdas (NMR:n mukaan) otsikon yhdiste 5-kloori-6-nitro-7-fluori-1,4-dihydro-2,3-kinoksaliinidioni (31 mg, 85,4 %) valkeana, amorfisena kiinteänä aineena. Sp: hajosi 280 °C:sta alkaen. IR (KBr, cm^{-1}): 3600, 3462, 3131, 1712, 1612, 1550. NMR (^1H, DMSO-d_6): δ 7,106 (d, J = 10,2 Hz, 1H), 11,800 (s, 1H), 12,371 (s, 1H). HRMS: laskettu yhdisteelle $C_8H_3N_3O_4ClF$ (M+) m/z: 258,9795, havaittu: 258,9790.

Esimerkki 9

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

Cheesemanin menetelmää, em. teos, sovellettiin. 5-bromi-7-fluori-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dionia (77 mg, 0,30 mmol) liuotettiin väkevään H_2SO_4:oon (1 ml) 0 °C:n lämpötilassa 30 minuutin ajan, ja KNO_3:a (35 mg, 0,346 mmol, Baker) lisättiin tähän liuokseen. Seosta sekoitettiin 0 °C:n lämpötilassa 3 tuntia ja sitten huoneenlämpötilassa 30 tuntia. Seos kaadettiin jääveteen (10 g), ja sakka kerättiin talteen suodattamalla. Sakka liuotettiin 1 N NaOH:iin (10 ml), sitten happamoitiin 4 N HCl:lla pH-arvoon 2, tuloksena kermanvärinen sakka, joka kerättiin talteen suodattamalla, ja kuivattiin ilmassa 50 °C:n läm-

pötilassa 4 tuntia, tuloksena puhdas (NMR:n mukaan) 5-bromi-6-nitro-7-fluori-1,4-dihydro-2,3-kinoksaliinidioni (81 mg, 90 %) valkeana, amorfisena kiinteänä aineena, sp. 320 - 325 °C (haj. 290 °C:sta alkaen). IR (KBr, cm^{-1}): 3416, 3071, 2952, 1721, 1609, 1546. NMR (^1H, DMSO-d_6): δ 7,146 (d, J = 10,2 Hz, 1H), 11,432 (s, 1H), 12,340 (s, 1H). HRMS: laskettu yhdisteelle $C_8H_3N_3O_4BrF$ (M+) m/z: 302,9290, havaittu: 302,9290.

Esimerkki 10

5-bromi-6(8)-nitro-7-trifluorimetyyli-1,4-dihydro-2,3-kinoksaliinidionin valmistus (8-nitroyhdiste ei ole keksinnön mukainen)

Cheesemanin menettelyä, em. teos, sovellettiin. 5-bromi-7-trifluori-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dionia (75 mg, 0,24 mmol) liuotettiin väkevään H_2SO_4:oon (1 ml) 0 °C:n lämpötilassa sekoittaen, johon lisättiin KNO_3:a (30 mg, 0,28 mmol, Baker) 0 °C:n lämpötilassa sekoittaen. Seosta sekoitettiin 0 °C:n lämpötilassa 2 tuntia, sitten huoneenlämpötilassa päivän ajan. Seoksen väri muuttui kellanruskeaksi. Sitten se kaadettiin jääveteen (10 g) vaaleankeltaisen sakan erottamiseksi. Sakka kerättiin talteen suodattamalla ja pestiin tislatulla vedellä (1 ml) ja sen jälkeen etanolilla (2 x 1 ml), tuloksena epäpuhdas 5-bromi-6(8)-nitro-7-trifluorimetyyli-1,4-dihydro-2,3-kinoksaliinidioni (78 mg, 92 %), joka sisältää jonkin verran isomeeriä NMR:n mukaan. Kiteytys DMSO/H_2O-seoksesta antoi puhdasta tuotetta valkeana mikrokiteenä. Sp. 290 - 292 °C. IR (KBr, cm^{-1}): 3435, 3143, 1713, 1613, 1555. NMR (^1H, DMSO-d_6): δ 7,519 (s, 1H) 6-nitrolle, 7,960 (s, 1H) 8-nitrolle (6:8 = 70:30), 11,811 (s, 1H), 12,391 (s, 1H). HRMS: laskettu yhdisteelle $C_9H_3N_3O_4F_3Br$ (M+) m/z: 352,9258, havaittu: 352,9270.

Seuraavissa synteeseissä reagensseja käytettiin sellaisina kuin saatiin, ellei toisin ilmoiteta. Sulamispisteet saatiin Mel-Temp-sulamispistelaitteella, ja ne ovat korjaamattomia. Näytteet pantiin blokkiin, kun lämpö-

tila oli yli 250 °C hajoamisen minimoimiseksi ennen sulamista. Pylväskromatografia suoritettiin flash-ajoina Davisil-piidioksidigeelissä (200-425 mesh), ellei toisin ilmoiteta. Analyyttinen ohutkerroskromatografia suoritettiin alumiinitaustaisilla piidioksidigeeli 60 F_{254} -levyillä, ja visualisointi saatiin aikaan ultraviolettilampulla. ^{1}H-NMR spektrit tallennettiin 300 MHz:n General Electric QE-300 -laitteella, kemialliset siirtymät ilmoitetaan delta-yksiköissä, viitetaso asetettuna deuteroitujen liuottimien protonijäännösten signaalien perusteella ($CHCl_3$, δ 7,26, CHD_2OD, δ 3,30, CD_3SOCD_2H, δ 2,49, CD_3COCD_2H, δ 2,04). ^{13}C-NMR spektrit ajettiin 75 MHz:n taajuudella. Infrapunaspektrit saatiin Nicolet 5DXB FT-IR -spektrometrillä. Absorptiot kirjattiin aaltolukuina (cm^{-1}), ja absorptioiden intensiteetti on ilmoitettu kirjaimilla s (vahva), m (keskivahva) ja w (heikko). Massaspektrit tallennettiin VG ZAB-2-HF -massaspektrometrillä, jossa oli VG-11-250 -datasysteemi, elektroni-ionisaatiomoodissa (70 eV), ellei toisin ilmoiteta. Mikroanalyysit suoritti Desert Analytics (Tuscon, Arizona).

Esimerkki 11

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

Sekoituksessa olevaan seokseen, jossa oli 5-nitro-6,7-dibromi-1,4-dihydro-2,3-kinoksaliinidionia (327 mg, 0,89 mmol) etanolissa (10 ml), lisättiin $SnCl_2.2H_2O$:a (1,0 g, 4,45 mmol) yhtenä eränä. Seosta palautusjäähdytettiin 80 °C:n lämpötilassa (öljyhaude 90 °C) sekoittaen 4 tuntia. Sitten seos jäähdytettiin huoneenlämpötilaan, ja keltainen sakka kerättiin talteen suodattamalla ja sen jälkeen pestiin kylmällä etanolilla (2 x 1 ml), mistä saatiin 227 mg (76 %) epäpuhdasta otsikon tuotetta (sisältää vähäisiä epäpuhtauksia NMR:n mukaan). Kiteytys DMSO/H_2O-seoksesta antoi 193 mg puhdasta otsikon tuotetta kirkkaankeltaisina neuloina, sp. 324 - 326 °C (haj.), väri muuttui 270 °C:sta alkaen. IR (KBr, cm^{-1}): 3456, 3281, 1700, 1643.

NMR (^{1}H, DMSO-d_6): δ 5,844 (s, 2H), 6,732 (s, 1H), 11,257 (s, 1H), 11,810 (s, 1H). Puhtaus: >96,96 % HPLC:n mukaan. HRMS: laskettu yhdisteelle $C_8H_5N_3O_2Br_2$ (M+) m/z 332,8747, havaittu: 332,8754. Vahvuus suhteessa DCK:hon: 341 %.

Esimerkki 12

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

Sekoituksessa olevaan seokseen, jossa oli 5-nitro-6,7-dikloori-1,4-dihydro-2,3-kinoksaliinidionia (110 mg, 0,40 mmol) etanolissa (6 ml), lisättiin $SnCl_2.2H_2O$:a (448 mg, 2,0 mmol) yhtenä eränä. Seosta palautusjäähdytettiin 80 °C:n lämpötilassa (öljyhaude 90 °C) sekoittaen tunnin ajan kirkkaan liuoksen muodostamiseksi ja palautusjäähdytytettiin jatkuvasti vielä 3 tuntia. Sitten seos jäähdytettiin huoneenlämpötilaan, ja keltainen sakka kerättiin talteen suodattamalla ja pestiin kylmällä etanolilla (2 x 1 ml), tuloksena 61 mg (62 %) epäpuhdasta otsikon yhdistettä (sisältää vähäisiä epäpuhtauksia NMR:n mukaan). Kiteytys DMSO/H_2O-seoksesta antoi 43 mg puhdasta otsikon yhdistettä kirkkaankeltaisina neuloina, sp. > 350 °C (haj.), väri muuttui 320 °C:sta lähtien. IR (KBr, cm^{-1}): 3468, 3389, 3057, 1695, 1636, 1596, 1397. NMR (^{1}H, DMSO-d_6): δ 5,935 (s, 2H), 6,595 (s, 1H), 11,317 (s, 1H), 11,868 (s, 1H). Puhtaus >98,95 % HPLC:n mukaan. HRMS: laskettu yhdisteelle $C_8H_5N_3O_2Br_2$ (M+) m/z: 244,9757, havaittu 244,9740. Vahvuus suhteessa DCK:hon: 323 %

Esimerkki 13

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

Sekoituksessa olevaan liuokseen, jossa oli 5-amino-6,7-dikloori-1,4-dihydro-2,3-kinoksaliinidionia (61,5 mg, 0,25 mmol) kuivassa DMF:ssä (7 ml), lisättiin trietyyliamiinia (33 mg, 32 mmol, tislattu ennen käyttöä) ja asetyylikloridia (20 mg, 0,255 mmol, tislattu ennen käyttöä). Seoksesta tuli keltainen liuos 2 minuutin jälkeen. Kahden tunnin kuluttua 25 °C:n lämpötilassa ilmestyi

sakka, ja sekoitusta jatkettiin yli yön, jona aikana saatiin lisää valkeaa sakkaa. Sakka kerättiin talteen suodattamalla ja pestiin vedellä (2 x 1 ml), tuloksena valkea jauhe, joka oli 34 mg epäpuhdasta otsikon yhdistettä (sisältää hieman epäpuhtautta NMR:n mukaan). Suodos lisättiin veteen (15 ml) sakan saamiseksi, ja tämä kerättiin talteen suodattamalla ja pestiin vedellä (2 x 1 ml), tuloksena 29 mg puhdasta tuotetta (NMR:n mukaan). Kokonaissaanto oli 88 %. Kiteytys DMSO/H_2O-seoksesta antoi 25 mg puhdasta otsikon yhdistettä valkeina mikrokiteinä, sp. 320 322 °C (haj. 315 °C:sta lähtien). IR (KBr, cm^{-1}): 3500, 3162, 3056, 1706, 1606, 1531. NMR (^1H, DMSO-d_6): δ 2,065 (s, 3H), 7,236 (s, 1H), 9,621 (s, 1H), 11,655 (s, 1H), 12,096 (s, 1H). HRMS: laskettu yhdisteelle $C_{10}H_7N_3O_3Cl_2$ (M+) m/z: 286,9863, havaittu: 286,9859. Vahvuus suhteessa DCK:hon: 44 %.

Esimerkki 14

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

A. 4,5-dikloori-6-jodi-2-nitroaniliinin synteesi

Artikkelin Sy, W.W. (*Synthetic Communications* 22(22):3215-19 (1992)) menettelyä sovellettiin. Liuokseen, jossa oli 4,5-dikloori-2-nitroaniliinia (4,14 g, 2,0 mmol, käytettiin sellaisena kuin saatiin) EtOH:ssa (40 ml), lisättiin jodia (521 g, 2,05 mmol, käytettiin sellaisena kuin saatiin) ja Ag_2SO_4:a (622 mg, 2,0 mmol, käytettiin sellaisena kuin saatiin). Seosta sekoitettiin huoneenlämpötilassa päivän ajan (seurattiin TLC:llä), sitten muodostunut keltainen sakka poistettiin suodattamalla. Suodos haihdutettiin kuiviin alipaineessa, tuloksena 600 mg epäpuhdasta 4,5-dikloori-6-jodi-2-nitroaniliinia. Tämä liuotettiin dikloorimetaaniin ja pestiin 5-prosenttisella natriumhydroksidiliuoksella (20 ml) ja sen jälkeen vedellä. Orgaaninen kerros kuivattiin $MgSO_4$:lla ja haihdutettiin kuiviin. Jäännös ajettiin kromatografiassa piidioksidigeelillä ja eluoitiin kloroformilla, tuloksena epäpuhdas tuo-

te. Tämä puhdistettiin preparatiivisella TLC:llä (eluutio kloroformilla), tuloksena puhdas 4,5-dikloori-2-jodi-6-nitroaniliini. (356 mg, 53 %) keltaisena jauheena. NMR (^{1}H, $CDCl_3$): δ 6,940 (s, 2H), 8,378 (s, 1H).

B. 1,2-diamino-4,5-dikloori-6-jodibentseenin synteesi

Sekoituksessa olevaan seokseen, jossa oli 2-nitro-4,5-dikloori-6-jodianiliinia (216 mg, 0,648 mmol) etanolissa (5 ml), lisättiin $SnCl_2.2H_2O$:a (730 mg, 3,24 mmol) yhtenä eränä. Seosta palautusjäähdytettiin 80 °C:n lämpötilassa (öljyhaude 90 °C) sekoittaen 0,5 tuntia kirkkaan liuoksen muodostamiseksi, ja sitten palautusjäähdytystä jatkettiin vielä 0,5 tuntia. Liuos jäähdytettiin huoneenlämpötilaan ja jäävettä (10 g) lisättiin. pH säädettiin pH-arvoon n. 7 $NaHCO_3$:n 5-prosenttisella vesiliuoksella, ja seosta uutettiin etyyliasetaatilla. Uutos kuivattiin $MgSO_4$:lla ja haihdutettiin kuiviin, tuloksena 156 mg (80 %) 1,2-diamino-4,5-dikloori-6-jodibentseeniä ruskeana kiinteänä aineena. NMR (^{1}H, $CDCl_3$): δ 4,954 (s, 2H), 5,162 (s, 2H), 6,722 (s, 1H).

C. 5-jodi-6,7-dikloori-1,4-dihydro-2,3-kinoksaliinidionin synteesi

Artikkelin Foged, C. ja Journal, P. (*J. Of Lab. Compd. and Radiopharmac.* XXXI (5):365-373 (1992)) menettelyä sovellettiin. Sekoituksessa olevaan seokseen, jossa oli 1,2-diamino-4,5-dikloori-6-jodibentseeniä (70 mg, 0,23 mmol) 2 N HCl:ssa (10 ml), lisättiin oksaalihappoa (32 mg, 0,25 mmol, käytettiin sellaisena kuin saatiin) yhtenä eränä. Seosta palautusjäähdytettiin 120-5 °C:n lämpötilassa 3 tuntia, sitten jäähdytettiin huoneenlämpötilaan yli yön. Seos sentrifugoitiin, ja punainen kiinteä aine pestiin kylmällä vedellä (2 x 1 ml), kerättiin talteen suodattamalla ja kuivattiin 60 °C:n lämpötilassa alipaineessa 2 tuntia, tuloksena 60 mg epäpuhdasta otsikon yhdistettä (73 %) punaisena jauheena. Näyte liuotettiin 1 N NaOH:iin (8 ml) ja liukenematon materiaali poistettiin

suodattamalla. Suodos happamoitiin pH-arvoon 6, tuloksena 46 mg otsikon yhdistettä. Kiteytys DMSO/H_2O-seoksesta antoi 19 mg puhdasta yhdistettä (23 %) punaisina mikrokiteinä, sp. 335 - 338 °C (haj. alkoi 330 °C:n lämpötilassa). IR (KBr, cm^{-1}): 3437, 3325, 1750, 1712, 1475, 1393. NMR (^1H, DMSO-d_6): δ 7,273 (s, 1H), 10,282 (s, 1H), 12,038 (s, 1H). HRMS, laskettu yhdisteelle $C_8H_3N_2O_2Cl_2I$ (M +) m/z: 355,8614, havaittu: 355,8603. Vahvuus suhteessa DCK:hon: 152 %.

Esimerkki 15

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

Artikkelin Cheeseman, G.W.H. (*J. Chem. Soc.* 1170 (1962)) menetelmää sovellettiin. 5-jodi-7-kloori-1,4-dihydro-2,3-kinoksaliinidionia (96 mg, 0,33 mmol) liuotettiin väkevään H_2SO_4:oon (1,0 ml) 0 °C:n lämpötilassa 30 minuuttia, ja sitten KNO_3:a (36 mg, 0,36 mmol, Baker) lisättiin tähän liuokseen. Seosta sekoitettiin 0 °C:n lämpötilassa 0,5 tuntia ja sitten huoneenlämpötilassa 30 tuntia. Se kaadettiin jääveteen (5 g). Sakka ilmestyi ja kerättiin talteen suodattamalla, tuloksena 101 mg epäpuhdasta otsikon yhdistettä. Näyte liuotettiin 1 N KOH:iin (5 ml), ja sitten punainen sakka poistettiin suodattamalla. Suodos happamoitiin 4 N HCl:lla pH-arvoon 2, tuloksena ruskea sakka, joka kerättiin talteen suodattamalla ja sitten kuivattiin ilmassa 50 °C:n lämpötilassa 4 tuntia. Otsikon yhdiste (75 mg, 67 %) saatiin ruskeana jauheena. Kiteytys DMSO/H_2O-seoksta antoi puhtaan yhdisteen (34 mg) ruskeina mikrokiteinä, sp. 388 - 390 °C. IR (KBr, cm^{-1}): 3462, 3200, 3050, 1712, 1587, 1537. NMR (^1H, DMSO-d_6): δ 7,289 (s, 1H), 10,846 (s, 1H), 12,225 (s, 1H). HRMS: laskettu yhdisteelle $C_8H_3N_3O_4ClI$ (M+) m/z: 366,8855, havaittu tulossa. Vahvuus suhteessa DCK:hon: osittain aktiivinen.

Esimerkki 16

Sitoutumismääritykset ja eläinmallit, joissa käytetään -1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioneja

Menetelmät

A. 1 μM glysiinillä stimuloitu [^{3}H]-MK801-sitoutumismääritys.

Glysiiniantagonistitehokkuus *in vitro* määritettiin käyttäen 1 μM glysiinillä stimuloitua [3H]-MK801-sitoutumismääritystä. Tässä määrityksessä hyödynnetään sitä, että [3H]-MK801:n sitoutuminen PCP-reseptoriin NMDA-kanavan huokosen sisälle riippuu sekä glutamiinihapon että glysiinin läsnäolosta. Glysiinin puuttuessa mutta glutamiinihapon ollessa läsnä [^{3}H]-MK801 ei pysty sitoutumaan tehokkaasti PCP-reseptoriin, koska NMDA-kanava pysyy suljettuna, ja [^{3}H]-MK801:n pääsy PCP-reseptorille suljetun kanavan huokosen sisään on suuresti vaikeutunut.

Määritys suoritettiin käyttäen rotan aivojen membraanihomogenaatteja, jotka ovat NMDA-reseptorien suhteen rikastuneita. Membraanit valmistettiin seuraavasti. Pakastettuja rotan aivoja (saatiin yhtiöltä Pel-Freez, Rogers, Arkansas) homogenisoitiin 15-kertaiseen tilavuuteen (w/v) jääkylmää 0,32 M sakkaroosia. Homogenaattia lingottiin kiihtyvyydellä 1,000 x g kymmenen minuuttia. Supernatantti kerättiin talteen, ja sitä lingottiin 20 minuuttia kiihtyvyydellä 44,000 x g. Pohjasakka suspensoitiin 15-kertaiseen tilavuuteen vettä (suhteessa alkuperäiseen aivojen painoon). Homogenaattia lingottiin jälleen kiihtyvyydellä 44,000 x g 20 minuuttia. Pohjasakka suspensoitiin uudelleen 5-kertaiseen tilavuuteen vettä, ja suspensio pakastettiin ja sulatettiin kahdesti. Viimeisen sulatuskerran jälkeen suspension tilavuus 15-kertaistettiin vedellä, ja sitä lingottiin kiihtyvyydellä 44,000 x g 20 minuuttia. Pohjasakka suspensoitiin 5-kertaiseen tilavuuteen jääkylmää 10 mM HEPES-puskuria, joka oli titrattu pH-arvoon 7,4 KOH:lla, joka sisälsi 0,04 % Triton X-100:a. Membraaneja inkuboitiin Triton/HEPES-puskurin kanssa 37 °C:n lämpöti-

lassa 15 minuuttia. sitten tilavuus saatettiin 15:ksi jäähkylmällä 10 mM HEPES-puskurilla, pH 7,4, ja lingottiin/pestiin kolmesti sentrifugoiden kiihtyvyydellä 44,000 x g pesujen välillä. Lopullinen pohjasakka suspensoitiin kolminkertaiseen tilavuuteen 50 mM HEPES-puskuria, pH 7,4 ja proteiinikonsentraatio määritettiin tavanomaisella väriaineensitoutumisproteiinimäärityksellä (Bio-Rad, Richmond, CA). Suspensio varastoitiin -80 °C:seen käyttöön asti. Vain HPLC-laatuista vettä käytettiin kaikkiin puskureihin ja suspensioihin/pesuihin. Perusteelliset pesut olivat tarpeen, jotta poistettaisiin endogeenistä glysiiniä membraanipreparaatista niin paljon kuin mahdollista.

Määrityspäivänä aikaisemmin valmistetut membraanit sulatettiin, ja 5 mM Tris/HCl-puskuria, pH 7,4 lisättiin, tuloksena lopullinen proteiinikonsentraatio 0,156 mg/ml. Sitoutumismäärityksiä varten 0,8 ml membraaneja pipetoitiin polypropyleeniputkiin, ja sen jälkeen 0,033 ml 15,1 μM 5,7-dikloorikynureenihappoa (DCK), 0,033 ml 30,3 μM glysiiniä puskurissa (tai pelkkää puskuria), 0,033 ml 303 μM glutamiinihappoa puskurissa (tai kontrolleihin 0,1 ml 1 mM PCP:tä DCK/gly/glu-yhdistelmän sijaan), 0,033 ml glysiiniantagonistia puskurissa (tai pelkkää puskuria) ja 0,1 ml puskuria, joka sisälsi 200 000 cpm [^{3}H]-MK801:tä. Epäspesifinen sitoutuminen määriteltiin erona sitoutumisissa, jotka esiintyivät PCP:n (lopullinen konsentraatio: 100 μM) ollessa poissa tai mukana. 1 μM glysiinin vaikutuksen [^{3}H]-MK801:n sitoutumiseen määrittämiseksi radioaktiivisuus, joka sitoutui pelkän 10 μM glutamiinihapon ollessa läsnä (lopullinen konsentraatio), vähennettiin radioaktiivisuudesta, joka sitoutui sekä 10 μM glutamiinihapon että 1 μM glysiinin (lopullinen konsentraatio) ollessa läsnä. 500 nM konsentraatio (lopullinen) 5,7-dikloorikynureenihappoa (DCK) lisättiin kaikkiin määrityputkiin. Tämä glysiiniantagonistin DCK:n konsentraatio "puskuroi" suurimman osan jäljelle jääneestä endogeenisestä glysiinistä, joka ei ollut lähtenyt perusteel-

lisissa pesuvaiheissa, jotka oli suoritettu membraanien valmistuksen aikana. 500 nM DCK ei haitannut [$_3$H]-MK801:n sitoutumisen stimulaatiota, joka saatiin aikaan lisäämällä 1 μM eksogeeninen glysiini.

Määrityksiä inkuboitiin 120 minuuttia huoneenlämpötilassa, jonka ajan kuluttua membraaneihin sitoutunut radioaktiivisuus erotettiin vapaasta radioaktiivisuudesta imusuodatuksella 0,3-prosenttisella polyetyleeni-imiinillä esikäsiteltyjen Whatman-lasikuitusuodatinten läpi. Suodatus suoritettiin käyttäen Brandelin 48-kuoppaista solujenkeruulaitetta. Suodatetut membraanit pestiin kolmesti joka kerta 3 ml:lla jääkylmää puskuria. Suodattimet siirrettiin tuikeputkiin, ja 5 ml tuikeseosta lisättiin. Putkia ravisteltiin yli yön, ja radioaktiivisuus laskettiin nestetuikespektroskopialla. Määritykset tehtiin kolmena rinnakkaisena, ja kaikki kokeet suoritettiin ainakin kolmesti.

Inhibition annos-vaste -käyrät muodostettiin käyttäen kasvavia glysiiniantagonistikonsentraatiota välillä 5 nM - 330 μM. IC_{50}-arvot määritettiin yhdisteille, jotka olivat aktiivisia inhiboimaan 1 μM glysiinillä stimuloitua [^{3}H]-MK801:n sitoutumista, tietokoneavusteisella inhibitiokäyrien kuvaajanpiirrolla interpolaatiolla. Kun yhdisteiden havaittiin inhiboivan glysiinillä stimuloitua [^{3}H]-MK801:n sitoutumista, suoritettiin kokeita sen määrittämiseksi, oliko glysiinillä stimuloidun [^{3}H]-MK801:n sitoutumisen inhibitio todellakin NMDA-reseptorin glysiininsitoutumiskohdalla välittynyttä. Näissä kokeissa kiinteää antagonistikonsentraatiota, joka oli riittävä tuottamaan yli 95-prosenttisen inhibition 1 μM glysiinillä stimuloidulle [^{3}H]-MK801:n sitoutumiselle, inkuboitiin membraanien kanssa glysiiniä lisäämättä (1 μM lisäksi) ja kasvavien lisätyn glysiinin konsentraatioiden (2 μM - 1 μM) ollessa läsnä. Jos [^{3}H]-MK801:n sitoutumisen lääkeaineen vaikutuksesta johtuva inhibitio 1 mM glysiinin läsnäollessa palautui täysin lisäämällä kasvavia konsentraatioita glysiiniä, niin [^{3}H]-MK801:n sitoutumisen lääkeaineen vaikutuksesta

johtuvaa inhibitiota välitti lääkeaine, joka toimi antagonistina NMDA-reseptorin glysiininsitoutumiskohdassa.

Inhibition annos-vaste -käyrien muodostamisen ja glysiinillä palautuvuuden määrittämisen jälkeen laskettiin K_i-arvot glysiiniantagonisteille käyttäen Chengin ja Prusoffin yhtälöä, jossa käytettiin kokeellisesti määritettyjä IC_{50}-arvoja, glysiinin tunnettua konsentraatiota määrityksessä (1 μM) ja glysiinin tunnettua affiniteettia NMDA-reseptorin glysiininsitoutumiskohtaan (100 nM).

B. [^{3}H]-AMPA:n radioligandisitoutumismääritys

Samoja rotan aivomembraanihomogenaatteja, joita käytettiin 1 μM glysiinillä stimuloidussa [^{3}H]-MK801:n sitoutumismäärityksessä, käytettiin tähän määritykseen. Määrityspäivänä pakastetut membraanit (edellä kuvatun mukaisesti valmistetut) sulatettiin ja laimennettiin 30 mM Tris/HCl-puskurilla, joka sisälsi 2,5 mM $CaCl_2$ ja 100 mM KSCN, pH 7,4, jolloin saatiin lopullinen membraanikonsentraatio 1,25 mg membraaniproteiinia /ml. Sitoutumismääritystä varten 0,8 ml membraanihomogenaattia lisättiin polypropyleeniputkiin ja sen jälkeen 0,033 ml lääkeainetta ja 0,067 ml puskuria (tai kontrolleihin 0,1 ml pelkkää puskuria) ja 0,1 ml puskuria, joka sisälsi 200 000 cpm [^{3}H]-AMPA:a. Määritystä inkuboitiin 30 minuuttia jäillä. Sitoutunut radioaktiivisuus erotettiin vapaasta radioaktiivisuudesta suodattamalla 0,3-prosenttisella polyetyleeni-imiinillä esikäsiteltyjen Whatman-lasikuitusuodatinten läpi käyttäen Brandelin 48-kuoppaista solujenkeruulaitetta.

Suodatetut membraanit pestiin kolmesti joka kerta 3 ml:lla jääkylmää puskuria. Suodattimet siirrettiin tuikeputkiin, ja 5 ml tuikeseosta lisättiin. Putkia ravisteltiin yli yön, ja radioaktiivisuus laskettiin nestetuikespektroskopialla. Epäspesifinen sitoutuminen määritettiin radioaktiivisuudesta, joka jäi membraaneihin sitoutuneeksi 10 mM glutamiinihapon ollessa läsnä. Inhibition annos-vaste -käyrät muodostettiin lisäämällä kasvavia lääkeainekonsentraatiota välillä 10 nM - 100 μM.

C. [^{3}H]-kainaatin radioligandisitoutumismääritys

Samaa membraanipreparaattia, jota käytettiin [^{3}H]-AMPA:n sitoutumismääritykseen, käytettiin. Määrityspäivänä pakastetut rotan aivomembraanit sulatettiin, ja 5 mM Tris/HCl-puskuria, pH 7,4 lisättiin, tuloksena lopullinen konsentraatio 0,5 mg/ml membraaniproteiinia. Sitoutumismääritystä varten 0,8 ml membraanihomogenaattia lisättiin polypropyleeniputkiin ja sen jälkeen 0,033 ml lääkeainetta ja 0,067 ml puskuria (tai kontrolleihin 0,1 ml pelkkää puskuria) ja 0,1 ml puskuria, joka sisälsi 200 000 cpm [^{3}H]-kainaattia. Määritystä inkuboitiin 2 tuntia jäillä. Sitoutunut radioaktiivisuus erotettiin vapaasta radioaktiivisuudesta suodattamalla 0,3-prosenttisella polyetyleeni-imiinillä esikäsiteltyjen Whatman-lasikuitusuodatinten läpi käyttäen Brandelin 48-kuoppaista solujenkeruulaitetta. Suodatetut membraanit pestiin kolmesti joka kerta 3 ml:lla jääkylmää puskuria. Suodattimet siirrettiin tuikeputkiin, ja 5 ml tuikeseosta lisättiin. Putkia ravisteltiin yli yön, ja radioaktiivisuus laskettiin nestetuikespektroskopialla. Epäspesifinen sitoutuminen määritettiin radioaktiivisuudesta, joka jäi membraaneihin sitoutuneeksi 10 mM glutamiinihapon ollessa läsnä. Inhibition annosvaste -käyrät muodostettiin lisäämällä kasvavia lääkeainekonsentraatiota välillä 250 nM - 330 μM.

D. Glysiiniantagonistien tehon arviointi glutamiinihapon neurotoksisuuden inhibitiossa rotan aivokuoren neuronien soluviljelysystemissä

Eksitotoksisuusmallia, joka oli muunnettu seuraten Choin kehittämää (Choi, D.W., *J. Neuroscience* 7:357 (1987)), käytettiin uusien glysiiniantagonistien eksitotoksisuuden estotehon testaamiseksi. Sikiöitä alkionkehityspäivältä 19 poistettiin samanaikaisesti pariutetuista raskaana olevista rotista. Sikiöistä poistettiin aivot, ja aivokuori leikeltiin erilleen. Irtileikellyn aivokuoren solut dissosioitiin mekaanisen liikuttamisen ja entsyymidigestion yhdistelmällä Landonin ja Robbinsin menetelmän

(*Methods in Enzymology* 124:412 (1986)) mukaisesti. Irrotetut solut vietiin 80 μm nitex-seulan läpi, ja solujen elävyys arvioitiin Trypan Blue -väriaineella. Solut maljattiin poly-D-lysiinillä pinnoitetuille maljoille, ja niitä inkuboitiin 37 °C:n lämpötilassa ilmakehässä, joka sisälsi 91 % O_2/9 % CO_2. Kuusi päivää myöhemmiin lisättiin fluorid-urasiiliä kahden päivän ajaksi muiden kuin hermosolujen kasvun tukahduttamiseksi. Viljelyn päivänä 12 neuronien primaariviljelmät altistettiin 100 μM glutamiinihapolle 5 minuutiksi siten, että mukana oli tai ei ollut lisääntyviä annoksia glysiiniantagonisteja tai muita lääkeaineita. Viiden minuutin kuluttua viljelmät pestiin ja inkuboitiin 24 tuntia 37 °C:n lämpötilassa. Neuronisolujen vauriot kvantitoitiin mittaamalla laktaattidehydrogenaasiaktiivisuutta (LDH-aktiivisuutta), joka oli vapautunut elatusaineeseen. LDH-aktiivisuus mitattiin Deckerin ym. menetelmän mukaisesti (Decker ym., *J. Immunol. Methods* 15:16 (1988)).

E. Glysiiniantagonistien kouristuksenestäjäaktiivisuuden arviointi DBA-2-hiirten audiogeenisten epilepsiakohtausten mallissa

DBA-2-hiiret saatiin yhtiöltä Jackson Laboratories, Bar Harbor, Maine. Kaikki nämä hiiret kehittävät 27 päivän ikäisinä toonisen epilepsiakohtauksen 5 - 10 sekunnin sisällä ja kuolevat, kun ne altistetaan 14 kHz:n äänelle (siniaalto) 110 dB voimakkuudella (Lonsdale, D., *Dev. Pharmacol. Ther.* 4:28 (1982)). Epilepsiakohtaukselta suojaaminen määriteltiin, kun eläimet, joihin injektoitiin lääkeainetta 30 minuuttia ennen äänelle altistusta, eivät kehittäneet epilepsiakohtausta ja eivät kuolleet 1 minuutin äänelle altistuksen aikana. 21 päivän vanhoja DBA-2-hiiriä käytettiin kaikkiin kokeisiin. Yhdisteet annettiin aina intraperitoneaalisesti joko suolaliuoksessa, DMSO:ssa tai polyetyleeniglykoli 400:ssa. Asiaankuuluvat liuotinkontrollit sisällytettiin aina jokaiseen kokeeseen. Annos-vaste -käyrät muodostettiin antamalla kasvavia annoksia

lääkeainetta 1 mg/kg - 100 mg/kg. Kukin annosryhmä (tai liuotinkontrolli) koostui ainakin kuudesta eläimestä.

F. Uusien lääkeaineiden kouristuksenestäjäaktiivisuuden arviointi pentyleenitetratsolilla (PTZ) indusoitujen epilepsiakohtauste testissä

Swiss/Webster-hiiret kehittävän minimaalisen, noin 5 sekunnin pituisen kloonisen epilepsiakohtauksen, 5-15 minuuttia lääkeaineinjektion jälkeen, kun niihin on injektoitu PTZ:a 50 mg/kg (i.p.). Glysiiniantagonistilääkeaineen (tai muun lääkeaineen) kouristuksenestoteho määriteltiin epilepsiakohtauksen poissapysymisenä, kun lääkeainetta annettiin 30 minuuttia ennen PTZ:n antoa, ja kun epilepsiakohtausta ei kehittynyt 45 minuuttiin mennessä PTZ:n antamisen jälkeen. Glysiiniantagonisti tai muut lääkeaineet annettiin aina intraperitoneaalisesti joko suolaliuoksessa, DMSO:ssa tai polyetyleeniglykoli 400:ssa. Asiaankuuluvat liuotinkontrollit sisällytettiin aina jokaiseen kokeeseen. Annos-vaste -käyrät muodostettiin antamalla kasvavia annoksia lääkeainetta 1 mg/kg - 100 mg/kg. Kukin annosryhmä (tai liuotinkontrolli) koostui ainakin kuudesta eläimestä.

G. Glysiiniantagonistien tehon arviointi suojattaessa hiiriä NMDA:n indusoimalta kuolemalta

Kun hiiriin injektoidaan 200 mg/kg N-metyyli-D-asparagiinihappoa (NMDA) i.p., eläimille kehittyy epilepsiakohtauksia, joita seuraa kuolema 5 - 10 minuutin kuluessa. Glysiiniantagonisteilta testattiin niiden kyky estää NMDA:n indusoima kuolema antamalla lääkeaineita i.p. 30 minuuttia ennen NMDA:n antamista. Glysiiniantagonisti tai muut lääkeaineet annettiin aina intraperitoneaalisesti joko suolaliuoksessa, DMSO:ssa tai polyetyleeniglykoli 400:ssa. Asiaankuuluvat liuotinkontrollit sisällytettiin aina jokaiseen kokeeseen. Annos-vaste -käyrät muodostettiin antamalla kasvavia annoksia lääkeainetta 1 mg/kg - 100 mg/kg. Kukin annosryhmä (tai liuotinkontrolli) koostui ainakin kuudesta eläimestä.

H. Ataksiasivuvaikutusten arviointi hiirissä "rotorod"-juoksupyöräataksiatestillä

Motorisen koordinaatiokyvyn menetyksen aste arvioitiin käyttäen tavanomaista hiirten "rotorod"-juoksupyörää (Hugo Basile, Varese, Italia). Hiiret totutetaan juoksupyörään laittamalla ne siihen ennen varsinaista koetta. Normaali motorinen koordinaatiokyky määritellään kunkin hiiren kykynä pysyä "rotorodissa" yhtämittaisesti mielivaltaisesti määritelty aika (1 minuutti). Tämä toimii perustana arvioitaessa kunkin lääkeaineen vaikutus motorisen koordinaatiokyvyn menetykseen. Ks. Dar, M.S., *J. Pharm. Pharmacol.* 40:482-487 (1988), Dar, M.S ym., *Life Sci.* 33: 1363-1374 (1983), ja Dar ja Wooles, *Life Sci.* 39: 1429-1437 (1986). Hiiriin injektoitiin joko vehikkeliä (DMSO), 6,7-dikloori-5-nitro-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dionia tai 6,7-dibromi-5-nitro-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dionia liuotettuna DMSO:hon annoksilla 1 - 300 mg/kg (i.p., 6 eläintä per lääkeaineannos tai vehikkelikontrolli). 30 minuuttia injektion jälkeen hiiret pantiin "rotorod"-juoksupyörään. Juoksupyörä toimi nopeudella 6 kierrosta minuutissa. Eläimillä, jotka kykenivät pysymään juoksupyörässä 60 sekuntia, ei katsottu olevat merkitsevää motorisen koordinatiokyvyn menetystä. Termiä toksinen annos$_{50}$ (TD_{50}) käytettiin siitä lääkeaineannoksesta, jolla 50 % eläimistä putosi "rotorod"-juoksupyörästä alle 60 sekunnissa.

Tulokset

Taulukko II esittää tulokset sitoutumismäärityksistä glysiininsitoutumiskohtaan, kainaatti- ja AMPA-reseptoreihin 6,7-dikloori-5-nitro-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dionilla (nro 1) ja 5-kloori-7-trifluorimetyyli-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dionilla (nro 2; ei keksinnön mukainen yhdiste).

Taulukko II

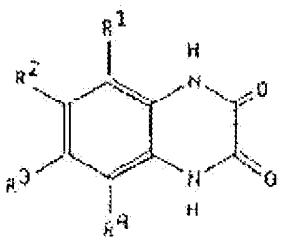
Lääkeaine	$K_{i(glysiini)}$ (μM)		$K_{i(AMPA)}$ (μM)	$K_{i(kainaatti)}$ (μM)
	Rotta	Marsu		
nro 1	0,008	-	20	92
nro 2	0,8	0,4	21	218
nro 13	0,006	-	3	20

Taulukko III esittää tulokset *in vivo* -kouristuksenestoeläinmalleista, joissa käytettiin yhdisteitä nro 1, nro 2 ja nro 13 (kuuloärsykkeen laukaisemat epilepsiakohtaukset DBA-2-hiirissä, pentyleenitetratsolilla indusoidut epilepsiakohtaukset Swiss/Webster-hiirissä ja NMDA:n indusoimat epilepsiakohtaukset/kuolema Swiss/Webster-hiirissä).

Taulukko III

Lääkeaine (mg/kg)	ED_{50}/DBA (mg/kg) (i.p.)	ED_{50}/PTZ (mg/kg) (i.p..)	ED_{50}/NMDA (i.p.)
nro 1	5	ei aktiivinen	20
nro 2	17	17	ei aktiivinen
nro 13	10	-	-

Taulukko IV esittää sitoutumistulokset, *in vivo* -kouristuksenestoeläinmallin tulokset ja neuroprotektiivisen tehon testin (*in vitro*) tulokset muille 1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioneille:



Taulukossa IV yhdisteet 2, 4, 5 ja 8 - 12 eivät ole keksinnön mukaisia yhdisteitä.

Taulukko IV

Lääke-aine	R1	R2	R3	R4	$K_{i(GR)}$ (μM)	$K_{i(AMP)}$ (μM)	$K_{i(Ca)}$ (μM)	ED_{50} (DBA-2) mg/kg	IC_{50} soluvilj. (μM)
#1	NO_2	Cl	Cl	H	0,008	20	92	5	0,3
#2	Cl	H	CF_3	H	0,8/ 0,4	21	218	17	15
#3	Cl	NO_2	CF_3	H	0,2	2,2	35	inaktiivinen	n.t.
#4	Cl	H	CF_3	NO_2	0,4	2,2	35	inaktiivinen	n.t.
#5*	Cl	H	Cl	H	1	34	148	9	12
#6	Cl	F	F	H	2,3	84	200	n.t.	inaktiivinen
#7	Br	F	F	H	2,5	>330	44	30	27
#8	F	F	F	F	2,8	92	>330	9	29
#9*	Cl	H	F	H	9	>330	225	14	38
#10	Br	H	Br	H	9	46	130	30	22
#11	Br	H	CF_3	H	12	26	55	70	13
#12*	Br	H	F	H	16	290	196	21	12
#13	NO_2	Br	Br	H	0,006	3	22	10	0,3

*Vastaavat 6,7-isomeerit ovat inaktiivisia kouristuksenestäjinä *in vivo*, ja siksi ne eivät tunkeudu veri-aivoesteen läpi.

Taulukko V esittää tulokset *in vitro* -määrityksestä, jossa käytetään eksitotoksisuusmallia, johon kuuluu aivosoluviljelmiä, joka osoittaa, että yhdisteet nro 1 ja nro 2 estävät hermosolujen kuolemista.

Taulukko V

Lääkeaine	IC_{50} (µM)
nro 1	0,3
nro 2	15
nro 13	0,3

Esimerkki 17

5-kloori-7-trifluorimetyyli-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dionin (ei keksinnön mukainen yhdiste), 6,7-dikloori-5-nitro-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dionin ja 6,7-dibromi-5-nitro-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dionin vaikutukset krooniseen kipuun

Tiedetään, että NMDA-reseptorit ovat kriittisesti mukana hermo- ja kudosvammaa seuraavan jatkuvan kivun kehittymisessä. Kudosvamman, kuten sellaisen, joka aiheutuu pienen formaliinimäärän ihonalaisesta injektiosta koe-eläimen takatassuun, on osoitettu tuottavan välittömän glutamiinihapon ja asparagiinihapon lisääntymisen selkäytimessä (Skilling, S.R ym., *J. Neurosci.* 10: 1309-1318 (1990)). NMDA-reseptorin estäjien antaminen vähentää selkäytimien takasarven neuronien vastetta formaliini-injektion jälkeen (Dickenson ja Aydar, *Neuroscience Lett.* 121:263-266 (1991), Haley, J.E. ym., *Brain Res.* 518:218-226 (1990)). Nämä takasarven neuronit ovat kriittisiä kipusignaalin välittymiselle selkäytimestä aivoihin, ja näiden neuronien vähentynyt vaste indikoi aistitun kivun vähenemistä koe-eläimellä, jolle kipu on aiheutettu ihonalaisella formaliini-injektiolla.

Koska on havaittu, että NMDA-reseptorin antagonistit voivat estää ihonalaisen formaliini-injektion indusoiman takasarven neuronivasteen, NMDA-reseptorin antagonisteilla on potentiaalia kroonisen kivun hoitoon, kuten kivun, joka aiheutuu leikkauksesta tai amputaatiosta (haamukipu) tai muiden haavojen saamisesta (haavakipu). Kuitenkin tavanomaisten NMDA-antagonistien, kuten MK801:n tai CGS 19 755:n, käyttöä kroonisen kivun estämisessä tai hoitami-

sessa rajoittavat vakavasti haitalliset PCP:n kaltaiset käyttäytymissivuvaikutukset, joita nämä lääkeaineet aiheuttavat. On havaittu, että 1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioniin perustuvat NMDA-reseptorin glysiininsitoutumiskohdan antagonistit, joihin tämä keksintö kohdistuu, ovat erittäin tehokkaita estämään hiirissä kroonista kipua, joka on indusoitu injektoimalla formaliinia eläimille ihonalaisesti takatassuun. Koska tämän keksinnön mukaisilla 1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioniin perustuvilla glysiiniantagonisteilla ei ole PCP:n kaltaisia sivuvaikutuksia, nämä lääkeaineet ovat erittäin hyödyllisiä estettäessä tai hoidettaessa kroonista kipua aiheuttamatta PCP:n kaltaisia haitallisia käyttäytymissivuvaikutuksia.

Swiss/Webster-uroshiiriä, painoltaan 25 - 35 g, pidettiin viiden hiiren häkeissä, joissa oli vapaa pääsy ruoalle ja vedelle, ja niillä pidettiin 12 tunnin valojaksoa (valon alku klo 8.00 (0800h)) 5-kloori-7-trifluorimetyyli-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dionia (1 - 40 mg/ml), 6,7-dikloori-5-nitro-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dionia (5 - 40 mg/ml) tai 6,7-dibromi-5-nitro-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dionia (1 - 40 mg/ml) liuotettiin DMSO:hon. DMSO:ta käytettiin vehikkelikontrollina. Kaikki lääkeaineet injektoitiin intraperitoneaalisesti (1 µl/g). Formaliinitesti suoritettiin kuvatun mukaisesti (Dubuisson ja Dennis, *Pain* 4:H161-174 (1977)). Hiiriä tarkkailtiin pleksilasilieriössä, 25 cm halkaisijaltaan ja 30 cm korkeudeltaan. Toisen takatassun jalkapohjaan injektoitiin ihonalaisesti 20 µl 5-prosenttista formaliinia. Kivun aste määritettiin mittaamalla, kuinka kauan aikaa eläin kulutti nuolemalla formaliini-injektoitua tassua seuraavien aikavälien aikana: 0 - 5 minuuttia (varhaisvaihe), 5 - 10 minuuttia, 10 - 15 minuuttia ja 15 - 50 minuuttia (myöhäisvaihe). Sen testaamiseksi, estivätkö nämä kaksi glysiiniantagonistia kroonista kipua koe-eläimissä, vehikkeliä (DMSO) tai lääkeaineita liuotettuina vehikkeliin annoksina 1 - 40 mg/kg injektoitiin intraperitoneaalisesti 30 minuuttia ennen formaliini-

injektiota. Kutakin lääkeaineannosta tai vehikkelikontrollia varten käytettiin ainakin kuusi eläintä.

Kuviosta 1 nähdään, että verrattuna vehikkelikontrolliin intraperitoneaalinen injektio 6,7-dikloori-5-nitro-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dionia myös inhiboi formaliinin indusoimaa kipua sen perusteella, miten eläimen formaliini-injektoitua takatassua nuollessa kuluttama aika väheni. 6,7-dikloori-5-nitro-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni inhiboi formaliinin indusoimaa nuolemista annoksilla 5 - 40 mg/kg myöhäisvaiheissa, kun taas varhaisvaihetta inhiboivat annokset 10 - 40 mg/kg. 6,7-dibromi-5-nitro-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dionilla nähtiin ED_{50}-arvo 5 mg/kg estettäessä formaliinin indusoimaa kipu hiiressä.

Kuten kuvioista 2A ja 2B nähdään, 6,7-dibromi-5-nitrodihydrokinoksaliini-2,3-dioni inhiboi formaliinin indusoimaa nuolemista annosriippuvalla tavalla sekä kipuvasteen (nuoleminen) varhaisvaiheessa (0 - 5 minuuttia, kuvio 2A) että kivun nuolemisvasteen myöhäisvaiheessa (15 - 50 minuuttia, kuvio 2B), mikä viittaa voimakkaaseen kivuntunteen poistotehoon tässä kroonisen kivun eläinmallissa.

Nämä tulokset osoittavat, että 5-kloori-7-trifluorimetyyli-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni, 6,7-dikloori-5-nitro-1,4-dihydrokinoksaliinidioni ja 6,7-dibromi-5-nitro-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni ovat tehokkaita hoidettaessa ihonalaisen formaliini-injektion indusoimaa kroonista kipua. Koska molemmat yhdisteet ovat NMDA-reseptorin glysiinikohdan antagonisteja, tulokset viittaavat siihen, että NMDA-reseptorin glysiinikohdan estäminen glysiiniantagonisteilla edustaa uutta menetelmää kroonisen kivun hoitamiseen nisäkkäässä. Koska tämän keksinnön mukaisilla glysiiniantagonisteilla ei ole haitallisia käyttäytymissivuvaikutuksia (PCP:n kaltaisia), jotka ovat yleisiä muilla NMDA-reseptorin estäjillä, tämä keksintö tuo käytettäväksi uuden ja huomattavasti parannetun menetelmän kroonisen kivun hoitamiseksi nisäkkäissä, mukaan luettuna (ja edullisesti) ihmiset.

Esimerkki 18

1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dionien koliinisuolojen liukoisuus verrattuna kaliumsuoloihin

5-kloori-7-trifluorimetyyli-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni (ei keksinnön mukainen yhdiste) on liukenematon veteen, mutta liukenee 4 ekvivalentin KOH:a (tai 5 ekvivalentin NaOH:a) ollessa läsnä. Liuoksen pH on 12,7, Tämä suola pysyy liukoisena, kun pH alennetaan arvoon 11,9 lisäämällä 1 ekvivalentti etikkahappoa. Vielä yhden ekvivalentin etikkahappoa lisääminen saa sakan muodostumaan. pH-arvoon 11 mennessä saostuminen on olennaisesti täydellinen.

Spektroskooppiset havainnot (300 MHz ^{1}H-NMR, FTIR) ja sulamispistemääritykset viittaavat siihen, että pH-sakka on 5-kloori-7-trifluorimetyyli-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dionin mono-K- tai mono-Na^+-suola, mikä viittaa siihen, että monosuolat ovat melko liukenemattomia veteen.

Odottamatta keksittiin, että 5-kloori-7-trifluorimetyyli-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni voidaan vaivatta liuottaa yhteen tai kahteen ekvivalenttiin koliinihydroksidia. Kun 5-kloori-7-trifluorimetyyli-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni liuotetaan yhteen ekvivalenttiin koliinihydroksidia ja sen jälkeen lisätään etikkahappoa, sakkaa ei muodostu ennen kuin pH:ssa 9,4. Siten 5-kloori-7-trifluorimetyyli-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dionin liuottaminen yhteen ekvivalenttiin koliinihydroksidia johtaa monokoliinisuolaan, joka toisin kuin natrium- ja kaliumsuolat, on melko liukoinen veteen. Katso kuvio 3.

Monokoliinisuola eristettiin lyofilisoimalla liuos. Saatiin ruskehtava, kuiva jauhe. Vettä voidaan lisätä, jolloin saadaan liukoinen liuos, jossa on 90 mg/1 ml vettä. Jauhe liukeni välittömästi veteen antaen kirkkaan, ruskehtavan liuoksen. Siten 5-kloori-7-trifluorimetyyli-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dionin monokoliinisuola voidaan eristää puhtaana.

Toisessa kokeessa määritettiin, että keksinnön mukaisesti valmistettava 6,7-dikloori-5-nitro-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dionin monokoliinisuola on myös erittäin vesiliukoinen. Sen jälkeen, kun tämä yhdiste on liuotettu yhteen ekvivalenttiin koliinihydroksidia, etikkahapon lisäys ei aiheuta saostumista ennen kuin pH tulee arvoon noin 8.

Siten voidaan valmistaa kinoksaliinidionien erittäin vesiliukoisia ammoniumsuoloja. Koska vesiliukoisuus on edellytys terapeuttiselle käytölle ihmisessä, tämä keksintö edustaa merkittävää edistysaskelta alalla.

Esimerkki 19

5-nitro-6,7-dikloori-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dionin formulaatio Trisissä ("Tromethamine")

5-nitro-6,7-dikloori-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dionin 5 mg/ml sisältävä liuos valmistettiin liuottamalla 5-nitro-6,7-kinoksaliini-2,3-dionia vesiliuokseen, joka sisälsi 10 % polyetyleeniglykoli 400:aa (PEG-400:aa), 0,45 % Tween-80:tä ja 0,18 M Trisiä ("Tromethamine"), niin, että saatiin lopullinen konsentraatio 5 mg/ml 5-nitro-6,7-dikloori-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dionia. 5-nitro-6,7-dikloori-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni liukeni vaivatta tähän formulaatioon. Liuos steriloitiin autoklavoimalla ja sen havaittiin olevan stabiili ainakin kaksi kuukautta. Tämän liuoksen odotetaan olevan stabiili ainakin 1 - 2 vuotta. 5-nitro-6,7-dikloori-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dionin 10 mg/ml sisältävä liuos valmistettiin liuottamalla yhdiste liuokseen, joka sisälsi 50 % PEG-400:a, 0,5 % Tween-80:ä ja 0,1 M Trisiä ("Tromethamine"). 5-nitro-6,7-dikloori-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni liukeni vaivatta tähän liuokseen lämmittämällä 60 - 100 °C:seen. Liuos autoklavoitiin ja sen havaittiin olevan stabiili ainakin 2 kuukautta. Tämän liuoksen odotetaan olevan stabiili ainakin 1 - 2 vuotta. 5-nitro-6,7-dikloori-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dionin 5 mg/ml sisältävä liuos valmistettiin myös ilman PEG-400:aa liuottamalla yhdiste liuokseen, joka sisälsi 0,05 M Trisiä ("Tromethamine"), 0,5 % Tween-80:tä ja 5 % glukoosia. Liuos

steriloitiin ja sen havaittiin olevan stabiili ainakin kaksi kuukautta. Tämän liuoksen odotetaan olevan stabiili ainakin 1 - 2 vuotta.

Esimerkki 20

PCP:n diskriminaatio rotissa 5-kloori-7-trifluorimetyyli-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dionista (ei keksinnön mukainen yhdiste) ja 5-nitro-6,7-dikloori-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dionista

Fensyklidiini (PCP) on huomattava väärinkäytetty lääkeaine, ja se tuottaa häiritsevän päihtymyksen otettaessa edes pienempinä kuin anesteettisina annoksina (Balster, R. L., "The behavioral pharmacology of phencyclidine", teoksessa *Psychopharmacology: The Third Generation of Progress*, Meltzer, H.Y., toim., Raven Press, New York, s. 1573-1579 (1987)). On kehitetty eläinmalli, jolla voidaan ennustaa lääkeaineiden kykyä tuottaa PCP:n kaltaista päihtymystä ihmisissä. Mallissa käytetään lääkeaineiden diskriminatioon harjoittamisen menetelmiä PCP-päihtymyksen havaitsemisen opettamiseksi eläimille. Rottien, jotka on harjoitettu painamaan vipua lisäruoan saamiseksi, täytyy joka päivä valita, kumpi häkissä olevista kahdesta vivusta on oikea. Ainoat ärsykkeet, jotka ne saavat oikean vivun valitsemiseksi, on niiden kyky havaita, saivatko ne PCP- vai vehikkeliinjektion. Noin kahden kuukauden harjoittamisen jälkeen rotista tulee erittäin hyviä erottamaan PCP vehikkeliinjektioista ja sitten niitä voidaan testata muilla lääkeaineilla sen määrittämiseksi, tunnistetaanko ne PCP:ksi.

Tällä menettelyllä testattaessa muut lääkeaineet, joiden tiedetään tuottavan PCP:n kaltaisen päihtymyksen, toimivat PCP:n paikalla. Näihin lääkeaineisiin kuuluvat erilaiset PCP-analogit, kuten ketamiini, sigma-agonistilääkeaine N-allyylinormetatsosiini ja 1,3-substituoidut dioksolaani, deksoksadroli ja etoksadroli (Brady ym. *Pharm. Biochem. Behav.* 17:291-295 (1982), Brady ym., *Science* 212:178-180 (1982), Brady ym., *J. Pharm. Exp. Ther.* 220:56-62 (1982), Slifer ja Balster, *Subst. Alcohol Actions/Misuse*

5:273-280 (1984), Balster ja Willetts, "Receptor mediation of the discriminative stimulus properties of phencyclidine and sigma-opioid agonists", teoksessa *Transduction Mechanisms of Drug Stimuli*, Colpaert ja Balster, toim., Springer-Verlag, Berlin, s. 122-135 (1988)).

Tätä tutkimusta varten rottia, joita oli harjoitettu erottamaan 2 mg/kg PCP:tä suolaliuosvehikkelistä, testattiin 5-kloori-7-trifluorimetyyli-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dionilla ja 5-nitro-6,7-dikloori-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dionilla. Kunkin yhdisteen annosalue valittiin huolellisesti sen varmistamiseksi, että testattiin riittävän korkeaa annosta vaikutusten tuottamiseksi aivoihin ja käyttäytymiseen.

Menetelmät

Koe-eläimet olivat kuusi aikuista Sprague-Dawley urosrottaa (COBS CD, Charles River Farms, Wilmington, Delaware), joita pidettiin erillisissä häkeissä ja ruokaa annettiin rajoitetusti.

Laitteet. Koejaksot suoritettiin kaupallisissa 2-vipuisissa rotan operoimissa kammioissa, jotka olivat ääntä ja valoa vaimentavien kuorten sisällä. Kammiot oli varustettu 45 mg:n ruokarakeille tarkoitetuilla annostelulaiteilla. Ärsykevalo osoitti, milloin koejaksot olivat käynnissä.

Harjoitus. Ennen tämän kokeen alkamista rotat oli harjoitettu painamaan vipua ruokapalkinnon saamiseksi 32 painalluksen aikataululla päivittäisten (maanantaista perjantaihin) 30 minuutin jaksojen aikana. Harjoitusjaksoissa vain toiseen vipuun vastaamista vahvistettiin, väärään vipuun vastaaminen piti edelleen voimassa 32:n oikean valinnan vaatimuksen. Harjoituksen aikana kumpikin vipu oli liitetty joko 2 mg/kg PCP-injektioon tai suolaliuosinjektioon. Kahta PCP-harjoitusjaksoa seurasi kaksi suolaliuosharjoitusjaksoa. Harjoittamista jatkettiin, kunnes koe-eläimet alkoivat jokaisen koejakson oikealla vivulla neljässä pe-

räkkäisessä jaksossa. Harjoittamisen tultua valmiiksi (2 - 3 kuukautta), koevaihe alkoi.

Testaus. Vertautumistestit suoritettiin kahdesti viikossa (tiistaisin ja perjantaisin). Koejaksojen välillä eläimiä harjoitettiin edelleen PCP- ja suolaliuosinjektioilla. Testit suoritettiin, jos edellisellä harjoitusjaksolla eläinten ensimmäinen 32 painalluksen sarja oli oikealla vivulla ja vastausten kokonaismäärästä oli yli 85 % oikealla vivulla. Koejaksoissa molempiin vipuihin vastaaminen palkittiin. Testit annoksella 2,0 mg/kg PCP:tä ja suolaliuoksella suoritettiin jokaisen annos-vaikutus -käyrän määrityksen alussa. Testit suoritettiin PCP:llä (0,5, 1,0, 2,0, 4,0, ja 8,0 mg/kg), 5-kloori-7-trifluorimetyyli-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dionilla (6,0, 12,5 ja 25 mg/kg) ja 5-nitro-6,7-dikloori-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dionilla (2,0, 4,0, 6,0, 8,0, ja 16,0 mg/kg). Myös testit annoksella 0,5 ml/kg DMSO-vehikkeliä suoritettiin ennen testausta 5-kloori-7-trifluorimetyyli-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dionilla ja 5-nitro-6,7-dikloori-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dionilla.

Lääkeaineet. Fensyklidiini-HCl saatiin laitoksesta National Institute on Drug Abuse. Se liuotettiin suolaliuokseen ja annettiin annoksella 1,0 ml/kg i.p. 15 minuuttia ennen harjoitus- ja koejaksoja. Annokset viittaavat HCl-suolaan. 5-kloori-7-trifluorimetyyli-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni ja 5-nitro-6,7-dikloori-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni liuotettiin DMSO:hon siten, että injektiotilavuus kaikille annoksille oli 0,5 ml/kg. Sekä 5-kloori-7-trifluorimetyyli-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni että 5-nitro-6,7-dikloori-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni injektoitiin i.p. 40 minuuttia ennen koejaksoja.

Tulosten analysointi. Testattavan lääkeaineen samankaltaisuusaste 2,0 mg/kg PCP:n kanssa heijastuu PCP-vipuvastausten keskimääräiseen prosenttiosuuteen. Epäspesifiset vaikutukset käyttäytymiseen paljastuvat eroissa, jotka nähdään keskimääräisissä vastausnopeuksissa suolaliuos-

kontrollitesteihin verrattuna. Kun vastausnopeudet korkeilla lääkeaineannoksilla laskivat alle 0,05/sekunti, PCP-vipuun vastaamisen prosenttiosuutta kyseisellä koe-eläimellä siinä kokeessa ei otettu mukaan ryhmän keskiarvoon. Tämä tehtiin, koska on vaikea tulkita vipujen valitsemistuloksia, kun koe-eläimet ovat erittäin heikossa kunnossa.

Tulokset

Sekä 5-kloori-7-trifluorimetyyli-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dionin että 5-nitro-6,7-dikloori-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dionin tulokset nähdään kuvioissa 4A ja 4B. Kuvioiden vasemmissa puolissa ovat tulokset kontrollitesteistä annoksilla 1,0 ml/kg suolaliuosta, 2 mg/kg PCP:tä ja 0,5 ml/kg DMSO:ta. Sekä suolaliuos että DMSO tuottivat 0 % PCP-vipuun vastaamista joka kerta, kun niitä testattiin (ylempi osakuva). PCP, kun sitä testattiin ennen kutakin annos-vaste -käyrämääritystä, antoi 100 % PCP-vipuun vastauksia. Tämä johdonmukainen tarkkuus on tyypillinen tälle diskriminaatiomenettelylle. Vastausnopeudet suolaliuoksen, PCP:n ja DMSO:n jälkeen (alempi osakuva) ovat jonkin verran vaihtelevampia, mutta PCP:llä tai DMSO:lla ei kummallakaan ollut selvää vaikutusta tuottaa suolaliuoskontrollitesteistä poikkeavia vastausnopeuksia.

Kun eri annoksia PCP:tä testattiin, tuotettiin annoksesta riippuva lisäys PCP-vipuun vastaamisessa. Annoksilla 2 mg/kg ja ylemmillä nähtiin 100 % vertautuminen. Vasta annos 8 mg/kg PCP:tä laski vastausnopeuksia, mistä nähdään tämän menettelyn spesifisyys matala-annoksisten PCP:n kaltaisten diskriminaatioärsykkeiden vaikutuksille.

Ei 5-kloori-7-trifluorimetyyli-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni eikä 5-nitro-6,7-dikloori-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni tuottanut lainkaan PCP-vipuun vastaamista millään testatulla annoksella. 5-kloori-7-trifluorimetyyli-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni tuotti annoksesta riippuvia vastausnopeuden alentumisvaikutuksia annoksilla 12,5 ja 25 mg/kg. 5-nitro-6,7-dikloori-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni tuotti vastausnopeuden alentumisvaikutuksia annoksil-

la 6, 8 ja 16 mg/kg. Kun otetaan huomioon vaihtelu näissä tuloksissa, ei voida tehdä johtopäätöstä, että 5-nitro-6,7-dikloori-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni oli luotettavasti voimakkaampi kuin 5-kloori-7-trifluorimetyyli-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni vastausnopeusvaikutusten suhteen. Kuitenkin on selvää, että kummaltakin yhdisteeltä arvioitiin käyttäytymisvaikutusten suhteen aktiivista annosaluetta.

Pohdinta ja johtopäätökset

Sekä 5-kloori-7-trifluorimetyyli-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni että 5-nitro-6,7-dikloori-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni olivat kokonaan vailla PCP:n kaltaisia diskriminaatioärsykevaikutuksia. Tässä suhteessa ne eroavat dramaattisesti PCP-kohdan non-kompetitiivisista NMDA-antagonisteista, kuten PCP, ditsosilpiini, ketamiini ja (+)-N-allyylinormetatsosiini, jotka toimivat täysin PCP:n paikalla tässä menettelyssä (Brady ym., *Pharm. Biochem. Behav.* 17:291-295 (1982), Brady ym., *Science* 212:178-180 (1982), Willetts ja Balster, *Eur. J. Pharm.* 146: 167-169 (1988)). Testattavien yhdisteiden kyvystä tuottaa PCP:n kaltaisia vaikutuksia rotissa voidaan ennustaa niiden kykyä tuottaa PCP:n kaltaisia psykotomimeettisiä vaikutuksia ja väärinkäyttötaipumusta ihmisissä. Siten nämä tulokset tukisivat johtopäätöstä, ettei 5-kloori-7-trifluorimetyyli-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dionilla ja 5-nitro-6,7-dikloori-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dionilla ole lainkaan näitä PCP:n kaltaisia sivuvaikutuksia. Toisaalta näistä tuloksista ei voida päätellä ettei näillä yhdisteillä olisi muita sivuvaikutuksia, vain se, ettei niiden odoteta olevan kovin samankaltaisia PCP:n tuottamien kanssa.

Esimerkki 21

PCP:n kaltaisen liikestimulaation puuttuminen 5-nitro-6,7-dikloori-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dionin vaikutuksesta hiirissä

Johdanto

NMDA-reseptoriantagonistit, erityisesti NMDA-kanavan estäjät, aiheuttavat käyttäytymisstimulatiota jyrsijöissä (Koek ym., *J. Pharmacol. Exptl. Ther.* 245:969 (1988)). Käyttäytymisstimulaation ajatellaan olevan PCP:n psykotomimeettisten sivuaikutusten takana ihmisessä (Koek ym., *J. Pharmacol. Exptl. Ther.* 245:969 (1988), Tricklebank ym., *Eur. J. Pharmacol.* 167:127-135 (1989)). Käyttäytymisstimulaatio on erityisen selvä NMDA-kanavan estäjillä kuten MK801 ja PCP, mutta sitä aiheuttavat myös kompetitiiviset NMDA-antagonistit kuten CGS19755 (Tricklebank ym. *Eur. J. Pharmacol.* 167:127-135 (1989)).

Sen testaamiseksi, onko 5-nitro-6,7-dikloori-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dionilla käyttäytymisstimulaatiovaikutuksia jyrsijöillä, yhdiste testattiin liikeaktiivisuustestissä. Havaittiin, että 5-nitro-6,7-dikloori-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni annoksilla anesteettisille tasoille asti ei indusoinut käyttäytymisen stimuloitumista liikeaktiivisuuden mukaan arvioituna. Sitä vastoin MK081 pienempinä kuin anesteettisinä annoksina aiheutti voimakkaan liikkumiskäyttäytymisen stimulaation. Nämä tulokset viittaavat siihen, että 5-nitro-6,7-dikloori-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dionilla ei ehkä ole PCP:n kaltaisia käyttäytymisstimulaatiovaikutuksia.

Menetelmät ja materiaalit

Swiss/Webster-uroshiiriä (25 - 30 g) saatiin Simonsenilta, ja niitä pidettiin 8-10 hiiren ryhmissä huoneessa, jossa oli kontrolloitu lämpötila ja 12 tunnin valo/pimeäsykli. Ruokaa ja vettä annettiin *ad libitum*.

Liikeaktiivisuus testattiin käyttäen Omnitech-liikeaktiivisuuslaitetta. Eläimille injektoitiin intraperitoneaalisesti (i.p.) joko DMSO:ta tai 5-nitro-6,7-dikloori-

1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dionia liuotettuna DMSO:hon annoksilla 0,1, 0,25, 0,5, 1 ja 5 mg/kg. Injektiotilavuus oli 1 ml/kg. Sitten eläimet pantiin liikeaktiivisuuskammioon, ja niiden liikekäyttäytyminen rekisteröitiin neljältä peräkkäiseltä 15 minuutin jaksolta. Muille eläimille injektoitiin (i.p.) joko suolaliuosta tai MK801:tä suolaliuoksessa annoksilla 0,1, 0,25, 0,5, 1 ja 5 mg/kg, minkä jälkeen liikeaktiivisuus rekisteröitiin.

Tulokset

MK801:n injektio (i.p.) Swiss/Webster-hiiriin tuotti annoksesta riippuvan lisäyksen liikeaktiivisuuteen (kuvio 5). Korkein liikeaktiivisuustaso rekisteröitiin toisella viidentoista minuutin jaksolla. Siksi liikeaktiivisuus toisella viidentoista minuutin jaksolla lääkeaineen injektion jälkeen esitetään kuviossa 5. Liikeaktiivisuuden huippu saatiin annoksella 0,25 mg/kg MK801:tä. MK801-annoksen lisääminen vielä tästä johti alempaan liikeaktiivisuuteen annokseen 0,25 mg/kg verrattuna. Annos 5 mg/kg MK801:tä johti liikeaktiivisuuden suppressioon alle perustason. Sitävastoin 5-nitro-6,7-dikloori-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni ei aiheuttanut lainkaan liikeaktiivisuuden stimulaatiota yli perustason (kuvio 5). Annos 5 mg/kg 5-nitro-6,7-dikloori-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dionia alensi liikeaktiivisuuden alle perustason. Myös korkeampia annoksia 5-nitro-6,7-dikloori-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dionia testattiin (10, 20 ja 50 mg/kg). Millään annoksella ei ollut minkäänlaista liikeaktiivisuuden stimulaatiota. Annoksella 50 mg/kg eläimiltä hävisi täysin jaloilleenkääntymisrefleksi 30 minuuttia i.p. injektion jälkeen. Myös kipuvasteessa oli huomattava menetys, mikä viittasi 5-nitro-6,7-dikloori-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dionin anesteettiseen aktiivisuuteen annoksella 50 mg/kg.

Johtopäätös

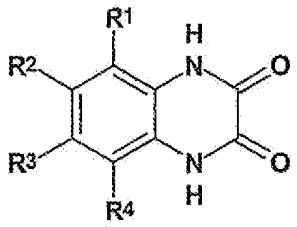
5-nitro-6,7-dikloori-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni ei tuottanut liikeaktiivisuuden stimulaatiota hiirissä. Sitävastoin NMDA-kanavan estäjä MK-801 tuotti voimak-

kaan liikeaktiivisuuden stimulaation yhtäpitävästi tämän yhdisteen PCP:n kaltaisten käyttäytymisvaikutusten kanssa. PCP:n kaltaisten käyttäytymisstimulaatiovaikutusten puuttuminen viittaa siihen, että NMDA/glysiiniantagonisti 5-nitro-6,7-dikloori-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dionilla ei ole haitallisia käyttäytymisstimulaatiovaikutuksia, jotka ovat olleet muiden NMDA-antagonistiluokkien kliinisen kehittämisen rasituksena.

Tämän keksinnön tultua nyt täydellisesti kuvatuksi, ammattimiehille on selvää, että sen suorituksessa voidaan vaihdella olosuhteita, formulaatioita ja muita parametrejä laajalla ja samanarvoisella alueella vaikuttamatta keksinnön tai minkään sen suoritusmuodon suojapiirin. Kaikki tässä siteeratut patentit ja julkaisut sisällytetään kokonaisuudessaan tähän viitteeksi.

Patenttivaatimukset

1. Menetelmä terapeuttisesti käyttökelpoisten 1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dionijohdannaisten valmistamiseksi, joilla on kaava I



jossa

R^1 on halogeeni, amino, C_{1-3}-asyyliamino tai nitro,

R^2 on amino, nitro tai halogeeni,

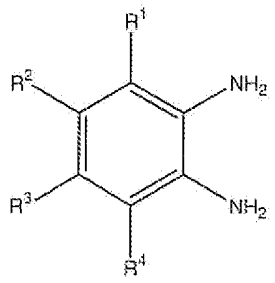
R^3 on halogeeni tai halogeenialkyyli ja

R^4 on vety,

sillä edellytyksellä, että kun R^2 on amino, R^3 ei ole halogeeni,

ja niiden tautomeerien ja farmaseuttisesti hyväksyttävien suolojen valmistamiseksi, tunnettu siitä, että

a) diaminobentseeni, jolla on kaava II



jossa R^1, R^2, R^3 ja R^4 merkitsevät samaa kuin edellä, saatetaan reagoimaan dietyylioksalaatin $(EtOCO)_2$ tai oksaalihapon kanssa, jolloin saadaan kaavan I mukainen yhdiste, tai vaihtoehtoisesti

niiden kaavan I mukaisten yhdisteiden valmistamiseksi, jossa kaavassa R^1 ja/tai R^2 ovat nitro, kaavan I mukainen yhdiste, jossa R^1 ja R^2 merkitsevät muuta kuin nitroa, saatetaan reagoimaan KNO_3:n kanssa, tai

niiden kaavan I mukaisten yhdisteiden valmistamiseksi, jossa kaavassa R^1 ja/tai R^2 on amino, vastaava nitroryhmä pelkistetään, ja

haluttaessa muutetaan saatu kaavan I mukainen yhdiste farmaseuttisesti hyväksyttäväksi suolaksi.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että R^1 on halogeeni tai nitro, R^2 on halogeeni ja R^3 on halogeeni tai halogeenialkyyli.

3. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että valmistetaan

6,7-dikloori-5-nitro-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni,
6,7-difluori-5-nitro-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni,
6-kloori-5-nitro-7-bromi-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni,
5-kloori-6-nitro-7-trifluorimetyyli-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni,
6-kloori-5-nitro-7-trifluorimetyyli-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni,
5-kloori-6,7-difluori-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni,
5-bromi-6,7-difluori-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni,
6,7-dibromi-5-nitro-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni,
5-amino-6,7-dibromi-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni,
5-amino-6,7-dikloori-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni,
tai
6-amino-5-kloori-7-trifluorimetyyli-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni tai
sen tautomeeri tai farmaseuttisesti hyväksyttävä suola.

4. Patenttivaatimuksen 3 mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että valmistetaan:

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

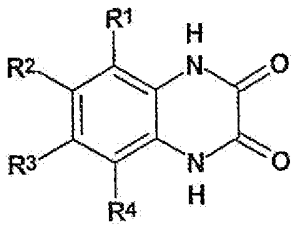
6-kloori-5-nitro-7-trifluorimetyyli-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni tai 5-bromi-6,7-difluori-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni tai sen tautomeeri tai farmaseuttisesti hyväksyttävä muoto.

5. Patenttivaatimuksen 4 mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että valmistetaan 6,7-dikloori-5-nitro-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni tai sen tautomeeri tai farmaseuttisesti hyväksyttävä suola.

6. Patenttivaatimuksen 4 mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että valmistetaan 6,7-dibromi-5-nitro-1,4-dihydrokinoksaliini-2,3-dioni tai sen tautomeeri tai farmaseuttisesti hyväksyttävä suola.

Patentkrav

1. Förfarande för framställning av terapeutiskt användbara 1,4-dihydrokinoxalin-2,3-dionderivat med formeln I



vari

R^1 är halogen, amino, C_{1-3}-acylamino eller nitro,

R^2 är amino, nitro eller halogen,

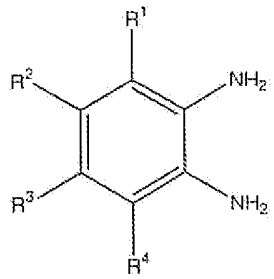
R^3 är halogen eller halogenalkyl och

R^4 är väte,

förutsatt att när R^2 är amino, R^3 inte är halogen,

och för framställning av tautomerer och farmaceutiskt godtagbara salter därav, kännetecknat av att

a) en diaminobensen med formeln II



vari R^1, R^2, R^3 och R^4 betecknar detsamma som ovan, bringas att reagera med dietyloxalat $(EtOCO)_2$ eller oxalsyra, varvid en förening med formeln I erhålls, eller alternativt

för framställning av sådana föreningar med formeln I, vari R^1 och/eller R^2 är nitro, en förening med formeln I, vari R^1 och R^2 betecknar annat än nitro, bringas att reagera med KNO_3, eller

för framställning av sådana föreningar med formeln I, vari R^1 och/eller R^2 är amino, en motsvarande nitrogrupp reduceras och

om så önskas, den erhållna föreningen med formeln I omvandlas till ett farmaceutiskt godtagbart salt därav.

2. Förfarande enligt patentkrav 1, kännetecknat av att R^1 är halogen eller nitro, R^2 är halogen och R^3 är halogen eller halogenalkyl.

3. Förfarande enligt patentkrav 1, kännetecknat av att man framställer
6,7-diklor-5-nitro-1,4-dihydrokinoxalin-2,3-dion,
6,7-difluor-5-nitro-1,4-dihydrokinoxalin-2,3-dion,
6-klor-5-nitro-7-brom-1,4-dihydrokinoxalin-2,3-dion,
5-klor-6-nitro-7-trifluormetyl-1,4-dihydrokinoxalin-2,3-dion,
6-klor-5-nitro-7-trifluormetyl-1,4-dihydrokinoxalin-2,3-dion,
5-klor-6,7-difluor-1,4-dihydrokinoxalin-2,3-dion,
5-brom-6,7-difluor-1,4-dihydrokinoxalin-2,3-dion,
6,7-dibrom-5-nitro-1,4-dihydrokinoxalin-2,3-dion,
5-amino-6,7-dibrom-1,4-dihydrokinoxalin-2,3-dion,
5-amino-6,7-diklor-1,4-dihydrokinoxalin-2,3-dion, eller
6-amino-5-klor-7-trifluormetyl-1,4-dihydrokinoxalin-2,3-dion eller
en tautomer eller ett farmaceutiskt godtagbart salt därav.

4. Förfarande enligt patentkrav 3, kännetecknat av att man framställer:
6,7-dibrom-5-nitro-1,4-dihydrokinoxalin-2,3-dion,
6,7-diklor-5-nitro-1,4-dihydrokinoxalin-2,3-dion,
7-brom-6-klor-5-nitro-1,4-dihydrokinoxalin-2,3-dion,
6-klor-5-nitro-7-trifluormetyl-1,4-dihydrokinoxalin-2,3-dion eller
5-brom-6,7-difluor-1,4-dihydrokinoxalin-2,3-dion eller en tautomer eller ett farmaceutiskt godtagbart salt därav.

5. Förfarande enligt patentkrav 4, kännetecknat av att man framställer 6,7-diklor-5-nitro-1,4-dihyd-

rokinoxalin-2,3-dion eller en tautomer eller ett farmaceutiskt godtagbart salt därav.

6. Förfarande enligt patentkrav 4, kännetecknat av att man framställer 6,7-dibrom-5-nitro-1,4-dihydrokinoxalin-2,3-dion eller en tautomer eller ett farmaceutiskt godtagbart salt därav.

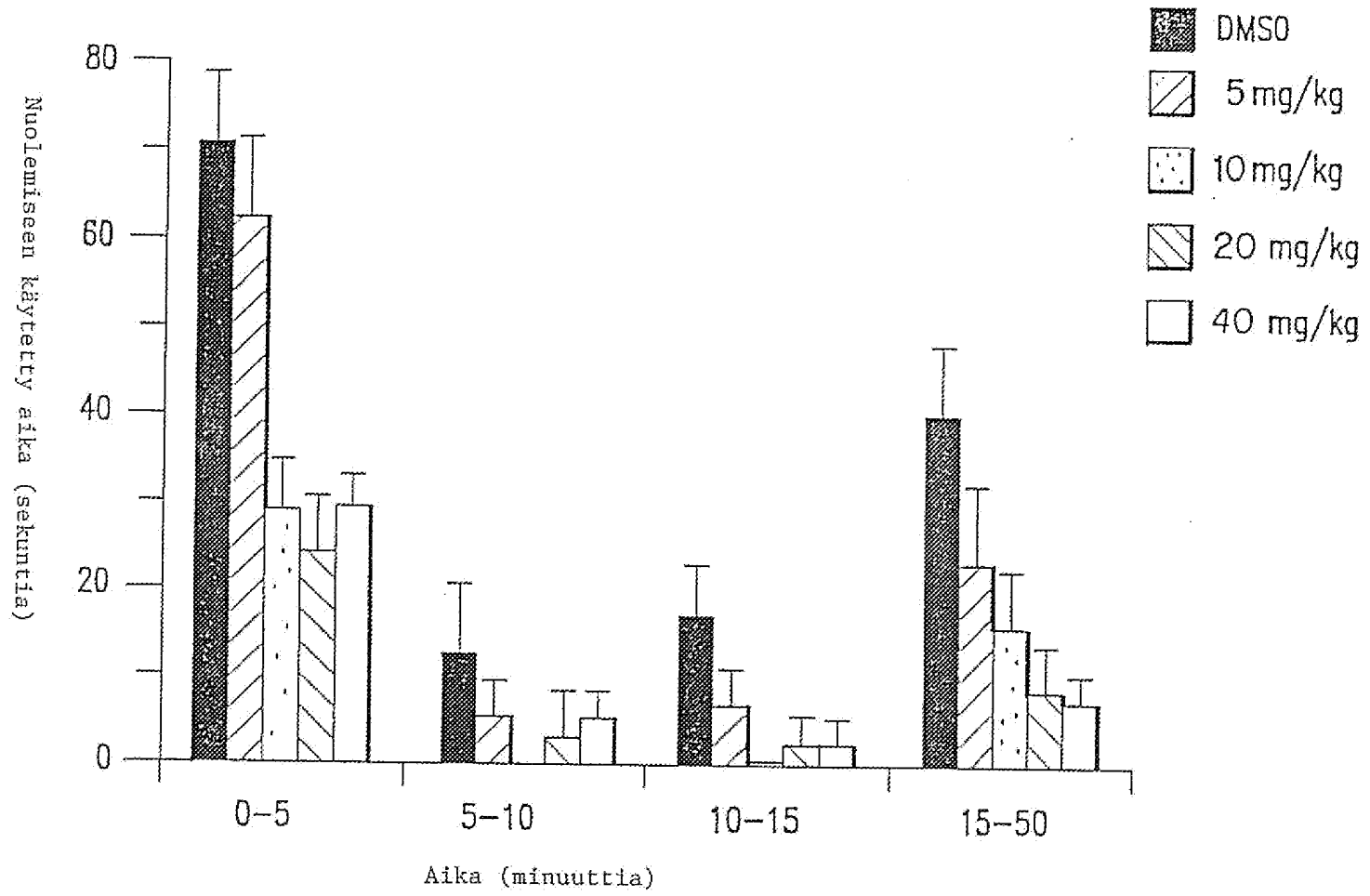

DMSO
5 mg/kg
10 mg/kg
20 mg/kg
40 mg/kg
80
60
40
20
0
Nuolemiseen käytetty aika (sekuntia)
0–5
5–10
10–15
15–50
Aika (minuuttia)

FIG.1

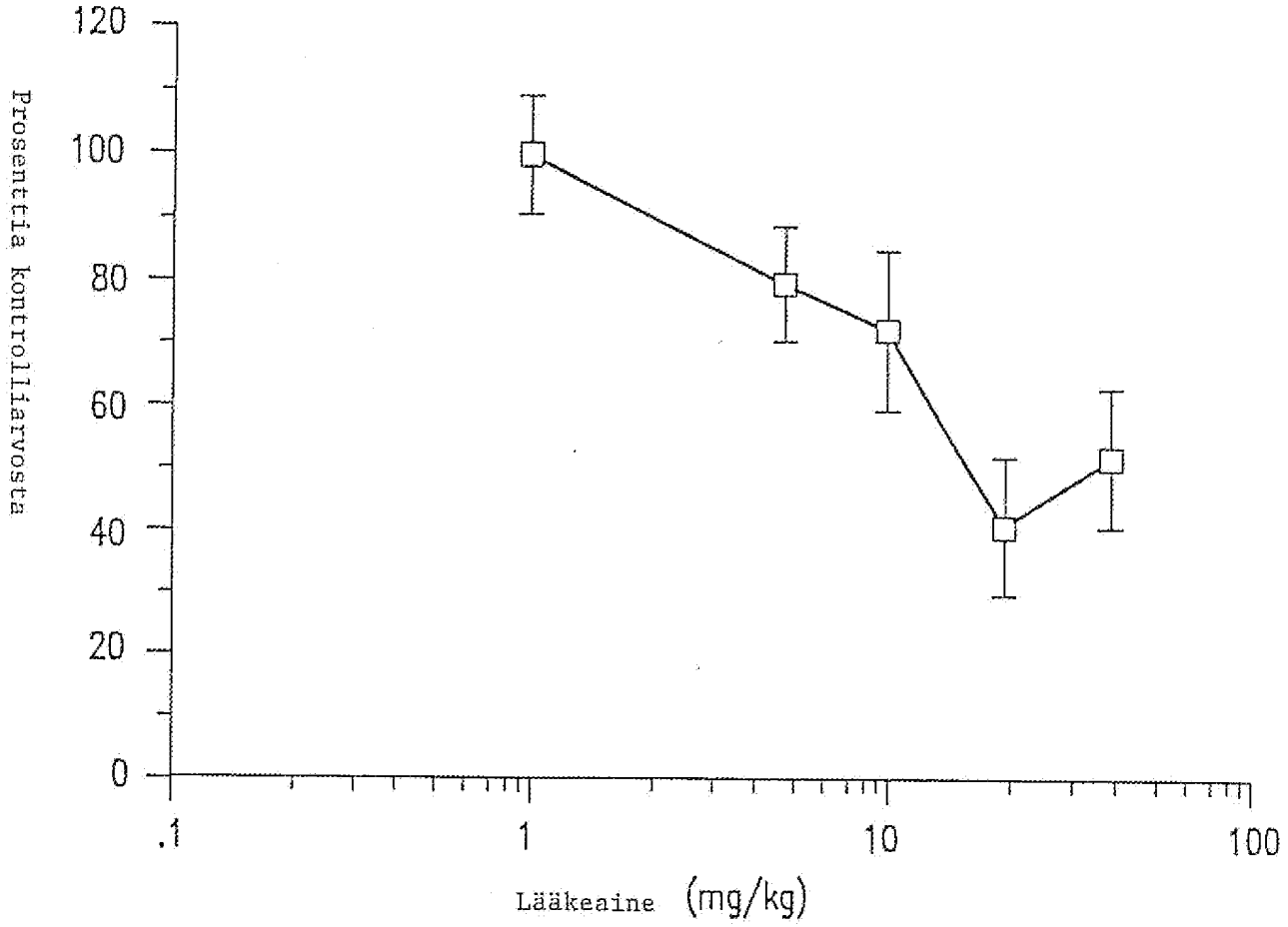

120
100
80
60
40
20
0
Prosenttia kontrolliarvosta
.1
1
10
100
Lääkeaine (mg/kg)

FIG.2 A

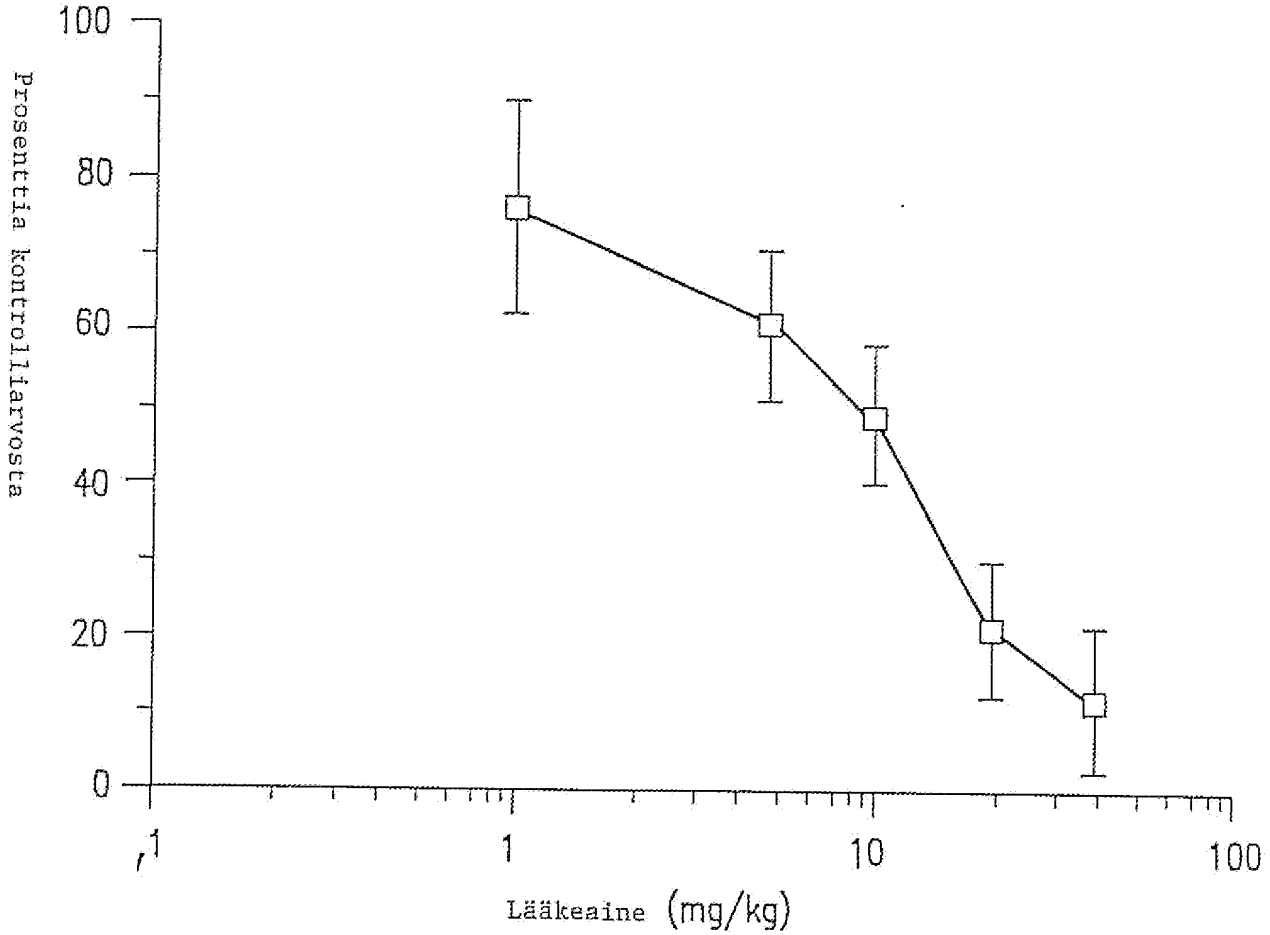

100
80
60
40
20
0
Prosenttia kontrolliarvosta
,1
1
10
100
Lääkeaine (mg/kg)

FIG.2 B

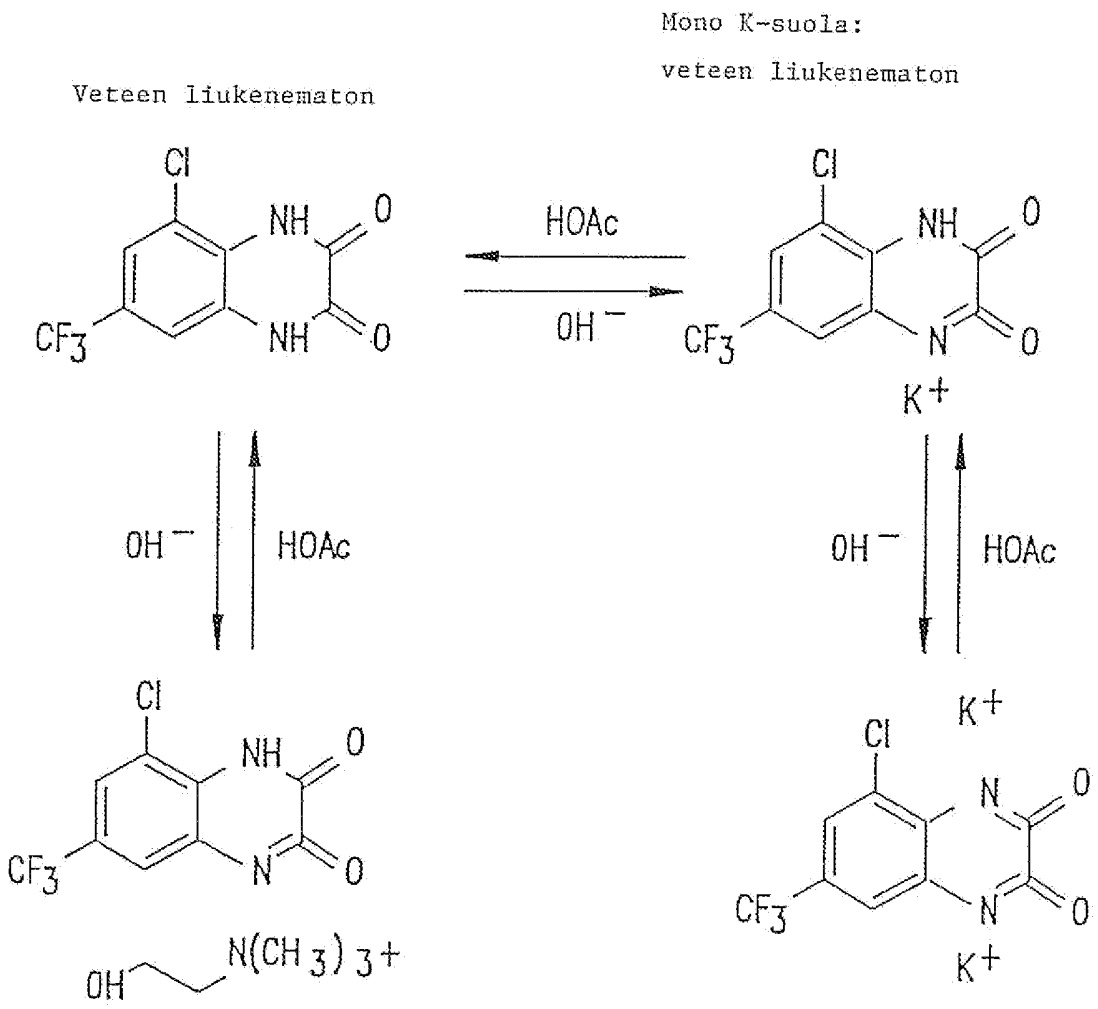

Veteen liukenematon
Mono K-suola:
veteen liukenematon
HOAc
OH⁻
OH⁻
HOAc
OH⁻
HOAc
K+
K+
K+
Monokoliinisuola:
veteen liukeneva
Di-K-suola:
veteen liukeneva

FIG.3

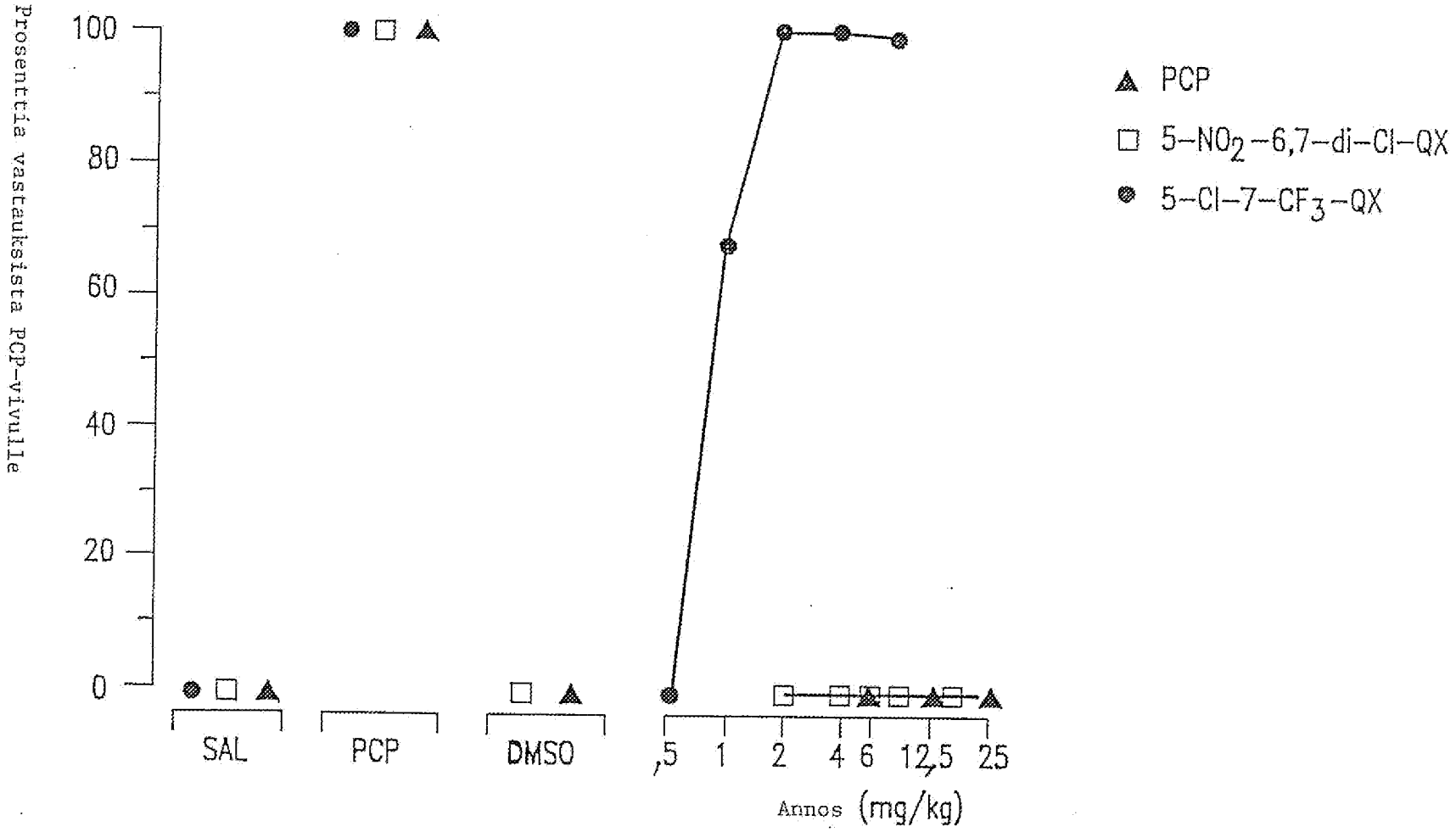

Prosenttia vastauksista PCP-vivulle
100
80
60
40
20
0
SAL
PCP
DMSO
,5
1
2
4
6
12,5
25
Annos (mg/kg)
PCP
5-NO2-6,7-di-Cl-QX
5-Cl-7-CF3-QX

FIG.4 A

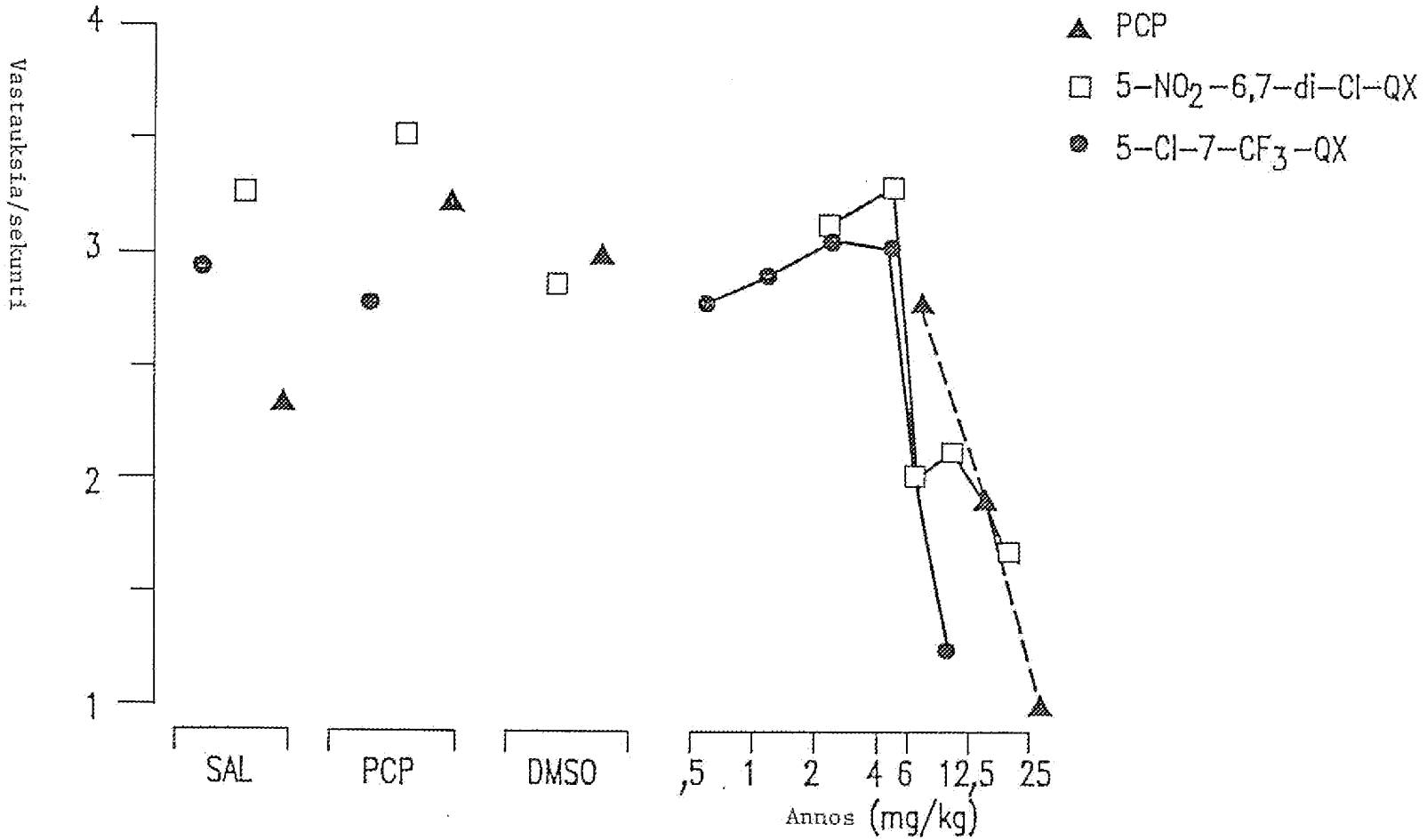

Vastauksia/sekunti
4
3
2
1
SAL
PCP
DMSO
,5
1
2
4
6
12,5
25
Annos (mg/kg)
PCP
5-NO2-6,7-di-Cl-QX
5-Cl-7-CF3-QX

FIG.4 B

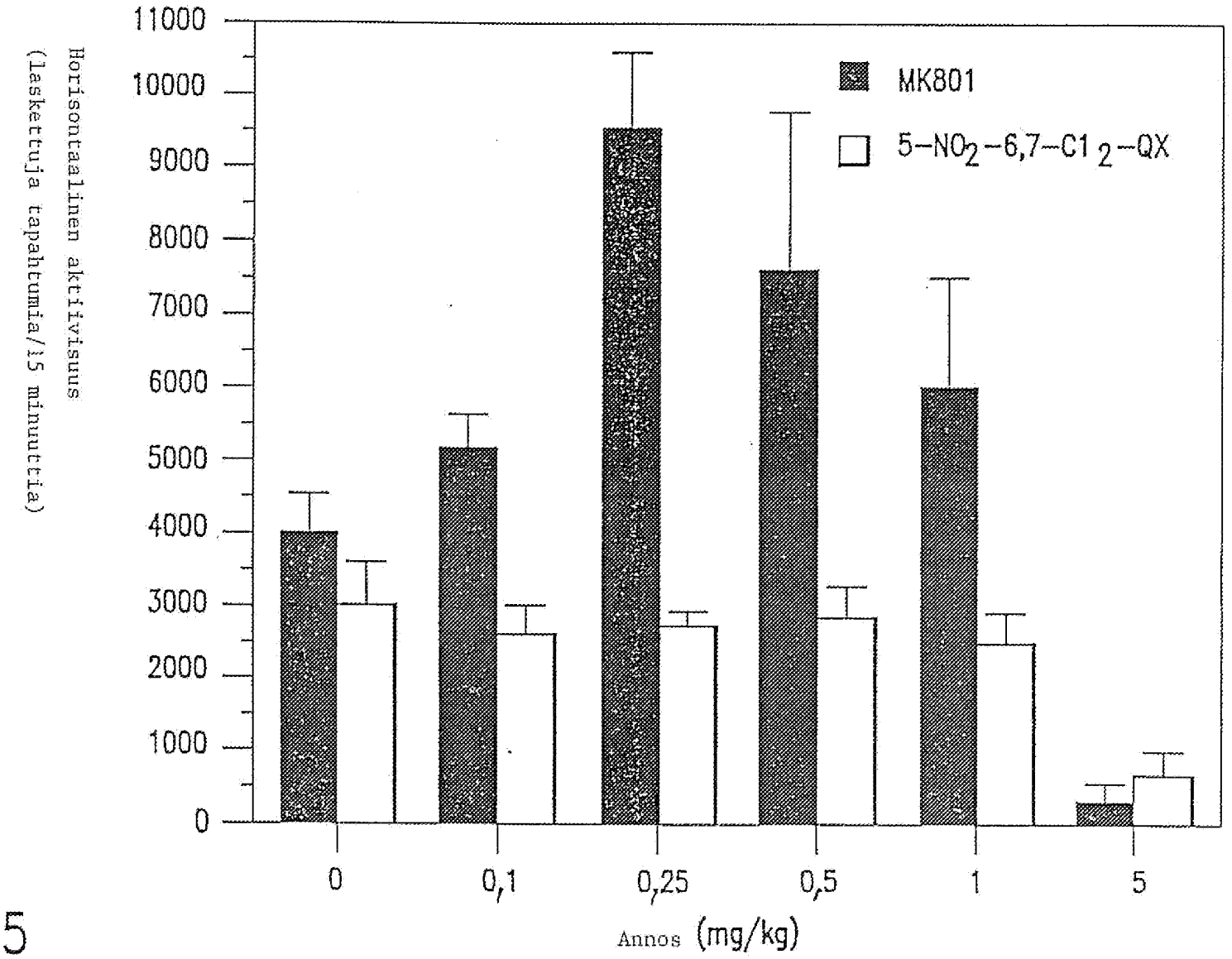

Horisontaalinen aktiivisuus
(laskettuja tapahtumia/15 minuuttia)
11000
10000
9000
8000
7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
MK801
5-NO2-6,7-Cl2-QX
0
0,1
0,25
0,5
1
5
Annos (mg/kg)

FIG.5